



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP - CAUNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL



CORTISOL NA REPRODUÇÃO E NO DESENVOLVIMENTO
INICIAL DO MATRINXÃ (*Brycon amazonicus*)

GUSTAVO MAREGA ODA

BIÓLOGO

Jaboticabal
São Paulo – Brasil
2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP - CAUNESP
PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

CORTISOL NA REPRODUÇÃO E NO DESENVOLVIMENTO
INICIAL DO MATRINXÃ (*Brycon amazonicus*)

GUSTAVO MAREGA ODA

Mestrando

PROFA. DRA. ELISABETH CRISCUOLO URBINATI

Orientadora

PROF. DR. SÉRGIO FONSECA ZAIDEN

Coorientador

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Aqüicultura, do Centro de
Aqüicultura da UNESP, Campus de
Jaboticabal, como parte das
exigências para obtenção do título
de MESTRE em AQUICULTURA,
Área de concentração em
Aqüicultura em Águas Continentais.

Jaboticabal
São Paulo – Brasil
2009

O22c Oda, Gustavo Marega
(*Brycon amazonicus*) / Gustavo Marega Oda. -- Jaboticabal, 2009
xii, 68 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, 2009
Orientador: Elisabeth Criscuolo Urbinati
Banca examinadora: Antonio Fernando Gervásio Leonardo, Sérgio Ricardo Batlouni

Bibliografia

1. Cortisol. 2. Reprodução. 3. Matrinxã I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU : 639.3.03

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: CORTISOL NA REPRODUÇÃO E NO DESENVOLVIMENTO INICIAL DO MATRINXÃ
(Brycon amazonicus)

AUTOR: GUSTAVO MAREGA ODA

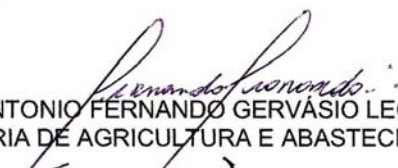
ORIENTADORA: Profa. Dra. ELISABETH CRISCUOLO URBINATI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE em AQUICULTURA ,
pela Comissão Examinadora:



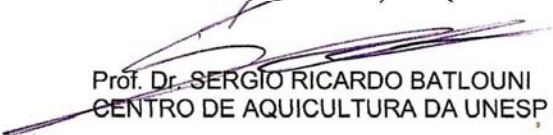
Profa. Dra. ELISABETH CRISCUOLO URBINATI

Departamento de Morfol e Fisiol Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de
Jaboticabal



Prof. Dr. ANTONIO FERNANDO GERVÁSIO LEONARDO

SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO, PARIQUERA-AÇU, SP



Prof. Dr. SERGIO RICARDO BATLOUNI

CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP - CAUNESP

Data da realização: 14 de agosto de 2009.

“Devemos julgar um homem mais pelas
suas perguntas que pelas suas respostas.”

Voltaire

“Nenhum passo para trás que não seja para tomar impulso.”

AGRADECIMENTOS

A “Deus” por manter todas as coisas sempre funcionando...

Aos meus pais Teruo e Roseli, por todo o amor incondicional, apoio e incentivo ao longo desses anos. Vocês passaram por grandes dificuldades e se mostraram maiores que elas... Vocês são os melhores do mundo!!!

A minha irmã Patrícia, por todo o companheirismo, apoio e diversão ao longo da minha vida. Valeu Monstrinho!!!

À Profa. Dra. Elisabeth Criscuolo Urbinati, pela orientação, incentivo e confiança depositada em mim ao longo de todos esses anos. Você com certeza é a segunda mãe de nós todos do laboratório.

Ao Prof. Dr. Sérgio Fonseca Zaiden por todos os ensinamentos, tanto no laboratório como na vida. Muito obrigado!

Ao Prof. Dr. Antonio Fernando Gervásio Leonardo, pelas correções e valiosas sugestões no trabalho e por todos os ensinamentos desde meu início no laboratório. Valeu Léo Bacarin... do seu bebê!!!

Ao Prof. Dr. Sérgio Ricardo Batlouni, pelas excelentes sugestões e correções. Sua contribuição ajudou muito no crescimento do trabalho. Obrigado mesmo!

A todos os amigos e funcionários do CEPTA/ICMBio. Em especial ao Prof. Dr. José Augusto Senhorini, por todos os ensinamentos nesses dois anos de CEPTA. Muito obrigado!

Ao Márcio Japão e ao Spinha, meus irmãos de CEPTA, pelos trabalhos e diversões em Pirassununga. Sem vocês seria impossível trabalhar lá!

A todos os amigos do Laboratório de Fisiologia de Peixes. A lista é longa, mas vou tentar não esquecer ninguém. Queria mandar um salve lá para o Flavião, o Fabiano, a Ana, o Léo Roquinho, a Jaque, a Janessa, o Márcio Japão, a Michele Gaúcha, a Mônica H, a Carlinha Minhoca, o Rafael Sabioni, o Fábio Spinha, o Marcos Saíta, o Rodrigo Gimbo, a Mari, a Aline, o Rulian, a Ana Paula, a Damares e a menina do corredor. Vocês me ensinaram muitas coisas que levarei para o resto da vida. São todos muito especiais para mim!

A todos os amigos da República Nazarena. Quaiada, Gozado (brilha muito no Curintia), Janota, Ferruge, Pará e Sandroca. Vocês são minha segunda família. Sem palavras de agradecimento por todos esses anos!

A todos os amigos, funcionários e colegas do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da FCAV/UNESP e do CAUNESP.

A todos os amigos da Bio 02 e da faculdade.

A todas as pessoas que eu conheci e que acrescentaram algo de bom na minha vida. E não são poucas não...

A todos os peixes que contribuíram com suas vidas para aumentar o nosso conhecimento.

SUMÁRIO

1. REVISÃO DE LITERATURA.....	1
2. OBJETIVOS.....	9
3. MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1. Locais e períodos da realização dos experimentos	10
3.2. Animais e instalações experimentais	10
3.3. Tratamentos	11
3.4. Taxas de fertilização e sobrevivência pré-eclosão.....	14
3.5. Alimentação das larvas	14
3.6. Biometria.....	14
3.7. Microscopia eletrônica de varredura	15
3.8. Microscopia de luz	15
3.9. Qualidade da água.....	16
3.10. Análise Estatística.....	17
4. RESULTADOS	18
4.1. Desova.....	18
4.2. Taxa de fertilização e sobrevivência pré-eclosão	19
4.3. Biometria na eclosão 20	
4.4. Biometria das Larvas	21
4.4.1. Comprimento.....	21
4.4.2. Peso	23
4.4.3. Volume do saco vitelino	25

4.5. Microscopia de ovos e embriões.....	27
4.5.1. Ovos 1h Pós-Fertilização (PF)	27
4.5.2. Ovos 3h Pós-Fertilização (PF)	28
4.5.3. Ovos 6h Pós-Fertilização (PF)	29
4.5.4. Embrião 9h Pós-Fertilização (PF)	31
4.5.5. Embrião 12h Pós-Fertilização (PF)	31
4.6. Microscopia de Larvas	32
4.6.1. Larvas 12h Pós-Eclosão (PE)	32
4.6.2. Larvas 24h Pós-Eclosão (PE)	35
4.7. Cortisol plasmático das fêmeas reprodutoras	39
5. DISCUSSÃO.....	40
6. CONCLUSÕES.....	47
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema ilustrativo das respostas fisiológicas de peixes a estressores ambientais.	2
Figura 2: Níveis de interferência do estresse na reprodução de teleósteos	4
Figura 3: Comprimento das larvas do período experimental de 2007, nos diferentes tempos de amostragem.....	22
Figura 4: Comprimento das larvas do período experimental de 2008, nos diferentes tempos de amostragem.....	23
Figura 5: Peso das larvas do período experimental de 2007, nos diferentes tempos de amostragem	24
Figura 6: Peso das larvas do período experimental de 2008, nos diferentes tempos de amostragem	25
Figura 7: Volume do saco vitelino das larvas do período experimental de 2007, nos diferentes tempos de amostragem.....	26
Figura 8: Volume do saco vitelino das larvas do período experimental de 2008, nos diferentes tempos de amostragem.....	27
Figura 9: Ovos de <i>Brycon amazonicus</i> 1h PF.....	28
Figura 10: Ovos de <i>Brycon amazonicus</i> 3h PF.....	29
Figura 11: Ovos de <i>Brycon amazonicus</i> 6h PF.....	30
Figura 12: Embrião de <i>Brycon amazonicus</i> 9h PF.....	31
Figura 13: Embrião de <i>Brycon amazonicus</i> 12h PF.....	32
Figura 14: Larvas de <i>Brycon amazonicus</i> 12h PE	33

Figura 15: Corte da região anterior de Larvas de <i>Brycon amazonicus</i> 12h pós-eclosão.....	34
Figura 16: Corte da região do intestino de Larvas de <i>Brycon amazonicus</i> 2h pós-eclosão PE	35
Figura 17: Larvas de <i>Brycon amazonicus</i> 24h PE	36
Figura 18: Corte da região anterior de Larvas de <i>Brycon amazonicus</i> 24h pós-eclosão.....	38
Figura 19: Corte da região do esôfago de Larvas de <i>Brycon amazonicus</i> 24h pós-eclosão.....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Quantidade e porcentagem de fêmeas que desovaram	18
Tabela 2: Taxa de fertilização e sobrevivência pré-eclosão de 2007	19
Tabela 3: Taxa de fertilização e sobrevivência pré-eclosão de 2008	19
Tabela 4: Biometria das larvas no momento da eclosão em 2007	20
Tabela 5: Biometria das larvas no momento da eclosão em 2008	20
Tabela 6: Cortisol plasmático das fêmeas reprodutoras	39

RESUMO

A reprodução de peixes é um dos processos mais importantes para a piscicultura, sendo a reprodução artificial um dos manejos de criação mais estressantes para os animais, devido a todo o manejo envolvido. Esse estresse desencadeia a produção de cortisol, que pode provocar problemas na reprodução e nas larvas. Dessa forma, um maior conhecimento do estresse na reprodução é necessário, para se estabelecer rotinas e modelos de manejo mais adequados. Assim, o presente estudo teve como objetivo, verificar o efeito do cortisol administrado por meio de injeção intraperitoneal na reprodução de fêmeas de matrinxã (*Brycon amazonicus*), no desenvolvimento embrionário e no desempenho inicial das larvas. Para isso, foram realizados 2 experimentos, nos meses de novembro e dezembro de 2007 e 2008. Utilizou-se no total, 24 fêmeas e 18 machos de matrinxãs, onde as fêmeas, no momento da indução hormonal com EPC para a reprodução, recebiam uma injeção intraperitoneal de solução de cortisol, de acordo com os tratamentos (4 fêmeas por tratamento), 2007: E1 (Controle) e E2 (10 mg/kg cortisol) e em 2008: E3 (Controle), E4 (0,1 mg/kg cortisol), E5 (1 mg/kg cortisol) e E6 (5 mg/kg cortisol). Após a reprodução, foram verificadas as taxas de fertilização e sobrevivência pré-eclosão e coletados sangue, ovos e larvas dessas fêmeas para as análises de microscopia e biométricas. Os tratamentos com cortisol apresentaram uma menor taxa de fertilização e menor sobrevivência pré-eclosão, além de alguns tratamentos apresentarem tamanho reduzido das larvas na eclosão e ao longo das coletas. Na microscopia, podemos observar que ovos de tratamentos com cortisol tiveram uma aceleração nas divisões celulares, no desenvolvimento embrionário das dosagens mais baixas e maior desenvolvimento do sistema digestório nas larvas com até 24h de vida, porém com muitas deformidades em estruturas corporais e da cabeça, reduzindo o tempo de vida dessas larvas. Pode-se concluir que o cortisol causa efeitos deletérios na reprodução de fêmeas de matrinxãs e no desenvolvimento de sua prole e um manejo estressante durante a reprodução pode causar os mesmos efeitos observados nesse estudo.

Palavras-chaves: estresse, cortisol, reprodução, larvas, matrinxã

ABSTRACT

The reproduction of fish is one of the most important for fish farming and the artificial breeding is one of the most handling stressful, because of all the management involved. This stress triggers the production of cortisol, which can cause problems in reproduction and larvae. Thus, a greater understanding of stress on reproduction is necessary to establish routines and management models more suitable. The present study aimed to evaluate the effect of cortisol administered via intraperitoneal injection on reproduction in female fish (*Brycon amazonicus*), in embryonic development and initial performance of the larvae. For this, 2 experiments were conducted in the months of November and December of 2007 and 2008. We used a total of 24 females and 18 males matrinxãs. Females in moment of hormonal induction EPC for reproduction received an intraperitoneal injection of cortisol solution, according to the treatments (4 females per treatment), 2007: E1 (Control) and E2 (10 mg / kg cortisol) and in 2008: E3 (Control), E4 (0.1 mg / kg cortisol), E5 (1 mg / kg cortisol) and E6 (5 mg / kg cortisol). After reproduction, were observed fertilization rates and survival pre-hatching and collected blood, eggs and larvae of these females for microscopic analysis and biometrics. Treatments with cortisol had a lower fertilization rate and lower survival pre-hatching, and some treatments make small size of larvae at hatching and during the experimental period. In microscopy, we observed that treatment of eggs with cortisol had an acceleration of cell division in embryonic development of lower dosages and further development of the digestive system in larvae up to 24 hours of life, but with many deformities in body structures and head, reducing the lifetime of these larvae. It was concluded that cortisol causes deleterious effects on reproduction of female matrinxãs and development of their offspring and a stressful handling during reproduction can cause the same effects observed in this study.

Keywords: stress, cortisol, reproduction, larvae, matrinxã

1. REVISÃO DE LITERATURA

A reprodução de peixes é um dos processos mais importantes para a piscicultura, sendo a reprodução artificial um dos manejos de criação mais estressantes para os animais.

Além de todos os fatores físicos, químicos e biológicos envolvidos na criação intensiva dos peixes, o manejo necessário para a desova, como captura, seleção de reprodutores, transporte, pesagem, injeção hormonal entre outros, são altamente estressantes e podem causar alteração na capacidade reprodutiva dos peixes (BARTON & IWANA, 1991; WENDELAAR BONGA, 1997; PANKHURST & VAN Der KRAAK, 1997; PANKHURST & VAN Der KRAAK, 2000; MYLONAS et al, 2009; BOBE & LABBÉ, 2009; MILLA et al., 2009).

O estresse pode ser definido como uma condição na qual o equilíbrio dinâmico, ou homeostase biológica, de um determinado organismo é perturbado ou influenciado por um estímulo intrínseco ou extrínseco, denominado de estressor (PICKERING, 1981). Isso desencadeia, pelo sistema nervoso central (SNC) e pelo sistema hormonal, um conjunto de reações que compõem a resposta de estresse. Essa resposta prepara o animal para uma situação de “luta ou fuga”, ou seja, os animais submetidos ao estímulo fogem, evitando o estressor, ou se não podem fazê-lo, reagem e lutam para conviver com o estressor (BARTON & IWANA, 1991).

Embora a ativação crônica de respostas de estresse possa ser prejudicial, poucos indivíduos podem sobreviver por muito tempo se seus organismos não forem capazes de reagir. Essa resposta aparece como uma série de mudanças orgânicas, fisiológicas e comportamentais, que envolve um amplo conjunto de sistemas regulados pelo cortisol, como a atividade neural e comportamental (de KLOET et al., 2005), o metabolismo energético e iônico (MOMMSEN et al., 1999) e a resposta

imune (BARNES, 2006), que aumentam as probabilidades de sobrevivência imediata (BARTON & IWANA, 1991). Porém, essa ameaça contínua ou crônica pode resultar em danos ao sistema imune, crescimento e capacidade reprodutiva dos peixes (WENDELAAR BONGA, 1997).

As respostas desencadeadas pelo sistema nervoso central são controladas por um complexo sistema neuroendócrino, com dois eixos principais: o sistema simpático – cromafim e o eixo hipotálamo – pituitária – interrenal (Figura 1).

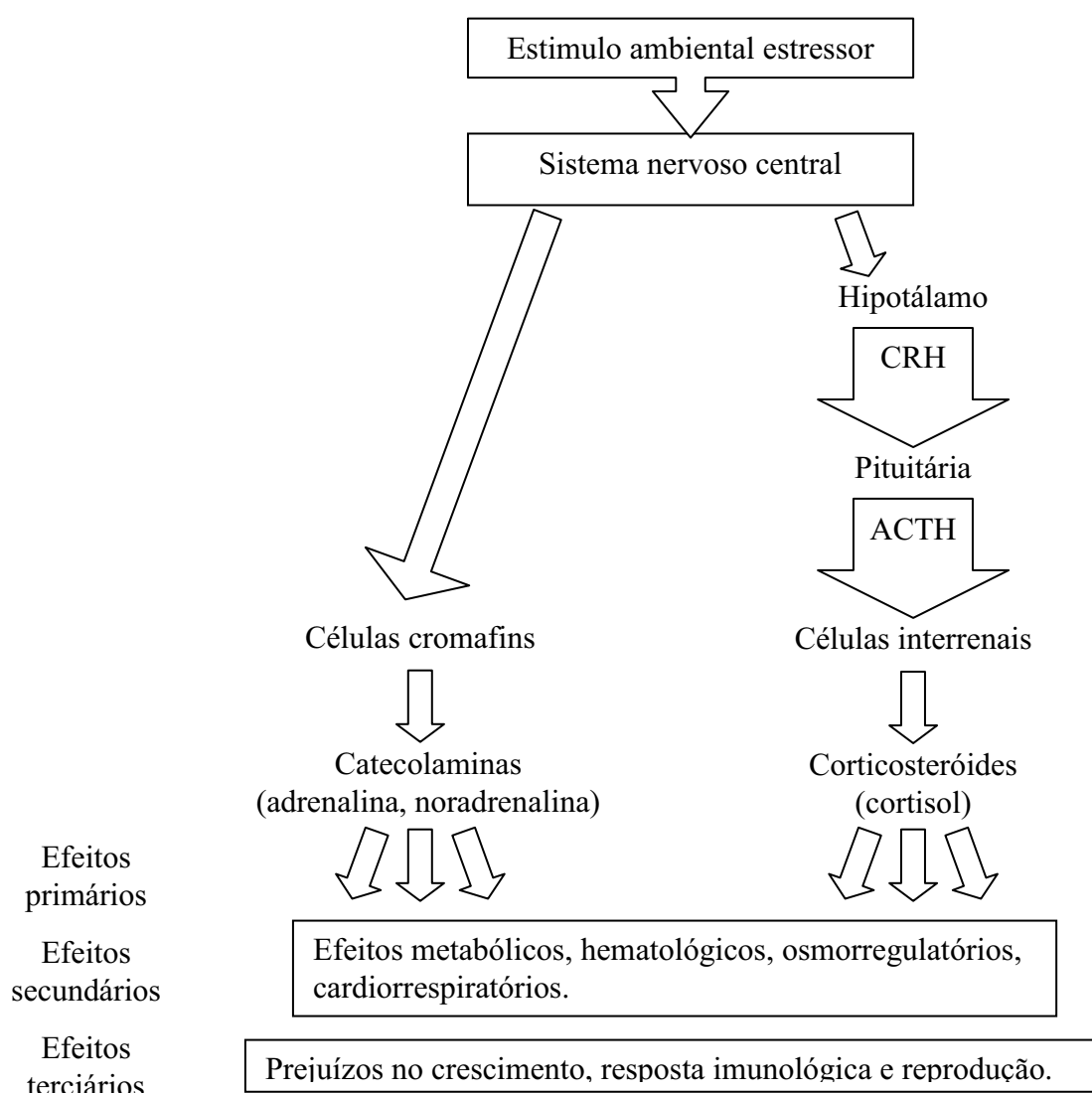


Figura 1: Esquema ilustrativo das respostas fisiológicas de peixes a estressores ambientais. CRH – hormônio liberador de corticotropina; ACTH - hormônio adrenocorticotrópico Adaptado de Urbinati & Carneiro, 2004.

O primeiro eixo consiste de uma estimulação do sistema cromafim, no rim cefálico, por fibras do sistema nervoso simpático e a liberação, pelas células cromafim, de catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) que desencadeiam uma resposta e produzem um efeito imediato. O segundo eixo consiste na estimulação em cascata do hipotálamo, com aumento nos níveis circulantes de CRH (hormônio liberador de corticotropina), da pituitária, com liberação de ACTH (hormônio adrenocorticotrópico), e do tecido interrenal, no rim cefálico, com liberação de cortisol (URBINATI & CARNEIRO, 2004).

Tanto as catecolaminas quanto o cortisol são os responsáveis pelo desencadeamento das respostas secundárias, como alteração no metabolismo energético, hematológico, osmorregulatório e cardiorrespiratório, respostas fisiológicas necessárias dos peixes para se adaptar as situações adversas (URBINATI & CARNEIRO, 2004).

Assim, o cortisol é um importante hormônio ligado ao estresse e sua influência na reprodução tem sido pesquisada, mas seus efeitos ainda não são totalmente conhecidos, podendo agir em vários níveis do sistema endócrino reprodutivo dos peixes.

A GTH-I e GTH-II são hormônios importantes na reprodução dos peixes. A GTH-I é funcionalmente similar ao hormônio folículo estimulante (FSH) e a GTH-II é similar ao hormônio luteinizante (LH) dos mamíferos (SCHULZ et al., 2001).

Esses hormônios são produzidos na pituitária e são levados pelo sangue até os ovários e os testículos, onde estimulam a produção dos esteróides gonadais, estradiol, progesterona, testosterona e 11-cetotestosterona, que atuam na definição de caracteres sexuais secundários, vitelogênese, formação e maturação de gametas, ovulação e espermição, sendo que o cortisol pode provocar a redução na

produção de GTH-I e GTH-II (PANKHURST & VAN Der KRAAK, 1997; PANKHURST & VAN Der KRAAK, 2000) (Figura 2).

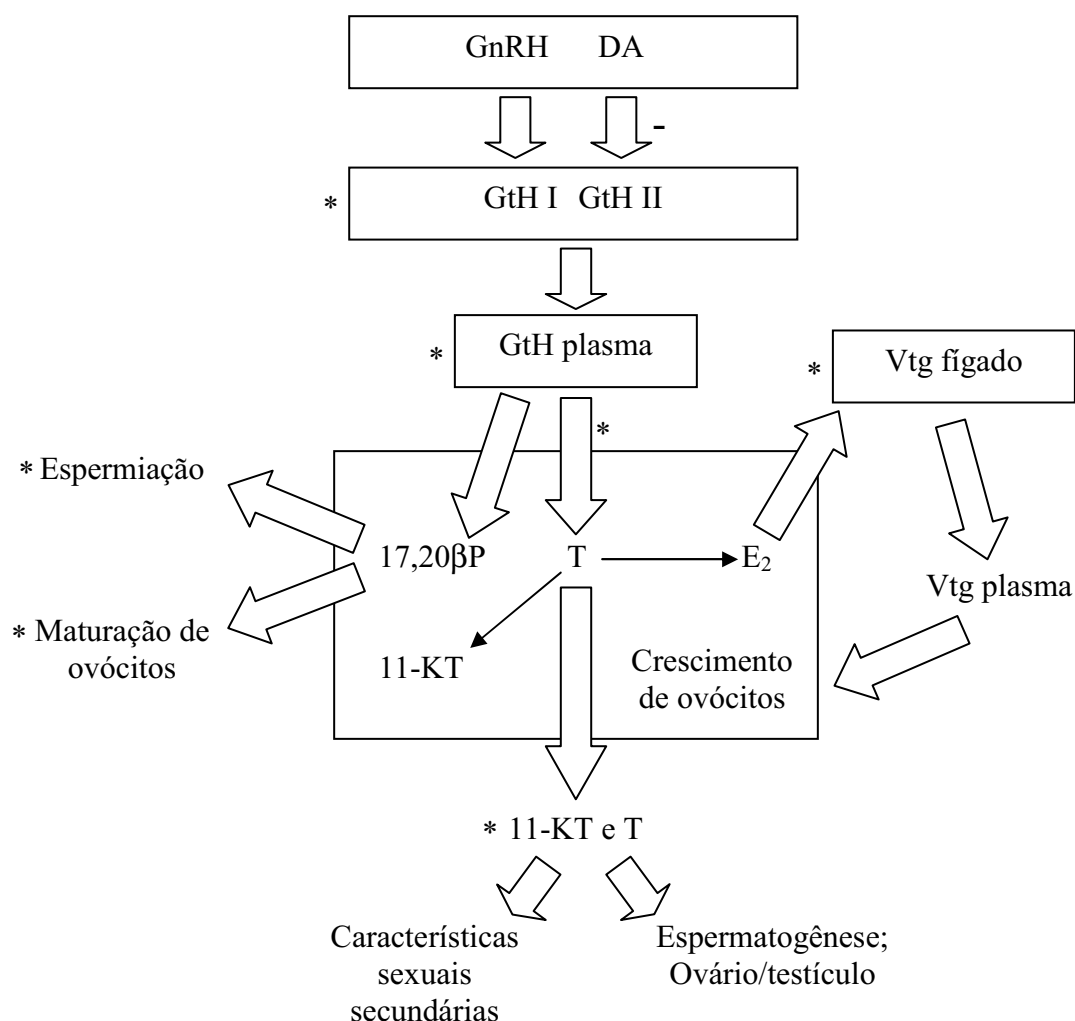


Figura 2: Níveis de interferência do estresse na reprodução de teleósteos. Os asteriscos mostram os efeitos inibitórios do estresse. As vias são estimulatórias, exceto se indicado (-). Legenda: DA – dopamina; E₂ – 17β-estradiol; GnRH – hormônio liberador de gonadotropinas; GtH – gonadotropinas; 11-KT – 11-cetotestoterona; 17,20βP – 17α, 20β-diidroxi-4-pregnenona; T – testosterona; Vtg – vitelogenina. Urbinati & Carneiro, 2004 (Adaptado de Pankhurst e Van der Kraak, 1997)

Alguns trabalhos já demonstraram em diferentes espécies os efeitos negativos do cortisol nas gônadas e na produção dos hormônios da reprodução.

O aumento do cortisol plasmático obtido por implante de pellets de cortisol provocou a diminuição do peso dos testículos e da testosterona plasmática, em machos de truta marrom (CARRAGHER et al., 1989). Nas fêmeas maduras, ocorreu

diminuição do 17- β estradiol (E_2), da testosterona e da vitelogenina, além da diminuição do peso das gônadas.

Em fêmeas de tilápia tratadas com implante de cortisol, também ocorreu a diminuição do índice gonadossomático, tamanho do ovócito, testosterona e estradiol plasmáticos, após sete dias ou mais de tratamento (FOO & LAM, 1993).

Por outro lado, folículos ovarianos de *Carassius auratus*, *Cyprinus carpio* e *Pagrus auratus* incubados *in vitro* não sofreram inibição da produção de testosterona e de 17- β estradiol (E_2) quando tratados diretamente com cortisol (PANKHURST et al., 1995).

Outra importante proteína envolvida na reprodução dos peixes, a vitelogenina (Vtg), intimamente ligada ao sucesso reprodutivo dos vertebrados ovíparos, também é influenciada pelo estresse.

A síntese da vitelogenina é um processo estimulado pelo 17- β -estradiol (E_2) envolvendo o controle coordenado entre o hipotálamo, pituitária, fígado e gônadas (Figura 2). A vitelogenina é sintetizada no fígado de peixes ovíparos, transportada até os ovários onde é sequestrada e incorporada nos ovócitos durante o seu desenvolvimento, constituindo a principal fonte de nutrição do embrião durante o desenvolvimento inicial (COPELAND et al., 1986; THOMAS, 1990).

Em trutas arco-íris, o estresse de confinamento de fêmeas reprodutoras por 2 semanas resultou em menor quantidade de vitelogenina plasmática e diminuição do tamanho dos ovócitos (CAMPBELL et al., 1992).

A origem do cortisol dos ovos e larvas também é outro importante ponto de estudos, podendo existir diferenças na ontogênese do cortisol devido a diferenças de história natural, espécies de peixes e o desenvolvimento das estruturas relacionadas com o eixo hormonal.

Espécies como a *Lampetra planeri* e o *Paralichthys olivaceus* começaram a secretar o hormônio na metamorfose, fase onde ocorrem grandes mudanças estruturais no corpo dos animais (SEILER et al., 1983; de JESUS et al., 1991).

Larvas de *Paralichthys dentatus* aos 21 dias pós-eclosão, ou seja, mesmo antes do início da metamorfose, já possuem o eixo hipotálamo – pituitária – interrenal totalmente funcional, controlando a produção de cortisol por meio de um mecanismo de feedback (VEILLETTE et al., 2007).

Estudos com *Oncorhynchus mykiss* no início do desenvolvimento mostraram que o eixo hipotálamo – pituitária – interrenal pode responder ao estresse já aos 14 dias, com secreção do cortisol (SUZUKI et al., 1997).

Larvas de *Polydactylus sexfilis* entre 7 e 25 dias de idade sofreram aumento nas concentrações de cortisol, ocorrendo variações de acordo com as condições ambientais de onde foram criadas, como diferentes valores de pH, concentrações de salinidade e íons de iodo (WITT et al., 2009).

Em larvas de *Sciaenopus ocellatus* ocorreu uma diminuição da concentração do cortisol da eclosão até 25 dias de vida, mas ao final desse período as larvas já eram capazes de aumentar a concentração de cortisol quando submetidas a estresse agudo e de acordo com a colonização do habitat (PÉREZ-DOMINGUES & HOLT, 2006).

O cortisol foi encontrado em larvas de *Sparus sarba* com 1 dia após a eclosão e teve níveis crescentes até as larvas atingirem 7 dias de vida, podendo esse aumento ser resultado de produção endógena dessa fase inicial (DEANE & WOO, 2002).

Após a fertilização, embriões de *Seriola quinquerodiata* apresentaram níveis de cortisol aumentados, sugerindo que o eixo hipotálamo – pituitária – interrenal pode estar funcional no momento da desova (SAMPATH-KUMAR et al., 1997).

Cinquenta horas após a fertilização dos ovos de carpa, os embriões tinham níveis de cortisol aumentados quando sujeitos ao manuseio, indicando funcionalidade da pituitária e da interrenal no período de incubação (STOUTHART et al., 1998).

Entretanto, em *Oreochromis mossambicus* e *Oncorhynchus mykiss*, os altos níveis de cortisol presentes em ovos recém fertilizados declinaram até a eclosão, sugerindo que o cortisol de origem materna foi usado no início do desenvolvimento embrionário (HWANG et al., 1992; BARRY et al., 1995).

Cortisol e hormônios tireoidianos foram detectados em ovos de *Sparus aurata*, sendo que esses hormônios eram de origem materna. O padrão de alteração nas concentrações de cortisol foi parecido com o do hormônio tiroxina (T_4), tendo ambos decrescido ao longo do tempo. Nos ovos fertilizados, o cortisol foi diminuindo durante a incubação até a eclosão e aumentou significativamente nas larvas, próximo às fases de grandes mudanças, como na primeira alimentação, na formação dos raios das nadadeiras, flexão da notocorda e transformação do corpo (SZISCH et al., 2005).

Os estudos sugerem que o cortisol presente nos ovos é de origem materna, porém esta hipótese não pode ser totalmente confirmada, pois em alguns casos existe um aumento do cortisol embrionário e larval, indicando a produção endócrina após a eclosão dos ovos em várias espécies, mas com padrões de aumento diferenciados entre as diferentes espécies.

A transferência do cortisol da progenitora para a prole é incerta em *Oncorhynchus mykiss*, no qual, nas primeiras duas semanas após a eclosão, não houve evidência de resposta de estresse ao manuseio. Pode ocorrer transferência de cortisol, porém a larva parece não possuir, ainda, desenvolvimento completo do eixo hipotálamo – pituitária - interrenal, não demonstrando resposta ao estresse, tanto *in vitro* como *in vivo* (BARRY et al., 1995).

Os trabalhos disponíveis, relacionados a estresse, utilizam ovócitos e larvas de peixes de águas temperadas (SEILER et al., 1983; de JESUS et al., 1991; BARRY et al., 1995; VEILLETTE et al., 2007), que possuem um tempo de desenvolvimento embrionário e larval muito maior que os dos peixes tropicais, ou ainda uma biologia reprodutiva diferenciada, como *Siganus guttatus* que apresenta desova parcial e o estresse produziu aumento na desova (AYSON, 1989).

Em peixes tropicais, existem poucos estudos sobre o estresse e seus efeitos na reprodução. Alguns exemplos são os estudos sobre os efeitos do cortisol materno na prole e na maturação dos ovos de matrinxã (BRINN, 2003) e estudos que envolvem a ontogenia e formação do eixo hipófise – pituitária – interrenal em larvas de matrinxã (GANECO, 2007).

Um maior conhecimento da fisiologia dos peixes utilizados nas pisciculturas brasileiras torna-se necessário visando soluções que minimizem os efeitos estressores comuns na rotina do cultivo. É necessário, portanto, o estabelecimento de um modelo de monitoramento do estresse que possa ser aplicado às espécies reproduzidas no Brasil, de modo a propor manejo mais adequado na reprodução dos peixes.

2. OBJETIVO

Verificar o efeito do cortisol administrado por meio de injeção intraperitoneal na reprodução de fêmeas de matrinxã (*Brycon amazonicus*), no desenvolvimento embrionário e no desempenho inicial das larvas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Locais e períodos da realização dos experimentos

O presente estudo foi realizado no Centro de Pesquisa e Gestão de Recursos Pesqueiros Continentais CEPTA/ICMBio, localizado no Município de Pirassununga, Estado de São Paulo, Brasil (21° 56' S e 47° 22' W) e no Laboratório de Fisiologia de Peixes, do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, da FCAV/UNESP, Campus de Jaboticabal.

Os experimentos foram realizados em dois períodos reprodutivos. O primeiro experimento foi realizado nos meses de novembro e dezembro de 2007, enquanto o segundo experimento foi realizado nos meses de novembro e dezembro de 2008.

3.2. Animais e instalações experimentais

Foram utilizados exemplares adultos de matrinxã, provenientes de reprodução induzida e fornecidos pelo CEPTA/ICMBio. Para o primeiro experimento, foram utilizadas 8 fêmeas (4 fêmeas por tratamento) e 8 machos. No ano seguinte, para a realização do segundo experimento, foram utilizadas 16 fêmeas (4 fêmeas por tratamento) e 10 machos. Os lotes foram mantidos em viveiros escavados de terra e alimentados com ração comercial (28% P.B.), oferecida duas vezes ao dia (5% da biomassa/dia).

Os reprodutores foram pesados para o cálculo das doses hormonais de indução a desova segundo WOYNAROVICH & HORVART (1983). A seleção dos reprodutores foi realizada de acordo com a técnica de inspeção visual, apalpação abdominal e caracteres sexuais secundários (BERNARDINO et al., 1993).

Os reprodutores selecionados foram transportados para o Laboratório de Propagação Artificial e Genética de Peixes do CEPTA/ICMBio. No laboratório, as fêmeas foram marcadas com fios coloridos presos na nadadeira dorsal para posterior identificação.

Os peixes foram mantidos em três caixas de alvenaria com capacidade para 3000 L, com renovação contínua de água, sendo duas caixas destinadas as fêmeas e uma caixa aos machos.

A indução foi realizada com extrato de pituitária de carpa (EPC). As fêmeas receberam uma dose preparatória de 0,5 mg/kg p.v. e uma segunda dose 10 horas após a primeira, de 5,0 mg/kg p.v. Os machos receberam apenas 1 dose de EPC (1 mg/kg p.v.), no momento da segunda dose das fêmeas (WOYNAROVICH & HORVART, 1983).

3.3. Tratamentos

No momento da injeção da dose preparatória, as fêmeas receberam a aplicação intraperitoneal de uma solução de cortisol. As soluções de cortisol foram preparadas para que o volume injetado nas fêmeas não ultrapassasse 1

ml e contivesse a quantidade de miligramas de cortisol por quilo de peixe vivo estabelecidos nos tratamentos. Os tratamentos variaram de acordo com os experimentos e seguiram os seguintes protocolos:

2007:

- E1: 0 mg/kg de peixe + solução fisiológica (n=4 fêmeas)
- E2: 10 mg/kg de peixe de hidrocortisona Sigma® + solução fisiológica (n=4 fêmeas)

2008:

- E3: 0 mg/kg de peixe + solução fisiológica (n=4 fêmeas)
- E4: 0,1 mg/kg de peixe de hidrocortisona Sigma® + solução fisiológica (n=4 fêmeas)
- E5: 1 mg/kg de peixe de hidrocortisona Sigma® + solução fisiológica (n=4 fêmeas)
- E6: 5 mg/kg de peixe de hidrocortisona Sigma® + solução fisiológica (n=4 fêmeas)

Os ovócitos foram extrusados, nas fêmeas que responderam à indução hormonal, e colocados em bacias plásticas para a fertilização. Após a extrusão e pesagem dos ovócitos de cada fêmea, foi preparada uma mistura com quantidades iguais de cada fêmea, dentro de um mesmo tratamento, para fertilização a seco.

Foi utilizado, para a fertilização, sêmen de apenas um dos machos, sendo escolhido o sêmen que apresentava maior quantidade e melhor aparência.

Após a fertilização e hidratação dos ovos, 1L de ovo hidratado foi colocado em cada incubadora, sendo usadas duas incubadoras cônicas de 60L para cada tratamento.

Em cada tratamento, foram coletadas 30 unidades de ovócitos e ovos com embriões em desenvolvimento até a eclosão. Para as larvas, adotou-se a quantidade de 20 unidades para cada tratamento. Estas amostras foram fixadas em solução de Karnowsky por 48 horas, mantidas em geladeira, e posteriormente transferidas para álcool 70 para conservação e posterior avaliação. O seguinte protocolo de coleta foi adotado para cada um dos tratamentos:

E1 e E2:

- Ovos após a fertilização: Coleta com intervalos de 1h até a eclosão
- Eclosão até 48h pós eclosão: Coletas das larvas com intervalos de 12 horas

E3, E4, E5 e E6:

- Ovos após a fertilização: Coleta com intervalos de 3h até a eclosão
- Eclosão até 48h pós eclosão: Coletas das larvas com intervalos de 6 horas

O sangue de cada fêmea foi coletado antes da aplicação da primeira indução hormonal e do tratamento e após a extrusão, para dosagem de cortisol por imunoensaio enzimático (EIA).

3.4. Taxas de fertilização e sobrevivência pré-eclosão

Seis horas após a fertilização, amostras de ovos foram observadas a fresco para determinar a taxa de fertilização, sendo feita a contagem de ovos gorados e ovos viáveis.

Momentos antes da eclosão, amostras foram retiradas para determinação da sobrevivência pré-eclosão. Quando 50% das larvas haviam rompido o córion foi realizada a contagem considerando as larvas livres e em movimento dentro dos ovos, como larvas aptas a eclosão.

Para cada uma das contagens estabeleceu-se a quantidade mínima de 100 ovos por amostragem, com 10 repetições de contagem.

3.5. Alimentação das larvas

As larvas, 24 horas após a eclosão, foram alimentadas nas incubadoras com zooplâncton selvagem, náuplios de artêmia e ração comercial farelada (32% de proteína), oferecidos 5 vezes ao dia.

3.6. Biometria

Utilizou-se uma balança analítica (Ohaus®) com precisão de 0,00001 g para a pesagem, e um estereomicroscópio binocular (Coleman ®), com objetiva de 2X e ocular com escala, e um paquímetro digital (Mitutoyo ®) para a medição.

O volume do saco vitelino, em mL, foi calculado pela fórmula $V = (\pi/6)LH^2$, onde V é o volume, L o comprimento e H a altura (BLAXTER, 1969).

3.7. Microscopia eletrônica de varredura

Seis ovos e embriões de cada experimento e tratamento foram coletados nos momentos 1h PF, 3h PF, 6h PF, 9h PF e 12h PF. Seis larvas de cada experimento e tratamento foram coletadas no momento da eclosão, 12h PE, 24h PE, 36h PE e 48h PE. Todo o material foi fixado em solução de Karnowsky, a 4°C, por 48 horas e, posteriormente, lavados em solução tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2 por seis vezes. A seguir, realizou-se pós-fixação em tetróxido de ósmio a 1% por 3 horas; desidratação em série alcoólica crescente e secagem em Secador de Ponto Crítico, da marca Tousimis modelo Sandri 780 A. Para a metalização, utilizou-se um equipamento Jeol JFC 1100 e as amostras foram fotografadas em microscópio eletrônico de varredura Jeol, operado em 15KV.

3.8. Microscopia de luz

Seis larvas de cada experimento e tratamento foram coletadas no momento da eclosão, 12h PE, 24h PE, 36h PE e 48h PE e foram fixadas em solução de Karnowsky, a 4°C, por 48 horas e, posteriormente, lavados em solução tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2 por seis vezes. Após fixação, o

material foi desidratado em série alcoólica crescente, diafanizado em série de xilóis, incluído em parafina, cortado em micrótomo (5 μ m) e corado pela técnica da hematoxilina de Harris - eosina (HE). Os cortes histológicos foram analisados e fotografados com fotomicroscópio Axiophot-Zeiss.

3.9. Qualidade da água

Diariamente, durante todo o período de incubação, às 9:00 e 16:00 horas, registrou-se a temperatura da água. As temperaturas médias foram de $26,6 \pm 0,4$ °C para o experimento realizado em 2007 (E1 e E2) e $27,3 \pm 1,2$ °C para o experimento realizado em 2008 (E3, E4, E5 e E6).

A concentração de oxigênio dissolvido foi aferida com oxímetro digital YSI 55, ficando em média no valor de $6,4 \pm 0,9$ mg/L, considerando os dois períodos experimentais, enquanto o pH foi aferido com potenciômetro YSI 63, ficando em média no valor de $7,0 \pm 0,4$.

Amostragens de água das incubadoras no início e no final do experimento foram usadas para determinação da concentração de amônia total por reagente de Nessler ($0,38 \pm 0,11$ mg/L). Os valores encontrados estão dentro da faixa recomendada para cultivo de espécies tropicais (Boyd, 1990).

3.10. Análise Estatística

Os resultados obtidos foram expressos pela média $\pm$ desvio padrão da média. A significância estatística das diferenças entre as médias foi estimada por análise de variância (ANOVA), com um nível de significância de 5% com teste de Tukey, no programa SAS 9.0

4. RESULTADOS

4.1. Desova

A porcentagem de fêmeas submetidas aos tratamentos com cortisol que desovaram foi menor nos 2 experimentos quando comparada aos grupos controle (Tabela 1).

Tabela 1: Quantidade e porcentagem de fêmeas que desovaram

Tratamentos	Total de fêmeas	Fêmeas que desovaram	% de fêmeas que desovaram
E1	4	3	75
E2	4	2	50
E3	4	3	75
E4	4	2	50
E5	4	1	25
E6	4	1	25

No período experimental de 2007, no controle E1, 75% das fêmeas controle desovaram, enquanto que apenas 50% das fêmeas do E2, tratadas com 10 mg/kg de cortisol desovaram.

No período experimental de 2008, no controle E3, 75% das fêmeas controle desovaram, enquanto que, das fêmeas dos tratamentos E4, E5 e E6, tratadas com 0,1 mg/kg, 1 mg/kg e 5 mg/kg apenas 50%, 25% e 25%, respectivamente, desovaram.

Ainda sobre o E6, 50% das fêmeas desovaram 10h após a primeira dose de EPC. Foi realizada a fertilização e incubação desses ovos, mas todos morreram com menos de 6h de incubação.

4.2. Taxa de fertilização e sobrevivência pré-eclosão

Os tratamentos com maiores concentrações de cortisol apresentaram as menores taxas de fertilização. O tratamento E2 apresentou diferença significativa na taxa de fertilização, mas não na sobrevivência pré-eclosão, quando comparado ao controle desse experimento (Tabela 2)

Tabela 2: Taxa de fertilização e sobrevivência pré-eclosão de 2007

2007							
Tratamentos	Taxa de fertilização				Sobrevivência pré-eclosão		
E1	71,7	±	6,3	A	73,6	±	4,8 A
E2	29,3	±	7,8	B	71,6	±	4,7 A

Valores apresentados como médias ± desvio padrão. Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$). $n = 10$.

O mesmo padrão de resultados pode ser observado no ano seguinte, onde os valores de taxa de fertilização e sobrevivência pré-eclosão encontrados nos tratamentos com cortisol foram significativamente menores que o controle (Tabela 3).

Tabela 3: Taxa de fertilização e sobrevivência pré-eclosão de 2008

2008							
Tratamentos	Taxa de fertilização				Sobrevivência pré-eclosão		
E3	75,9	±	2,4	A	87,6	±	2,9 A
E4	61,8	±	1,7	B	87,9	±	4,0 A
E5	61,1	±	3,6	B	69,9	±	7,1 B
E6	42,4	±	1,9	C	22,3	±	5,1 C

Valores apresentados como médias ± desvio padrão. Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$). $n = 10$

Além disso, pode-se observar uma possível relação de dose-dependência nos resultados da taxa de fertilização, pois com o aumento da quantidade de cortisol injetado nas fêmeas, ocorre também um decréscimo nos valores da taxa de fertilização (Tabelas 2 e 3).

4.3. Biometria na eclosão

Não houve diferenças no tempo de incubação dos ovos nos diferentes períodos experimentais e nas diferentes doses de cortisol usadas, sendo que após 12 horas de incubação, foram encontradas larvas eclodidas em todos os tratamentos.

No tratamento com maior dosagem de cortisol (E2), as larvas apresentaram as menores médias de comprimento e peso, porém o volume de saco vitelínico não diferiu do controle do mesmo experimento (E1), como apresentado na tabela 4.

Tabela 4: Biometria das larvas no momento da eclosão em 2007

2007 - Biometria da eclosão												
Tratamentos	Comprimento (mm)				Peso (g)				Volume do saco vitelino (µL)			
E1	2,94	±	0,33	A	0,00069	±	0,00003	A	0,53	±	0,09	A
E2	2,06	±	0,25	B	0,00067	±	0,00003	A	0,53	±	0,12	A

Valores apresentados como médias ± desvio padrão. Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$). $n = 10$.

Apesar dos diferentes experimentos terem sido realizados utilizando-se a mesma metodologia e os reprodutores serem provenientes do mesmo local, os resultados de um experimento para o outro variaram entre os anos, sendo que as médias do controle no ano seguinte apresentaram maiores valores (Tabelas 4 e 5).

Tabela 5: Biometria das larvas no momento da eclosão em 2008

2008 - Biometria da eclosão												
Tratamentos	Comprimento (mm)				Peso (g)				Volume do saco vitelino (µL)			
E3	3,81	±	0,21	AB	0,00088	±	0,00007	A	0,97	±	0,08	A
E4	3,81	±	0,21	AB	0,00095	±	0,00010	A	0,93	±	0,23	A
E5	3,60	±	0,17	B	0,00073	±	0,00004	B	0,69	±	0,04	B
E6	4,02	±	0,27	A	0,00095	±	0,00005	A	0,93	±	0,11	A

Valores apresentados como médias ± desvio padrão. Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$). $n = 10$.

Para o experimento realizado no primeiro experimental de 2007, os comprimentos das larvas dos grupos controle apresentaram resultados maiores do que as larvas de fêmeas tratadas. Porém, para o peso e para o volume do saco vitelino, as larvas tratadas apresentaram maiores valores comparadas ao controle (tabela 4).

Em 2008, as larvas de fêmeas tratadas com a maior dosagem de cortisol (E6 – 5 mg/kg) apresentaram a maior média para comprimento e peso, enquanto que o tratamento com 1 mg/kg, apresentou o menor resultado para todas as medidas avaliadas.

4.4. Biometria das Larvas

4.4.1. Comprimento

No período experimental de 2007 os resultados demonstraram que as larvas de fêmeas tratadas com cortisol apresentaram os menores valores de comprimento na eclosão e esses os valores se mantiveram estatisticamente abaixo da média do controle em quase todas as amostragens. Porém, 48h pós eclosão, as larvas tratadas e controle apresentaram valores médios de comprimento que não diferiam entre si (Figura 3).

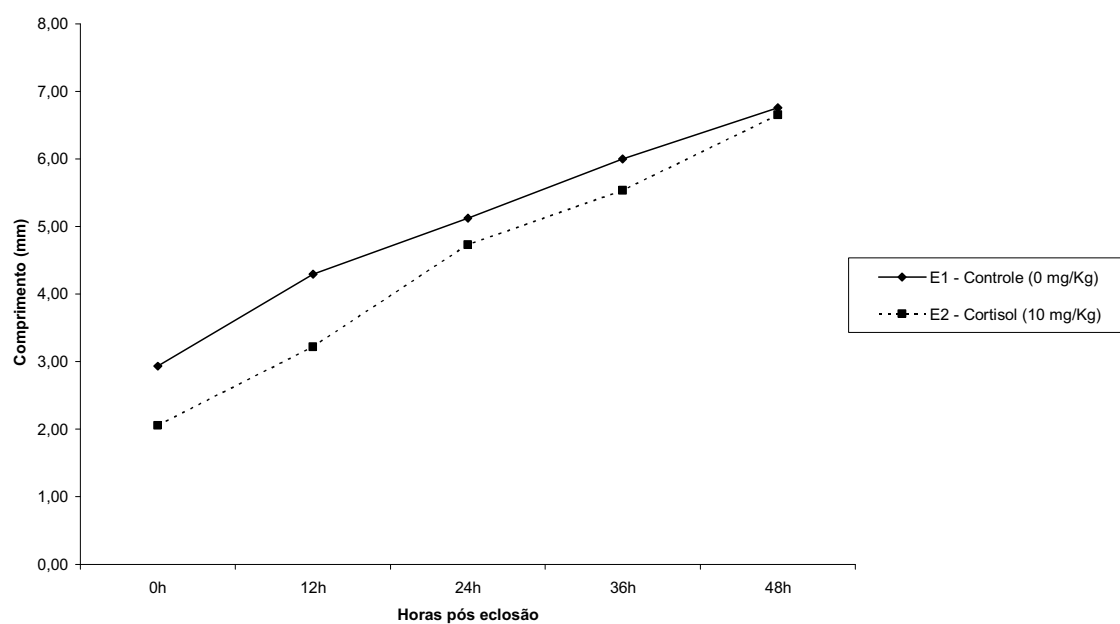


Figura 3: Comprimento das larvas do período experimental de 2007, nos diferentes tempos de amostragem. n = 10

No período experimental de 2008, na eclosão, as maiores larvas eram do E6, porém, ao longo das amostragens, larvas dos tratamentos E3 e E4 passaram a apresentar os maiores valores de comprimento. Somente nestes tratamentos, haviam larvas vivas no final das coletas (Figura 4).

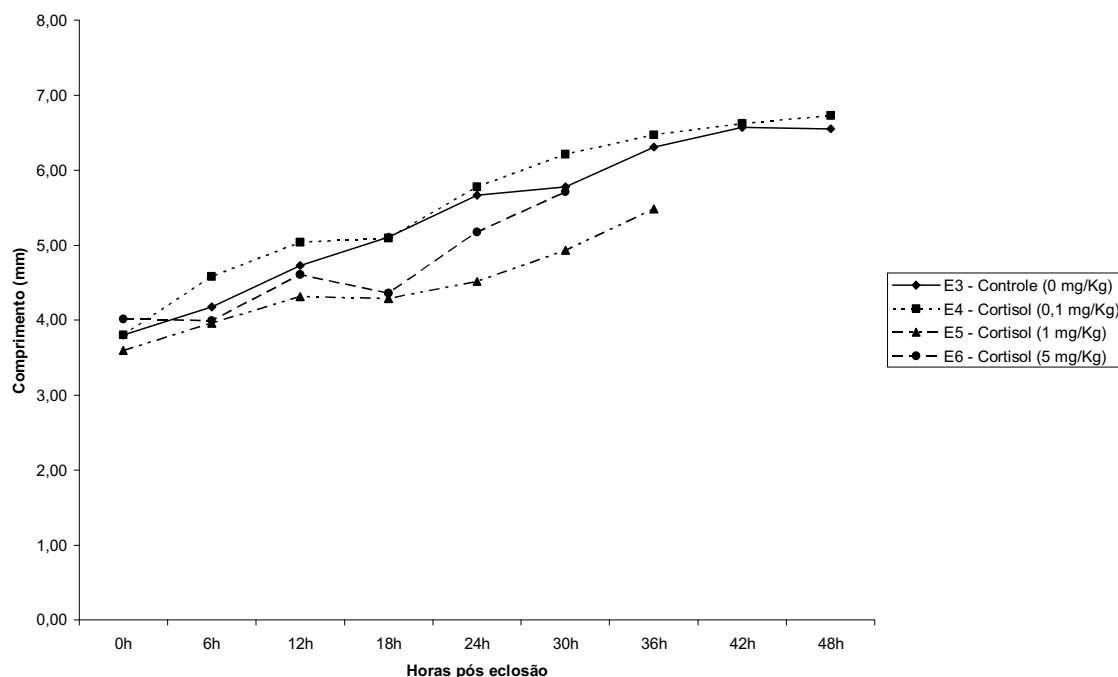


Figura 4: Comprimento das larvas do período experimental de 2008, nos diferentes tempos de amostragem. n = 10.

O tratamento E5 apresentou durante todo o experimento, as larvas com menor comprimento, que sobreviveram até 36h pós eclosão, enquanto que no tratamento E6 sobreviveram até 30h pós eclosão (Figura 4).

4.4.2. Peso

Novamente, no tratamento E2, com maior dosagem de cortisol (10 mg/kg), foram observados os menores valores de peso em quase todas as amostragens, porém, do momento da eclosão até as 12h pós eclosão, não ocorreram diferenças significativas, sendo que estas aparecem a partir da coleta de 24h e seguem até 48h pós eclosão (Figura 5).

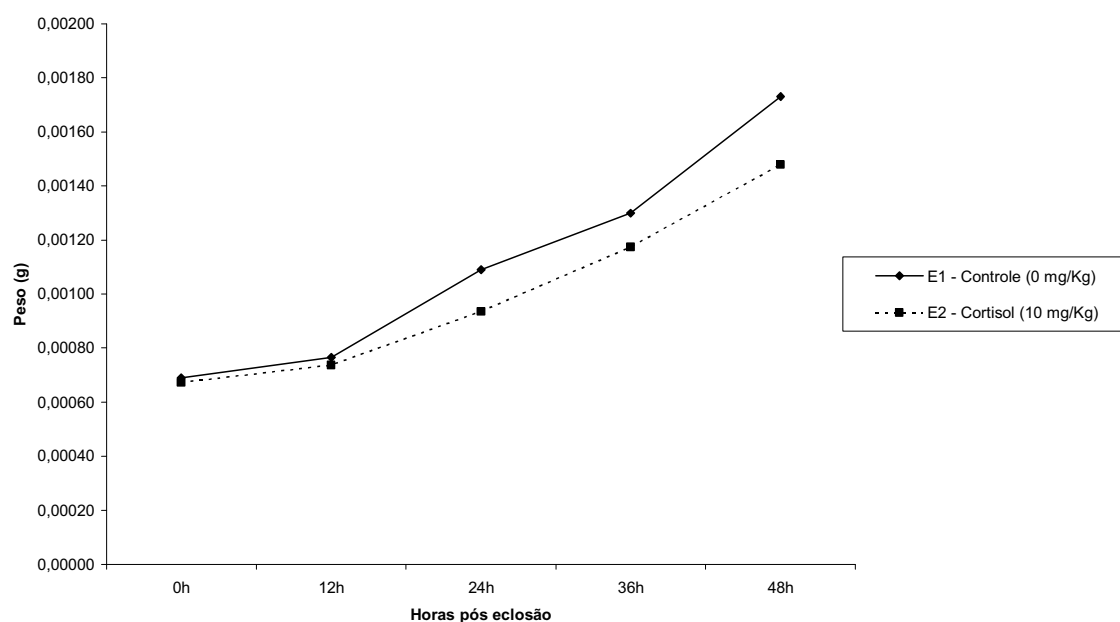


Figura 5: Peso das larvas do período experimental de 2007, nos diferentes tempos de amostragem. n = 10.

No experimento seguinte, no momento da eclosão, as larvas do E5 apresentaram os menores pesos, e este padrão se manteve ao longo das amostragens. As larvas do E5 sobreviveram até 36h pós eclosão, enquanto no tratamento E6 sobreviveram até 30h pós eclosão (Figura 6).

Nos tratamentos E3 e E4, as larvas apresentaram valores mais altos e sobreviveram até 48h pós eclosão, sendo que no tratamento E4, às 24h pós eclosão, as larvas apresentaram pesos maiores que no E3 (Controle), em várias amostragens, quase até o final da observação (Figura 6).

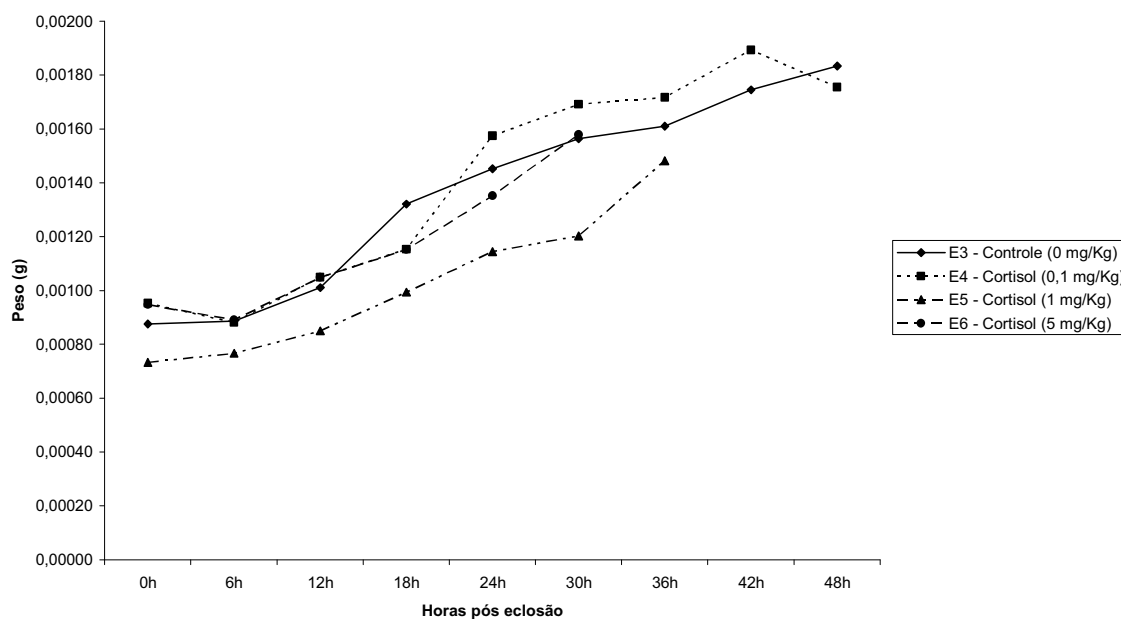


Figura 6: Peso das larvas do período experimental de 2008, nos diferentes tempos de amostragem. n = 10.

4.4.3. Volume do saco vitelino

O tempo de amostragem para o volume do saco vitelino das larvas foi reduzido para 36h, pois na amostragem de 48h pós eclosão ele estava muito reduzido ou era quase inexistente.

No experimento de 2007, tanto E1 quanto o E2, tiveram valores muito próximos em todas as amostragens, demonstrando então que não houve diferenças no volume do saco vitelínico no momento da eclosão e ambos os tratamentos tiveram perfis de absorção do vitelo muito parecidos (Figura 7).

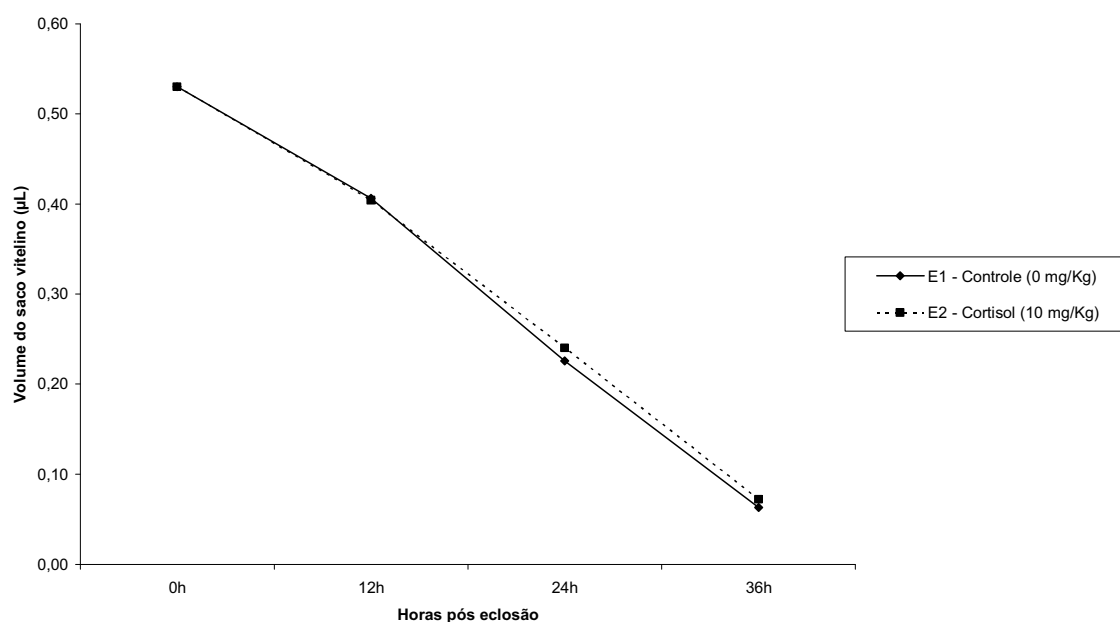


Figura 7: Volume do saco vitelino das larvas do período experimental de 2007, nos diferentes tempos de amostragem. n = 10.

Porém o mesmo não se repetiu no experimento de 2008, onde as larvas do tratamento E5 tiveram o menor volume do saco vitelínico no momento da eclosão.

Além disso, pode-se observar também que as larvas do E3 e E4, ou seja, controle e 0,1 mg/kg, até a amostragem de 24h, foram as que tiveram a maior diminuição no volume do saco vitelínico, indicando uma maior velocidade de absorção (Figura 8).

As larvas do tratamento E6 sobreviveram somente até o momento de 30h pós eclosão e por isso só foram amostradas até 24h pós eclosão.

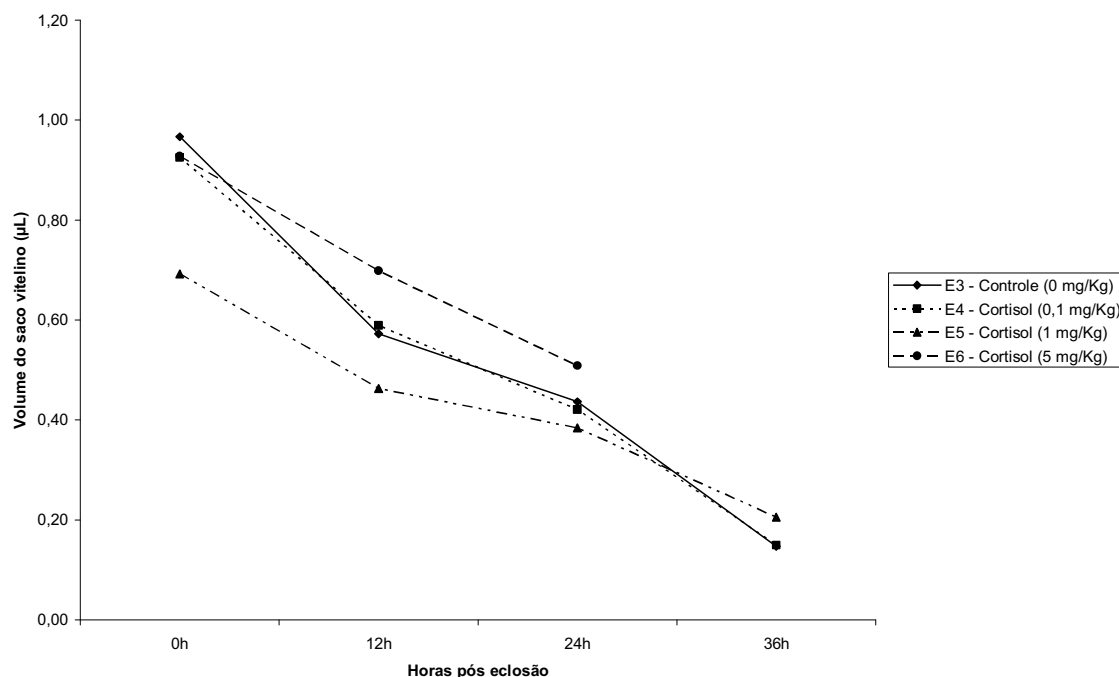


Figura 8: Volume do saco vitelino das larvas do período experimental de 2008, nos diferentes tempos de amostragem. n = 10.

4.5. Microscopia de ovos e embriões

4.5.1. Ovos 1h Pós-Fertilização (PF)

Os resultados dos diferentes períodos experimentais variaram em relação ao grupo controle. No controle E1 de 2007, os ovos analisados com 1h PF, possuíam a formação de blastodisco com blastômeros mal-formados e de tamanho irregular (Figura 9 – A). Já no controle E3 de 2008, o blastodisco já se encontrava em adiantado desenvolvimento se comparado ao controle do ano anterior e a todos os tratamentos com cortisol, onde se observa que já havia ocorrido uma grande proliferação celular (Figura 9 – B).

Os tratamentos com cortisol apresentavam o blastodisco menos desenvolvido que o tratamento controle E3, porém os blastômeros se mostravam de tamanhos

iguais (Figura 9 – C). O tratamento E6 foi o tratamento com cortisol que apresentou o estágio de desenvolvimento semelhante ao controle E3 (Figura 9 – D).

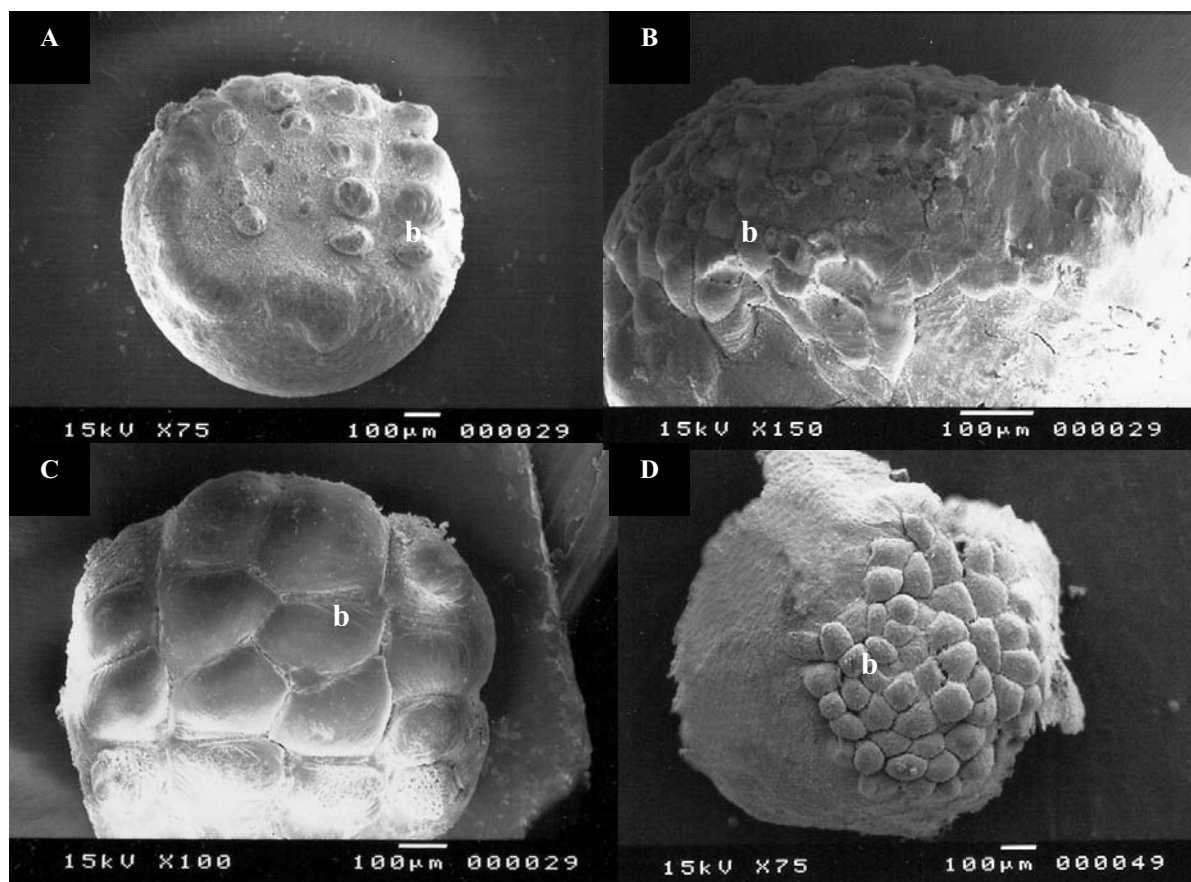


Figura 9: Ovos de *Brycon amazonicus* 1h PF. b – blastômeros.

4.5.2. Ovos 3h Pós-Fertilização (PF)

Após sucessivas divisões celulares, os ovos chegaram ao estágio de mórula, formada por camadas sobrepostas de blastômeros arranjados em um formato de “amora” (Figura 10 - A).

Nessa amostragem, já não houve diferenças entre os períodos experimentais, onde ambos os tratamentos controle, E1 e E3, apresentaram o estágio de mórula, com uma proliferação celular do pólo animal em direção ao pólo vegetativo, indicando o início da gastrulação, sendo que as células recobriam 1/3 do vitelo (Figura 10 – A e B).

Quase todos os ovos de fêmeas tratadas com cortisol estavam com um desenvolvimento semelhante ao encontrado nos grupos controles, no início da gastrulação, sendo que as células recobriam $1/3$ do vitelo. Porém o tratamento E5, com 1 mg/kg de cortisol, foi o único que se apresentou num estágio de desenvolvimento muito avançado em relação aos outros. Nele, a camada celular do pólo animal já havia avançado muito sobre o pólo vegetativo, onde o recobrimento já alcançava aproximadamente $3/4$ do vitelo (Figura 10 – C).

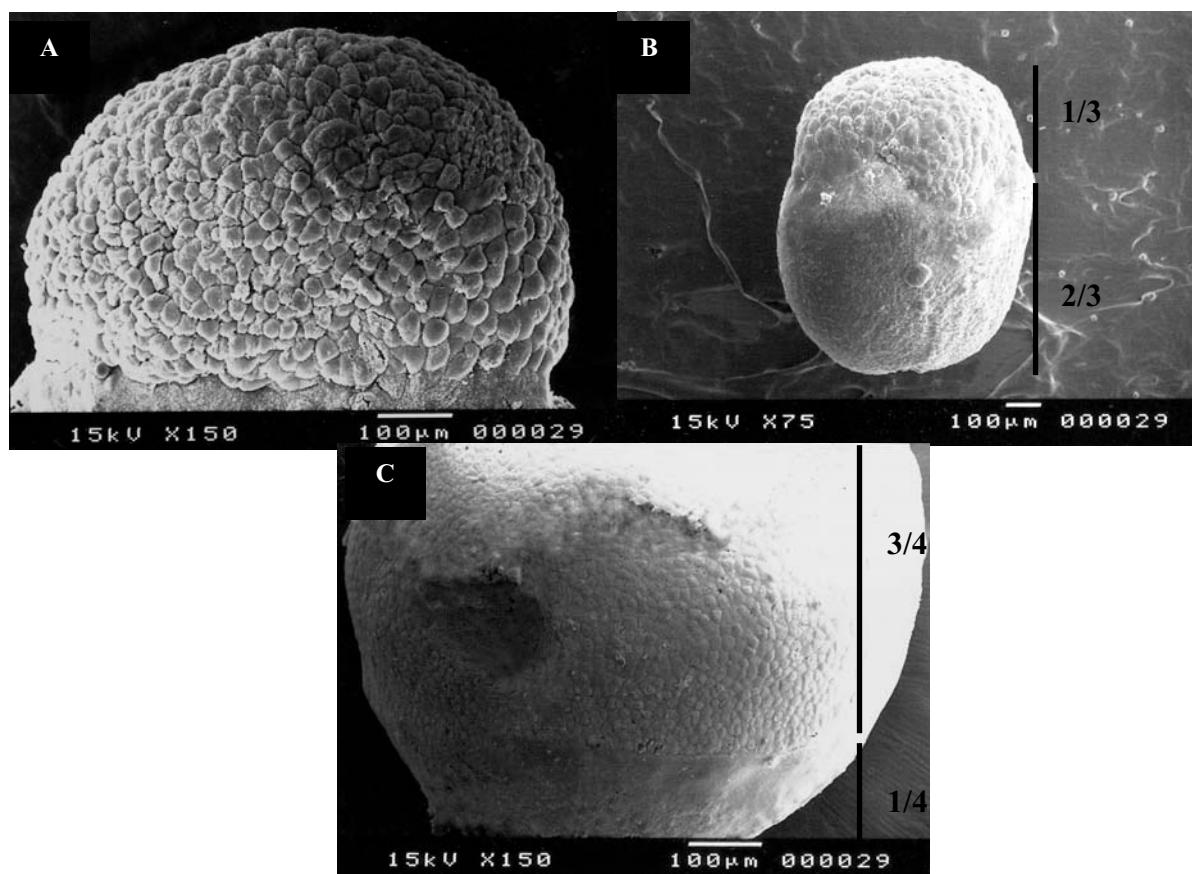


Figura 10: Ovos de *Brycon amazonicus* 3h PF.

4.5.3. Ovos 6h Pós-Fertilização (PF)

Houve diferenças entre os diferentes períodos experimentais. Os ovócitos coletados em 2007, controle e com tratamento com cortisol, apresentavam um menor estágio de desenvolvimento em relação aos ovos tratados com cortisol do experimento em 2008.

Os tratamentos E1 e E2, controle e 10 mg/kg de 2007, apresentaram também diferenças entre eles. O tratamento E1 apresentou um estágio menor de desenvolvimento, com a proliferação celular do pólo animal recobrindo aproximadamente 2/3 do vitelo (Figura 11 – A), enquanto o tratamento E2 apresenta quase a cobertura total, mas sem a formação completa do blastóporo (Figura 11 – B).

Porém os resultados de 2008 apresentam todos os tratamentos submetidos ao cortisol (E4, E5 e E6), independente da dose, num estágio mais desenvolvido, com o início da diferenciação das regiões cefálica, caudal e desenvolvimento do tubo neural (Figura 11 – C)

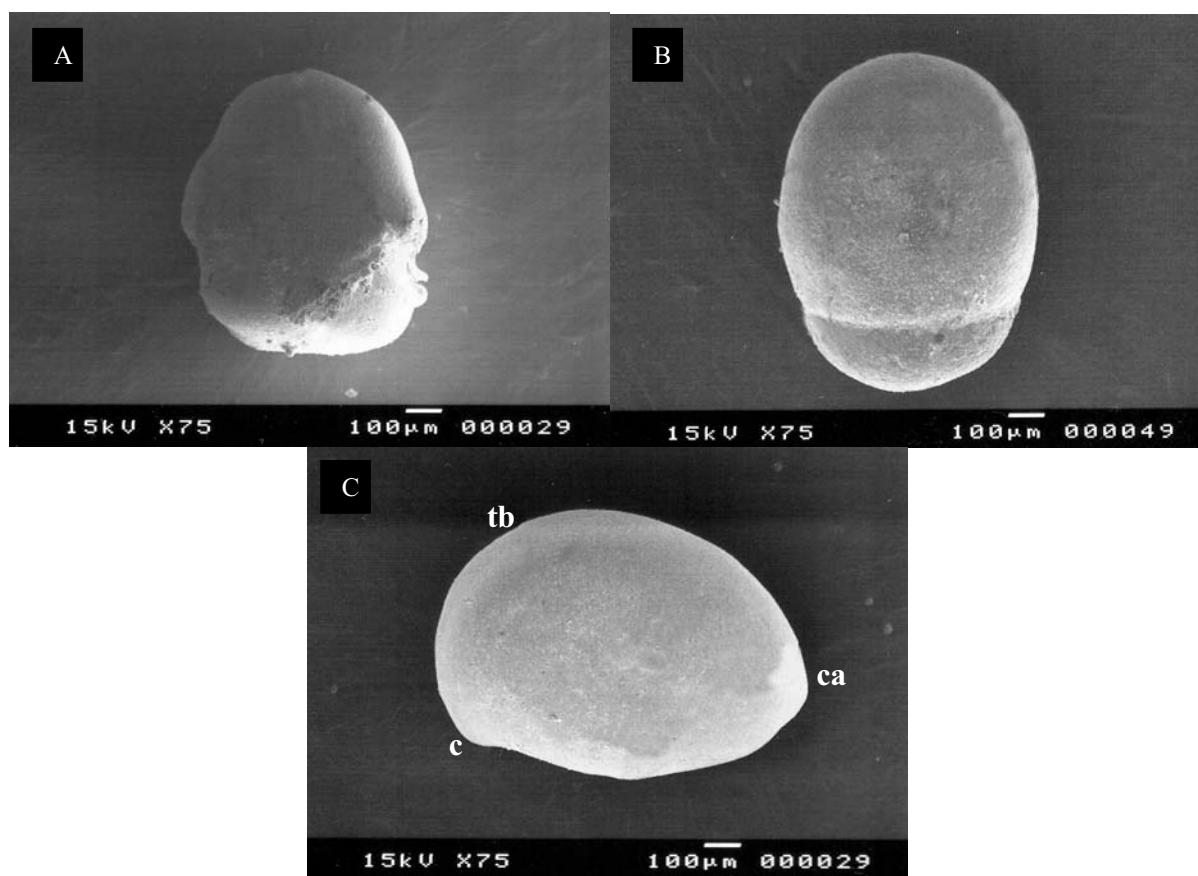


Figura 11: Ovos de *Brycon amazonicus* 6h PF. c – Região cefálica; tb – Tubo neural; ca – Região caudal.

4.5.4. Embrião 9h Pós-Fertilização (PF)

Não houve diferenças entre os períodos experimentais, porém houve diferenças entre os tratamentos controle em relação aos tratamentos com cortisol.

Os tratamentos E1 e E3 apresentaram com 9h PF, o início do desprendimento da cauda e o início do aparecimento dos somitos, estes ainda muito pouco visíveis (Figura 12 – A). Já os tratamentos E4 e E6 apresentaram um desenvolvimento mais adiantado, com o corpo mais alongado, somitos bem visíveis (8 – 12 pares) e a cauda maior e mais solta (Figura 12 – B).

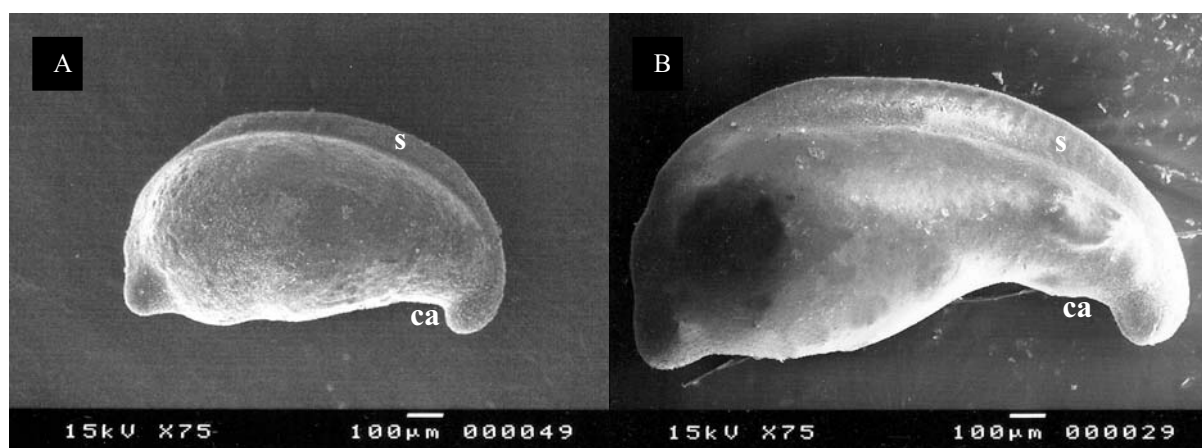


Figura 12: Embrião de *Brycon amazonicus* 9h PF. s- Somitos; ca – Região caudal.

O Tratamento E5 apresentou embriões nos dois estágios de desenvolvimento, porém a maioria se encontrava no estágio descrito para os grupos controle E1 e E3.

4.5.5. Embrião 12h Pós-Fertilização (PF)

Não houve diferenças entre os períodos experimentais, porém houve diferenças entre os tratamentos controle em relação aos tratamentos com cortisol e diferenças entre as doses de cortisol utilizadas.

Nesse momento, em todos os tratamentos, existiam as primeiras larvas recém eclodidas e estas se apresentavam com a cabeça voltada para baixo, aderida ainda

a região anterior do saco vitelínico, vesículas ópticas formadas, porém, indiferenciadas e com ausência total de nadadeiras.

Nos tratamentos controle, as larvas possuíam o corpo alongado e distendido (Figura 13 – A), porém nos tratamentos E4, E5 e E6, com cortisol, muitos embriões apresentavam deformidades como flexão da coluna vertebral (Figura 13 – B). Ainda nos tratamentos com cortisol, o tratamento E2, com 10 mg/kg, se encontrava num estágio menos avançado, com corpo a cauda livre do saco vitelínico, mas ainda pouco desenvolvida (Figura 13 – C).

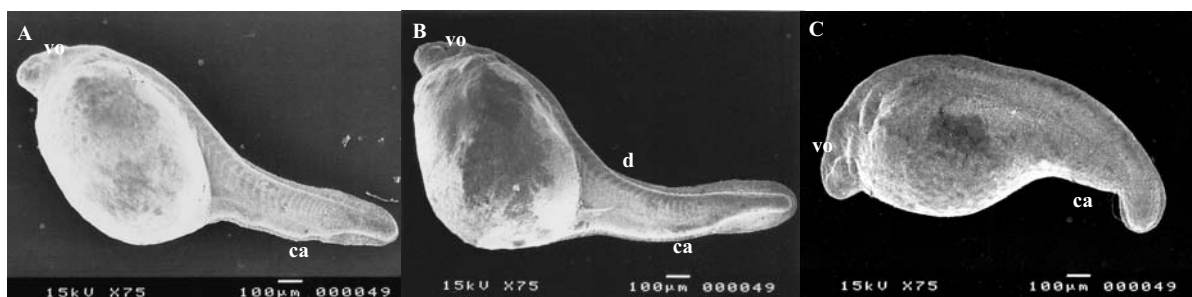


Figura 13: Embrião de *Brycon amazonicus* 12h PF. vo – vesícula óptica; ca – região caudal; d – deformidade (lordose)

4.6. Microscopia de Larvas

4.6.1. Larvas 12h Pós-Eclosão (PE)

As larvas com 12h PE não apresentaram diferenças entre os diferentes períodos experimentais e somente o tratamento E2, com 10 mg/kg de cortisol apresentou diferença no desenvolvimento.

As larvas apresentavam o início da delimitação entre a cabeça e a região anterior do saco vitelínico (Figura 14 – A, sc), desenvolvimento da musculatura corporal visível (Figura 14 – A, m) e da membrana embrionária (Figura 14 – A, me). Na região da cabeça, pode-se notar a placa olfatória (Figura 14 – B, po), a vesícula óptica em formato esférico e protuberante (Figura 14 – B, vo), o início da formação

do opérculo (Figura 14 – B, o) e arcos branquiais (Figura 14 – B, ac), porém ainda não nota-se a formação da nadadeira peitoral. A cavidade oral se encontrava aberta e com lábios formados, porém ainda não era notada a presença de dentes (Figura 14 – B, l). Os tratamentos com cortisol, E4 e E5 apresentavam um desenvolvimento idêntico ao descrito para os grupos controle, E1 e E3, mas com algumas larvas com deformidades.

O tratamento E2, com 10 mg/kg de cortisol, foi o que apresentou o menor estágio de desenvolvimento entre todos, com a cabeça ainda presa a região anterior do saco vitelínico, musculatura pouco visível e membrana embrionária pouco desenvolvida (Figura 14 – C). Na cabeça, pode-se observar que a vesícula óptica ainda não está muito protuberante, a cavidade oral esta pouco aberta e os lábios ainda pouco desenvolvidos (Figura 14 – D)

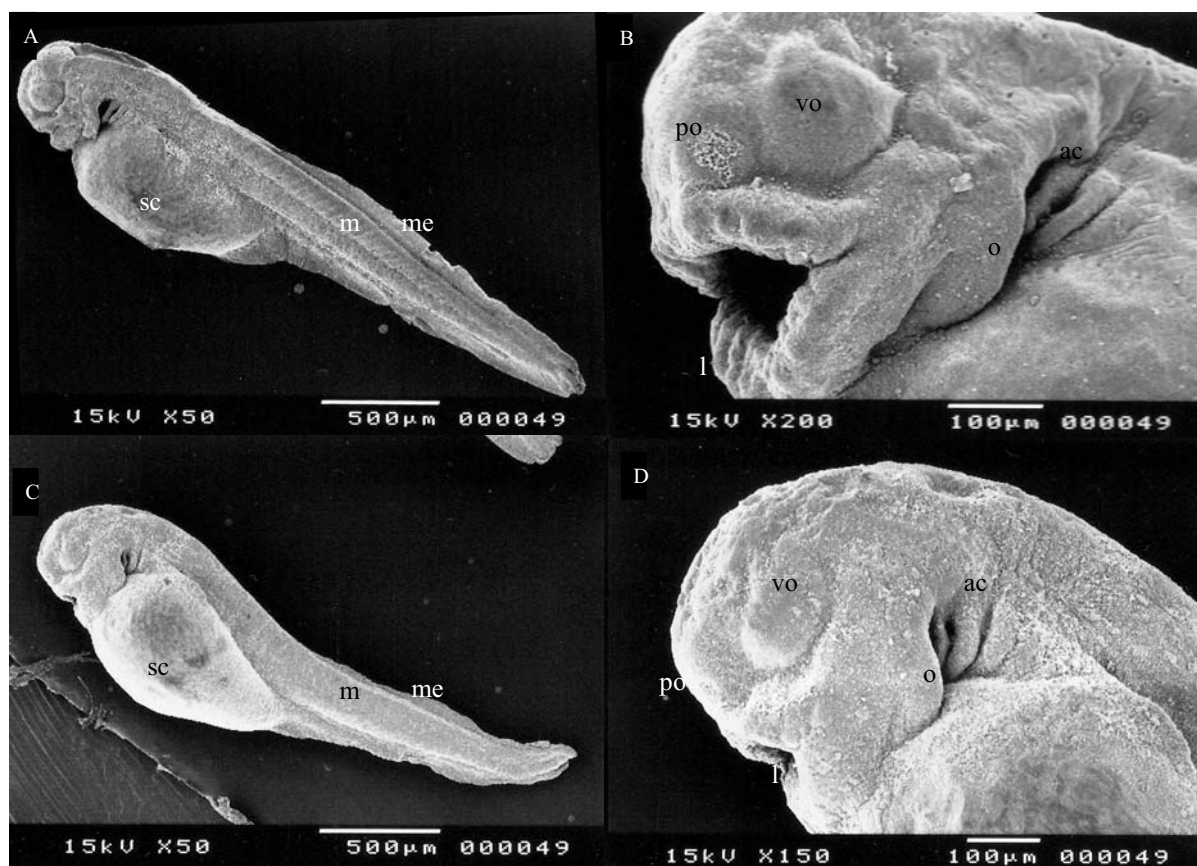


Figura 14: Larvas de *Brycon amazonicus* 12h PE. sc – saco vitelínico; m – musculatura; me – membrana embrionária; l – lábio; po – placa olfatória; vo – vesícula óptica, ac – arcos branquiais; o – opérculo.

O tratamento E6, com 5 mg/kg apresentou o maior número de larvas deformadas, onde muitas possuíam deformidades na formação das estruturas na cabeça e na coluna.

Na microscopia de luz, não foram encontradas diferenças entre os períodos amostrais e entre os tratamentos no desenvolvimento da região bucofaríngea no momento 12h PE.

Em todos os tratamentos, a cavidade bucofaríngea se encontrava aberta (Figura 15 – A, bf) e com lábios separados (Figura 15 – A, l), porém a região anterior do tubo digestório, que originará o esôfago, continuava fechada por uma membrana conjuntiva (Figura 15 – B, seta).

Observa-se também o início da formação dos olhos, já com a retina (Figura 15 – A, r) e a lente (Figura 15 – A, le) formadas, além das narinas ainda fechadas nas larvas (Figura 15 – A, po).

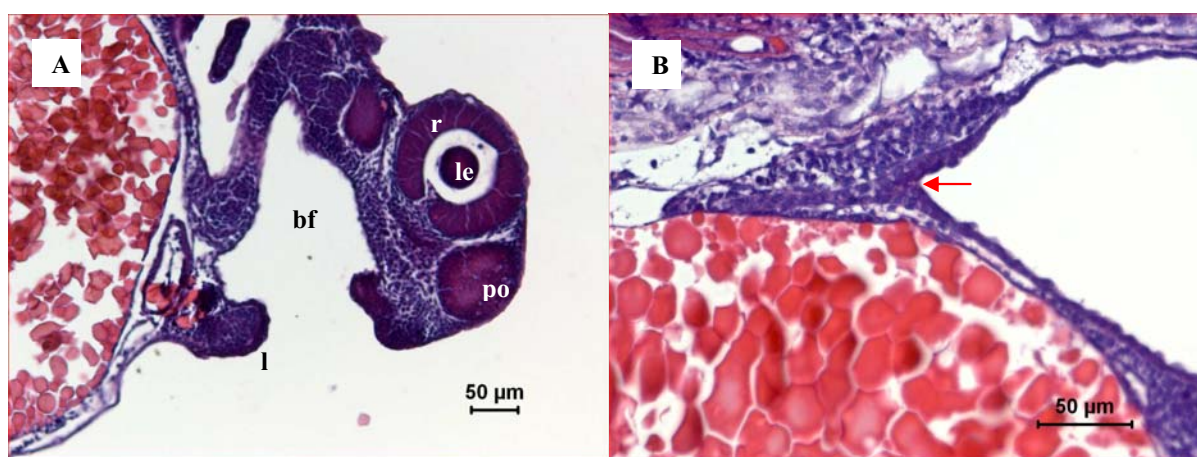


Figura 15: Corte da região anterior de Larvas de *Brycon amazonicus* 12h PE. bf – cavidade buço-faríngea; l – lábios; r – retina; le – lente; po – placa olfativa (narina).

Na região do intestino médio observa-se diferenças em relação aos tratamentos. As larvas provenientes do tratamento E2, com 10 mg/Kg de cortisol, apresentaram abertura do lúmen do intestino bem definida (Figura 16 – A, l) em

relação aos outros tratamentos (Figura 16 – B, l), tanto controle, como com doses menores de cortisol. É possível observar também a formação do rim em todos os tratamentos (Figura 16 – A e B, r).

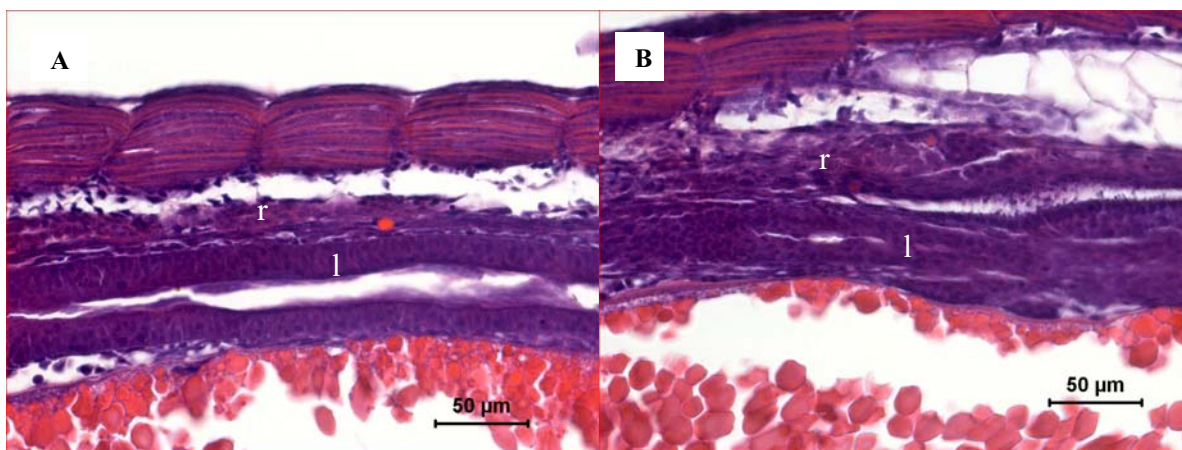


Figura 16: Corte da região do intestino de Larvas de *Brycon amazonicus* 12h PE. r – rim; l – lúmen.

4.6.2. Larvas 24h Pós-Eclosão (PE)

As larvas controle, E1 e E3 dos diferentes períodos experimentais não apresentavam diferenças com 24h PE, entretanto as larvas tratadas com cortisol apresentavam diferenças no desenvolvimento quando comparadas ao grupo controle e muitas deformidades.

Com 24h PE, as larvas dos grupos controle apresentavam redução do saco vitelínico (Figura 17 – A, sc), formação da abertura do ânus (Figura 17 – A, an) e início da formação da nadadeira caudal (Figura 17 – A, nc).

Na cabeça, pode-se observar o início da formação dos dentes na boca (Figura 17 – B, d), a abertura das narinas, revestida por cílios sensoriais (Figura 17 – B, po) e a vesícula óptica protuberante e bem desenvolvida (Figura 17 – B, vo). Nota-se também a formação do opérculo (Figura 17 – B, o) recobrindo quase

totalmente os arcos branquiais (Figura 17 – B, ac) e o início da formação da nadadeira peitoral (Figura 17 – B, np).

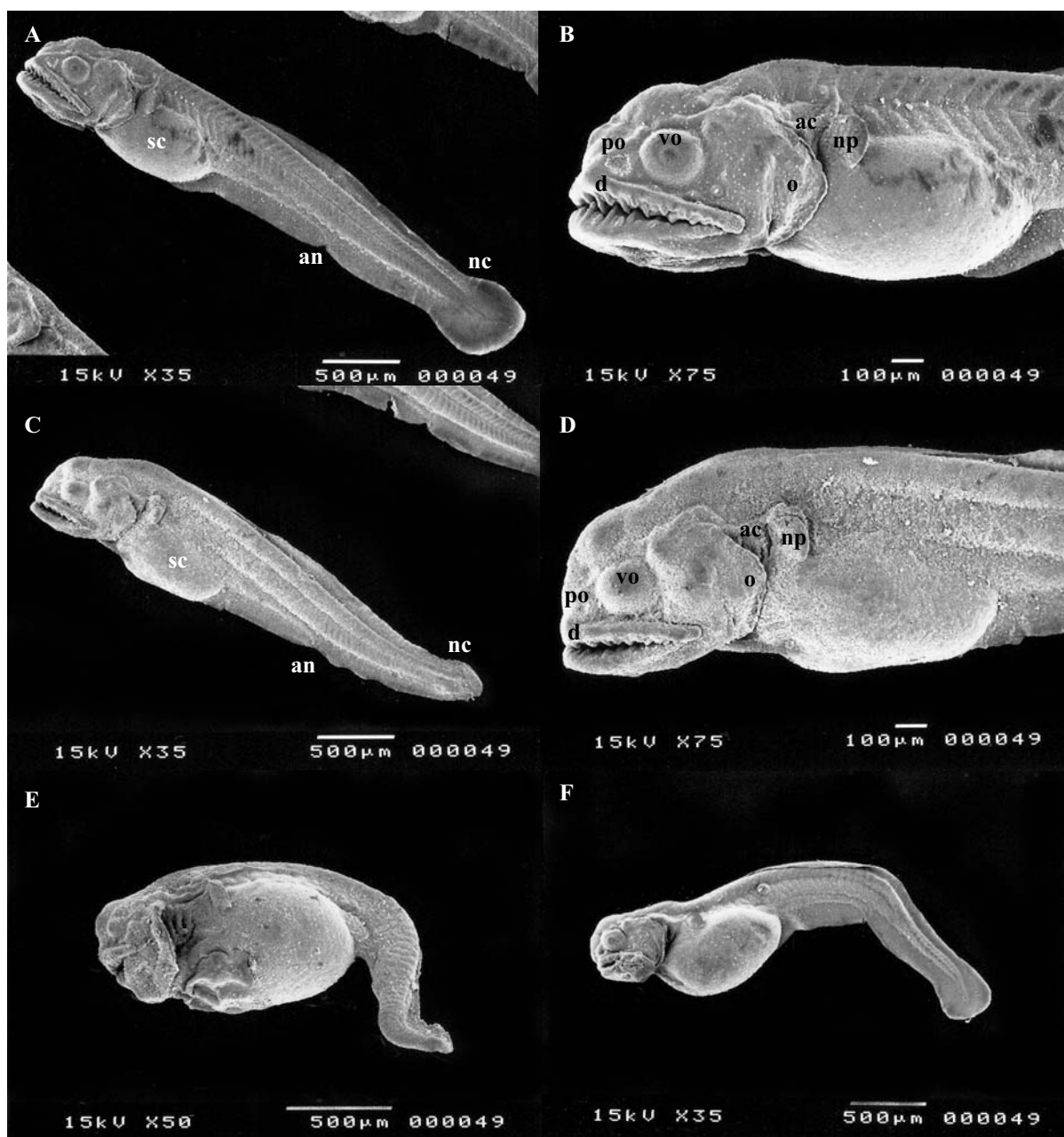


Figura 17: Larvas de *Brycon amazonicus* 24h PE. sc – saco vitelínico; an – ânus; nc – nadadeira caudal; d – dentes; po – placa olfativa; o – opérculo; ac – arcos branquiais; np – nadadeira peitoral.

Apenas as larvas do grupo E4, 0,1 mg/kg de cortisol, apresentaram desenvolvimento semelhante ao observado nas larvas controle. O tratamento E2, com 10 mg/kg de cortisol, apresentou as larvas menos desenvolvidas, sem a

completa formação da abertura anal (Figura 17 – C, an) e ainda sem o início do desenvolvimento da nadadeira caudal (Figura 17 – C, nc). Na cabeça, todas as estruturas observadas no grupo controle, também estavam presentes no grupo E2, porém, estas se encontravam menos desenvolvidas (Figura 16 – D).

Os tratamentos E5 e E6 (1 mg/kg e 5 mg/kg, respectivamente) apresentavam deformidades em todas as larvas observadas em microscopia eletrônica. Mal formações na cabeça e em suas estruturas (Figura 17 – E) e deformidades na coluna (Figura 17 – F) foram vistas em ambos os tratamentos.

Nos cortes observados na microscopia de luz, podemos observar o diferente desenvolvimento de algumas estruturas, entre os tratamentos controle e com cortisol.

Na cabeça, as estruturas que mais apresentaram diferenças no desenvolvimento foram a vesícula óptica e as narinas. Nos grupos controle, os olhos apresentavam uma maior diferenciação dos tecidos, com a lente (Figura 18 – A, le) e retina (Figura 18– A, r) mais bem formadas, além das narinas completamente abertas e com vários cílios sensoriais a recobrimdo (Figura 18– A, po).

Já os tratamentos com cortisol, apresentaram ainda um menor estágio de desenvolvimento dos tecidos dos olhos, com lente e retina ainda pouco desenvolvidos (Figura 18– B). As narinas já se encontravam abertas, porém a quantidade de cílios sensoriais que a revestiam (Figura 18– C, po) era bem menor quando comparado ao grupo controle.

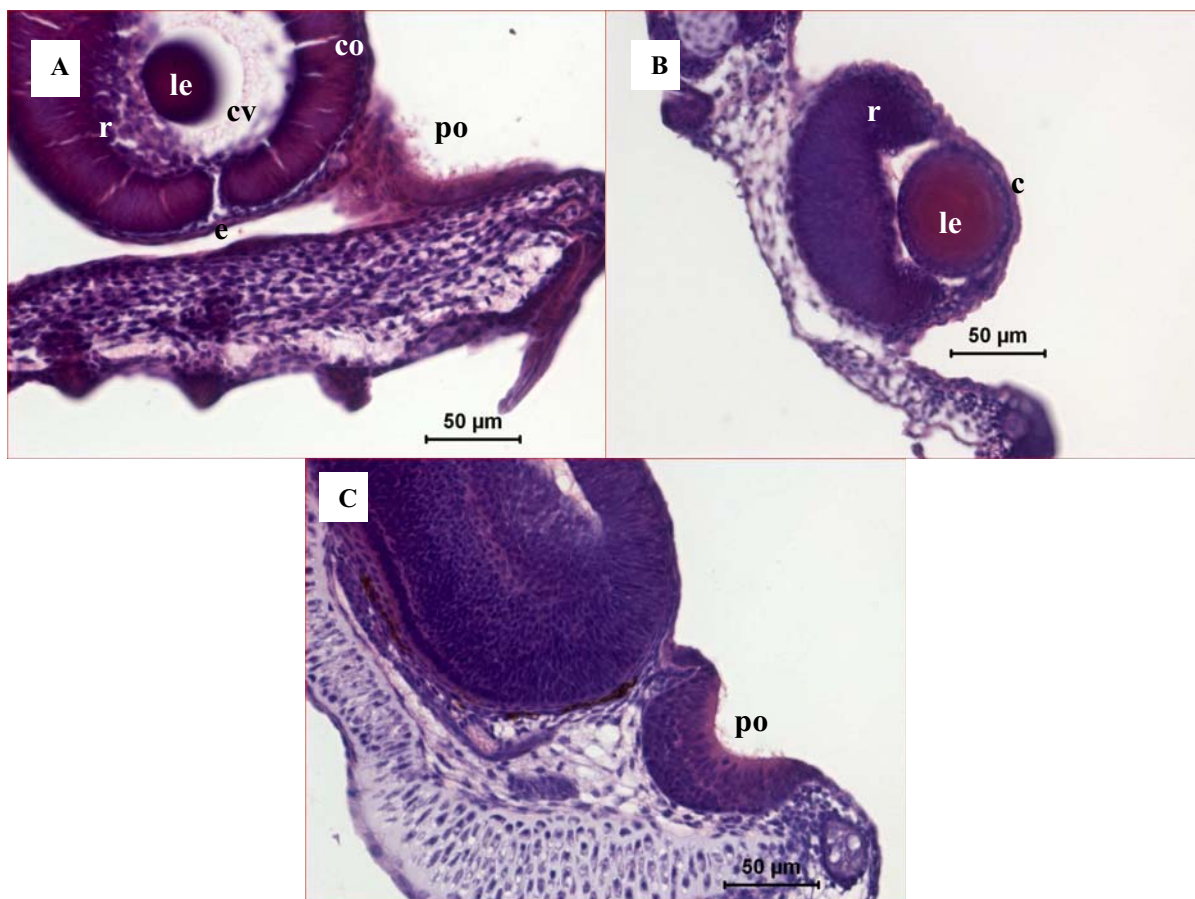


Figura 18: Corte da região anterior de *Brycon amazonicus* 24h PE. r – retina; cv – corpo vítreo; co – coróide; e – esclera; c – córnea; c – córnea;; le – lente; po – placa olfatória.

Nesse momento 24h PE, observou-se a região anterior do tubo digestório nos tratamentos controle (E1 e E3) e a menor dos de cortisol (E4 com 0,1 mg/kg) ainda fechada (Figura 19 – A, seta).

Porém, nos tratamentos com maior dosagem (E2, E5 e E6, com 10 mg/kg, 1 mg/kg e 5 mg/kg) a região anterior do tubo digestório estava encontrava-se em processo de abertura (Figura 19 – B, seta) e em alguns casos já aberta, formando o esôfago.

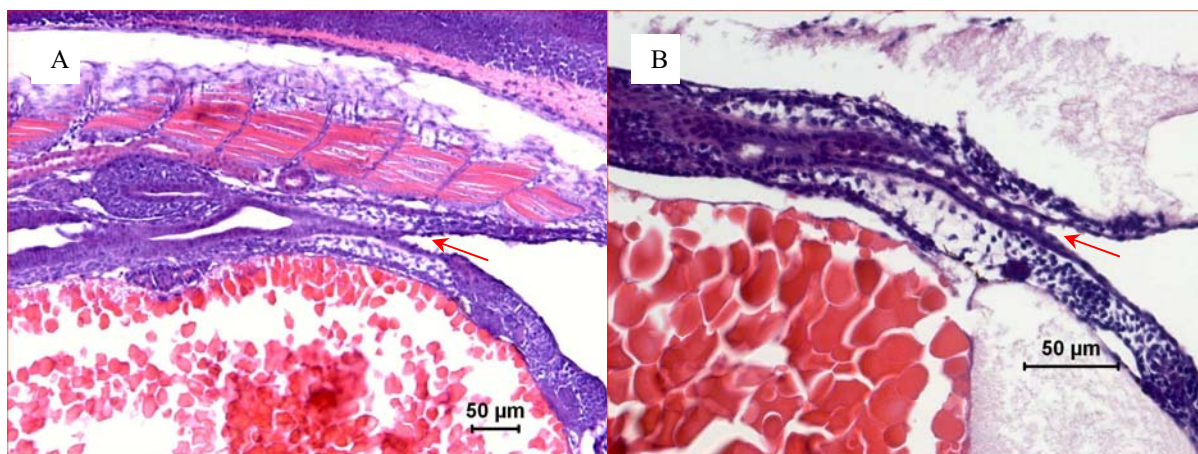


Figura 19: Corte da região do esôfago de *Brycon amazonicus* 24h PE. Seta – abertura do esôfago.

4.7. Cortisol plasmático das fêmeas reprodutoras

Os valores de cortisol plasmático encontrados nas fêmeas reprodutoras de matrinxã, antes da primeira indução hormonal e do tratamento com cortisol e no momento da extrusão da desova, são apresentados na tabela 6.

Tabela 6: Cortisol plasmático das fêmeas reprodutoras

Doses de cortisol	Cortisol plasmático (ng/mL)	
	Antes do tratamento	Após o tratamento
Controle	23,4	22,4
1 mg/Kg	22,4	26,1
5 mg/Kg	21,8	20,7
10 mg/kg	24,5	18,1

Os valores encontrados não apresentaram diferenças entre os momentos, mesmo após a administração intraperitoneal de cortisol. Mesmo nos tratamentos com maiores concentrações de cortisol, não foi detectado o aumento do cortisol plasmático no momento da extrusão dos ovos.

5. DISCUSSÃO

O cortisol influenciou negativamente a reprodução das fêmeas de matrinxã. Todas as fêmeas tratadas com cortisol apresentaram um menor sucesso na desova em relação às fêmeas não tratadas. No tratamento E6, ocorreu uma desova prematura, podendo estar relacionada a alta dose de cortisol utilizada nesse tratamento.

A influência deletéria do cortisol na reprodução é relatada em diversas espécies (CARRAGHER et al., 1989; CLEARWATER & PANKHURST, 1997; COWARD et al., 1998; PANKURST & VAN DER KRAAK, 2000; SCHRECK et al., 2001; MILLA et al., 2009), e dependendo da duração e da intensidade do estresse e da quantidade de cortisol envolvida, podem ocorrer em fêmeas de peixes a atresia folicular, avanço ou atraso na maturação dos ovos e ovulação, a diminuição do tamanho dos ovos, diminuição nas taxas de fertilização, eclosão e qualidade da progênie.

Em trutas arco-íris, o estresse agudo reduziu consideravelmente a qualidade dos ovos, visto que causou uma diminuição no tamanho dos ovos, na quantidade de vitelogenina incorporada e menor sobrevivência nas fases de incubação e larval (CAMPBELL et al., 1992). Já Carragher et al. (1989) demonstraram que o aumento artificial de cortisol em trutas marrom causou a diminuição na produção de outros hormônios como o 17- β estradiol (E2) e a testosterona, além da menor incorporação da vitelogenina nos ovos e da diminuição do peso das gônadas em fêmeas.

Além disso, todos os tratamentos com cortisol apresentaram também uma menor taxa de fertilização e menor sobrevivência pré-eclosão, sendo que o aumento progressivo da dose causou uma piora progressiva dos resultados, indicando uma relação de dose-dependência.

Esse fato pode estar diretamente ligado ao cortisol diminuir a produção de GTH-I e GTH-II (PANKHURST & VAN Der KRAAK, 1997; PANKHURST & VAN Der KRAAK, 2000) e consequentemente a produção do 17- β -estradiol, que influencia diretamente na síntese da vitelogenina, que ao ser incorporada aos ovócitos, se torna a principal fonte de nutrição no início do desenvolvimento do embrião, podendo influenciar na sobrevivência inicial (COPELAND et al., 1986; THOMAS, 1990, CAMPBELL et al., 1992).

Muitos estudos ainda questionam origem do cortisol e principalmente a habilidade de animais ainda em desenvolvimento possuírem completamente funcional o eixo hipotálamo – pituitária – interrenal, que possibilitaria a produção endógena e consequentemente a possibilidade de tecidos alvos sofrerem ação do cortisol.

Estudos em truta arco-íris no início do desenvolvimento mostraram que o eixo hipotálamo – pituitária – interrenal pode responder ao estresse por 14 dias, com secreção do cortisol (SUZUKI et al., 1997). Larvas de *Paralichthys dentatus* aos 21 dias pós-eclosão, ou seja, mesmo antes do início da metamorfose, já possuem o eixo hipotálamo – pituitária – interrenal totalmente funcional, controlando a produção de cortisol por meio de um mecanismo de feedback (VEILLETTE et al., 2007). O cortisol foi encontrado em larvas de *Sparus sarba*

com 1 dia após a eclosão e teve níveis crescentes até as larvas atingirem 7 dias após a eclosão, podendo esse aumento ser resultado de produção endógena desde essa fase inicial (DEANE & WOO, 2002). Especificamente para a espécie matrinxã, GANECO (2007) demonstrou que o eixo hipotálamo – pituitária – interrenal tem sua formação no período de 12 a 36 horas pós a eclosão.

Dessa forma, as alterações encontradas entre as larvas provenientes de fêmeas tratadas com diferentes doses de cortisol nas análises realizadas, realmente podem ser consideradas como efeito da transferência materna do hormônio.

Considerando os resultados obtidos para os parâmetros de desempenho das larvas, do momento da eclosão em diante, podemos ver que o cortisol causou na maioria dos tratamentos e momentos analisados, resultados inferiores aos encontrados para os grupos controle, no comprimento e peso principalmente. MATHIYALAGAN et al. (1996), estudando larvas de tilápia tratadas com concentrações crescentes de hidrocortisona, encontraram resultados positivos para o crescimento simultâneo do comprimento padrão, comprimento caudal, tamanho da cabeça e peso úmido, porém no grupo submetido à dose mais elevada houve retardamento no crescimento larval.

Esses resultados podem estar relacionados com as diferenças no desenvolvimento embrionário, pois em vários momentos, pode-se observar que os tratamentos com cortisol apresentaram estágios de desenvolvimento mais acelerados do que os controles e dos descritos em literatura.

NEUMANN (2008), trabalhando com a mesma espécie, descreveu que 1h pós fertilização, com incubação ocorrendo na temperatura média de 28,08 °C, já havia ocorrido as primeiras divisões dos blastômeros, onde eram observados 8 blastômeros. Nos tratamentos com cortisol, tratamentos como E6, com 5 mg/kg de cortisol, apresentaram uma quantidade maior de blastômeros, o que significava que já haviam ocorrido um maior numero de divisões celulares, quando comparados ao mesmo tempo de incubação descrito por NEUMANN (2008).

Com 3h pós fertilização, o tratamento E5, com 1 mg/kg de cortisol, foi o único que se apresentou num estágio de desenvolvimento muito avançado em relação aos outros. Nele, a camada celular do pólo animal já havia avançado muito sobre o pólo vegetativo, onde o recobrimento já alcançava aproximadamente 3/4 do vitelo. NEUMANN (2008) descreve que com 3h pós fertilização, foi verificada a proliferação de células com movimento divergente do pólo animal para o pólo vegetativo, indicando o inicio da epibolia e da fase de gastrulação, porém recobrando apenas 1/3 do vitelo neste momento.

Com 6h pós-eclosão, as diferenças entre alguns tratamentos controle e com cortisol foi ainda mais acentuada. O tratamento E1 apresentou um estágio de desenvolvimento compatível ao descrito por Neumann (2008) para ovos com 5h PF, com a proliferação celular do pólo animal recobrando aproximadamente 2/3 do vitelo, enquanto o tratamento E2 apresenta quase a cobertura total, mas sem a formação completa do blastóporo, descrita para a espécie no tempo de 6h PF (NEUMANN, 2008). Porém os tratamentos E4, E5 e E6, todos com cortisol,

no segundo período reprodutivo do experimento, independente da dose, se encontravam num estágio mais desenvolvido, com o início da diferenciação das regiões cefálica, caudal e desenvolvimento do tubo neural, fato que só foi observado para a espécie por NEUMANN (2008) às 7h PF.

O início do desprendimento da cauda e o início do aparecimento dos somitos, estes ainda muito pouco visíveis foram observados nos tratamentos controle E1 e E3, com 9h PF, resultados próximos aos descritos por NEUMANN (2008) para esta mesma espécie. Já os tratamentos E4 e E6 com cortisol, apresentaram um desenvolvimento mais adiantado, com o corpo mais alongado, somitos bem visíveis (8 – 12 pares) e a cauda maior e mais solta, o que só foi descrito por NEUMANN (2008) com 10h PF.

O cortisol além de diminuir a quantidade de vitelo nos ovos (CARRAGHER et al., 1989; CAMPBELL et al., 1992), quando associado a outros fatores que aceleram o desenvolvimento, como a temperatura, pode proporcionar larvas de menor peso e tamanho (ERIKSEN et al., 2007; ERIKSEN et al., 2006), além dessas larvas possuírem uma diminuição na velocidade de absorção e tamanho do saco vitelínico (ERIKSEN et al., 2006), como ocorreu com alguns tratamentos com cortisol.

Além disso, o cortisol pode diminuir as concentrações de T_3 (REDDING et al., 1986), sendo que este hormônio tem grande influencia no desenvolvimento inicial das larvas de matrinxã (VASQUES, 2003). Em anfíbios que possuem uma fase larva e sofrem metamorfose, semelhante a algumas espécies de peixes, também ocorre a liberação de corticosteróides, induzidas por estresse ambiental

(DENVER, 2009). Em tecidos alvo, os corticosteróides atuam juntamente com os hormônios tireoidianos, promovendo a metamorfose. Assim, o estresse ambiental pode aumentar a atividade dos dois eixos endócrinos, principais controladores da metamorfose, porém com custos alterações no crescimento e tamanho reduzido dos girinos em metamorfose (DENVER, 2009).

As larvas de fêmeas tratadas com cortisol apresentaram uma formação de lúmen e abertura da região anterior do tubo digestório mais precoce do que as tratadas com baixas doses ou não tratadas. Foi visto que o desenvolvimento inicial de larvas de *Polydactylus sexfilis*, submetidas a um tratamento por imersão numa solução de triiodotironina e cortisol, foi mais acelerado, principalmente na diferenciação do tubo digestório o que facilita a absorção dos nutrientes e implica num maior índice de sobrevivência (KIM & BROWN, 1997; BROWN & KIM, 1995).

Outro fator que pode ter influenciado na sobrevivência, foi o maior número de deformações causadas pelo cortisol. O cortisol pode causar um grande número de deformidade nas larvas (ERIKSEN et al., 2006; ERIKSEN et al., 2007). Pode-se notar que no momento 24h PE, já existia nos tratamentos com cortisol, grandes deformidades na boca e em atraso no desenvolvimento de estruturas sensoriais. No experimento de 2008, os tratamentos com maiores dosagens de cortisol não sobreviveram até 36h PE, momento esse muito próximo do início da alimentação das larvas de matrinxã, descrito entre 32 – 36 horas PE (BERNARDINO et al., 1993; LOPES et al., 1995, SENHORINI et al., 1998, VASQUES, 2003). Desse modo, as deformidades podem ter interferido no

momento crucial de ingestão de alimento exógeno pelas larvas, o que diminuiu a sobrevivência.

A elevação do cortisol plasmático pela técnica de administração por injeção intraperitoneal em peixes é descrita como funcional (MORGAN & IWAMA, 1996; WOJTASZEK et al., 2002). Em altas dosagens, como 200 mg/Kg de peixe vivo, injetadas em carpas, a concentração do cortisol plasmático dos peixes tratados atingiu valores 10 vezes maior quando comparados aos controles (WOJTASZEK et al., 2002). Mesmo a administração por outras vias, consideradas menos invasivas, como a alimentação com ração suplementada com cortisol, foi capaz de elevar consideravelmente os níveis de cortisol plasmático em matrinxãs (BRINN, 2003). Mesmo o método utilizado no presente estudo sendo reconhecidamente eficaz, os dados apresentados nos diferentes tempos de coleta e nas diferentes doses dos tratamentos não apresentaram diferenças. Segundo BRINN (2003), entre 12 e 24 horas após o aumento do cortisol, os peixes já apresentavam valores bem próximos dos valores iniciais. A diferença de tempo entre as coletas no presente estudo foi em média de 15 horas, o que poderia justificar os valores encontrados. Adicionalmente, é sabido que o “clearance” do cortisol é de 60 minutos (MOMMSEN et al., 1999), o que justificaria o desaparecimento do hormônio em altas concentrações na corrente sanguínea.

6. CONCLUSÕES

Com os resultados apresentados no presente estudo, pode-se concluir:

- Cortisol causa efeitos deletérios na reprodução de fêmeas de matrinxãs e no desenvolvimento de sua prole.
- Larvas de matrinxã sofreram alterações na formação de importantes órgãos e tecidos essenciais a sua sobrevivência por efeito do cortisol.
- Um manejo estressante durante a reprodução pode causar os mesmo efeitos observados, podendo este estudo servir de modelo para esse tipo de experimento.
- Mais estudos são necessários, principalmente sobre os mecanismos que envolvem a transferência materna do cortisol para os ovos.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

AYSON, F. G. The effect of stress on spawning of brood fish and survival of larvae of the rabbitfish, *Siganus guttatus* (Bloch). **Aquaculture**, v. 80, p. 241-246, 1989.

BARNES, P. J. How corticosteroids control inflammation. **British Journal of Pharmacology**. v. 148, p. 245–254, 2006.

BARRY, T. P.; MALISON, J. A.; HELD, J. A.; PARRISH, J. J. Ontogeny of the cortisol stress response in larval rainbow trout. **General and Comparative Endocrinology**, v. 97, p. 57- 65, 1995.

BARTON, B. A.; IWAMA, G. K. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. **Annual Review of Fish Diseases**. v. 1, p. 3-26, 1991.

BERNARDINO, G., SENHORINI, J. A., FONTES, N. A., BOCK, C. L., MENDONÇA, J. O. J. Propagação artificial do matrinxã, *Brycon amazonicus* (Gunther, 1869), (Teleostei, Characidae). **Boletim Técnico do CEPTA**, Pirassununga, v. 6, n.2, p.1-9, 1993.

BLAXTER, J. H. S. Development: eggs and larvae. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J. (eds.). **Fish Physiology**. New York: Academic Press, 1969. v. 3, p. 178-252.

BOBE, J.; LABBÉ, C. Egg sperm quality in fish. **General and Comparative Endocrinology**, in Press, 2009.

BOYD, C.E. **Water quality in warm water fish pond**. Alabama: Auburn University. 482p, 1990.

BRINN, R. P. **Cortisol exógeno em matrinxã (*Brycon cephalus*, Caracidae, Günter, 1869): variáveis fisiológicas na maturação final e crescimento inicial da**

prole. 2003. 43f. Tese (Doutorado em Aqüicultura) – Centro de Aqüicultura da UNESP, Jaboticabal, 2003.

BROWN, C. L.; KIM, B. G. Combined application of cortisol and triiodothyronine in the culture of larval marine finfish. **Aquaculture**, v.135, p.79-86, 1995.

CAMPBELL , P. M.; POTTINGER, T. G.; SUMPTER, J. P. Stress reduces the quality of gametes produced by rainbow trout. **Biology of Reproduction**. v. 47, p. 1140-1150, 1992.

CARRAGHER, J.; SUMPTER, J. P.; POTINGER, T. G; PICKERING, A. D. The deleterious effects of cortisol implantation on reproductive function in two species of trout, *Salmo trutta* L. and *Salmo gairdneri* Richardson. **General Comparative Endocrinology**. v. 76, p. 310-321, 1989.

CLEARWATER, S. J.; PANKHURST, N. W. The response to capture and confinement stress of plasma cortisol, plasma sex steroids and vitellogenic oocytes in the marine teleost, red gurnard. **Journal of Fish Biology**. v. 50, p. 429–444, 1997.

CONTRERAS-SANCHEZ, W. M.; SCHRECK, C. B.; FITZPATRICK, M. S.; PEREIRA, C. B. Effects of stress on the reproductive performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Biology of Reproduction**. V.58, p. 439–447. 1998.

COPELAND, P. A.; SUMPTER, J. P.; WALKER, T. K.; CROFT, M. Vitellogenin levels in male and female rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) at various stages of the reproductive cycle. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology**, v. 83, n. 2, p. 487-493, 1986.

COWARD, K.; BROMAGE, N.R.; LITTLE, D.C. Inhibition of spawning and associated suppression of sex steroid levels during confinement in the substrate-spawning *Tilapia zillii*. **Journal of Fish Biology**, v. 52, p.152–165, 1998.

DEANE, E. E.; WOO, N. Y. S. Ontogeny of thyroid hormones, cortisol, hsp70 and hsp90 during silver sea bream larval development. **Life Sciences**. v. 9153, p. 1-14, 2002.

de KLOET, E. R.; JOELS, M.; HOLLSBOER, F. Stress and the brain: from adaptation to disease. **Nature Reviews Neuroscience**. v. 6, p. 463–475, 2005.

de JESUS, E. G.; HIRANO, T. Changes in whole body concentrations of cortisol, thyroid hormone and sex steroids during early development of the chum salmon, *Oncorhynchus keta*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 85, p. 55-61, 1992.

de JESUS, E. G.; HIRANO, T.; INUI, Y. Changes in cortisol and thyroid hormone concentrations during early development and metamorphosis in the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 82, p. 369-376, 1991.

de JESUS, E.G.; INUI, Y.; HIRANO, T. Cortisol enhances the stimulating action of thyroid hormones on dorsal fin-ray resorption of flounder larvae in vitro. **General and Comparative Endocrinology**, v.79, p. 167–173, 1990.

DENVER, R. J. Stress hormones mediate environment-genotype interactions during amphibian development. **General and Comparative Endocrinology**. in Press, 2009.

ERIKSEN, M. S.; ESPMARK, A.; BRAASTAD, B. O. ; SALTE, R.; BAKKEN, M. Long-term effects of maternal cortisol exposure and mild hyperthermia during embryogeny on survival, growth and morphological anomalies in farmed Atlantic salmon *Salmo salar* offspring. **Journal of Fish Biology**, v. 70, p. 462–473, 2007.

ERIKSEN, M. S.; BAKKEN, M. ; ESPMARK, A.; BRAASTAD, B. O. ; SALTE, R.; Prespawning stress in farmed Atlantic salmon *Salmo salar*: maternal cortisol exposure and hyperthermia during embryonic development affect offspring survival,

growth and incidence of malformations. **Journal of Fish Biology**, v. 69, p. 114–129, 2006.

FOO, J. T.; LAM, T. J. Retardation of ovarian growth and depression of serum steroid levels in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*, by cortisol implantation. **Aquaculture**, v. 115, p. 133-143, 1993.

GANECO, L. N. **Ontogenia da resposta endócrina em larvas de matrinxã *Brycon amazonicus*. Ênfase nos eixos hipófise-tireóide e hipófise-tecido interrenal**. 2007. 109f. Tese (Doutorado em Aqüicultura) – Centro de Aqüicultura da UNESP, Jaboticabal, 2007.

HWANG, P.; WU, S.; LIN, J.; WU, L. Cortisol content of eggs and larvae of teleosts. **General and Comparative Endocrinology**, v. 86, p. 189-196. 1992.

KIM, B. G.; BROWN, C. L. Interaction of cortisol and thyroid hormone in the larval development of the pacific threadfin. **American Zoologist**. v. 37, p. 468-479, 1997.

LOPES R. N. M.; SENHORINI, J. A.; SOARES, M. C. F., Crescimento e sobrevivência de larvas de matrinxã *Brycon cephalus* Gunther, 1869, (Pisces, Characidae) sob diferentes dietas alimentares. **Boletim Técnico do CEPTA**, Pirassununga, v.7, p.41-48, 1994.

MATHIYALAGAN, P. K.; REDDY, P. K.; LAM, T. J. Effects of cortisol on growth and development in tilapia larvae, *Oreochromis mossambicus*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 15, n. 6, p. 453-458, 1996.

MILLA, S.; WANG, N.; MANDIKI, S. N. M.; KESTEMONT, P. Corticosteroids: Friends or foes of teleost fish reproduction? Comparative **Biochemistry and Physiology, Part A**, v. 153, p. 242–251, 2009.

MOMMSEN, T. P.; VIJAYAN, M. M.; MOON, T. W. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action and metabolic regulation, **Fish Biology and Fisheries**, v. 9, p.211-268, 1999.

MORGAN, J.D., IWAMA, G.K. Cortisol induces changes in oxygen consumption and ionic regulation in coastal cutthroat trout (*Oncorhynchus clarki clarki*) parr. **Fish Physiology and Biochemistry**. v. 15, n. 5, p. 385-394, 1996.

MYLONAS, C. C.; FOSTIER, A.; ZANUY, S. Brodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. **General and Comparative Endocrinology**, in Press, 2009.

NEUMANN, E. **Desenvolvimento inicial de Jatuarana *Brycon amazonicu* (Teleostei, Characidae)**. 2008. 108f. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura da Unesp, Jaboticabal, 2008.

OKUMURA, S., OKAMOTO, K., OOMORI, R., NAKAZONO, A. Spawning behavior and artificial fertilization in captive reared red spotted grouper, *Epinephelus akaara*. **Aquaculture**. v. 206, p. 165–173, 2002

PANKURST, N. W.; VAN DER KRAAK, G. Evidence that acute stress inhibits ovarian steroidogenesis in rainbow trout in vivo, through the action of cortisol. **General and Comparative Endocrinology**. v. 177, p. 225-237, 2000.

PANKURST, N. W.; VAN DER KRAAK, G. Effects of stress on reproduction and growth of fish In: Iwana, G. K.; Pickering, A. D.; Sumpter, J. P.; Schreck, C. B. **Fish stress and health in aquaculture**. New York: Cambridge Press, 1997. p. 74-93.

PANKURST, N. W.; VAN DER KRAAK, G.; PETER, R. E. Evidence that the inhibition effects of stress on reproduction in teleost fish are not mediated by the action of cortisol on ovarian steroidogenesis. **General and Comparative Endocrinology**. v. 99, p. 249-257, 1995.

PÉREZ-DOMÍNGUES, R.; HOLT, G. J. Interrenal and thyroid development in red drum (*Sciaenops ocellatus*): Effects of nursery environment on larval growth and cortisol concentration during settlement. **General and Comparative Endocrinology**. v. 146, p. 108-118, 2006.

PICKERING, A. D. Introduction: the Concept of Biological Stress. In: **Stress and fish**. Edited by Pickering A.D. Academic Press, 1981, v. 1, p. 1-10.

REDDING, J. M.; DELUZE, A.; LELOUP-HATEY, J.; LELOUP, J. Suppression of plasma thyroid hormone concentrations by cortisol in the European eel *Anguilla anguilla*. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 83, n. 3, p. 409-413, 1986.

SAMPATH-KUMAR, R.; LEE, S. T. L.; TAN, C. H.; MUNRO, A. D.; LAM, T. J. Biosynthesis in vivo and excretion of cortisol by fish larvae. **Journal of Experimental Zoology**, v. 277, p. 337-344, 1997.

SCHRECK, C.B., CONTRERAS-SANCHEZ, W., FITZPATRICK, M.S. Effects of stress on fish reproduction, gamete quality, and progeny. **Aquaculture**. v. 197, p. 3–24, 2001.

SCHULZ, R. W.; VISCHER, H. F.; CAVACO, J. E. B.; SANTOS, E. M.; TYLER, C. R.; GOOS, H. J. T.; BOGERD, J. Gonadotropins, their receptors, and the regulation of testicular functions in fish. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology**. v. 129, p. 407-417, 2001.

SEILER, K.; SEILER, R.; CLAUS, R.; STERBA, G. Spectrophotometric analyses of hydroxysteroid dehydrogenase activity in presumed steroid producing tissues of brook lamprey (*Lampetra planeri*) in different developmental stages. **General and Comparative Endocrinology**, v. 51, p. 353-363, 1983.

SENHORINI, J.A.; MANTELATTO, F.L.M.; CASANOVA, S.M.C. Growth and survival of larvae of Amazon species "matrinxã", *Brycon cephalus* (Pisces, Characidae), in larvicultura ponds. **Boletim Técnico do CEPTA**. v.11, p. 13-28, 1998.

STOUTHART, A. J.; LUCASSEN, E. C.; VAN STRIEN, F. J.; BALM, P. H.; LOCK, R. A. C.; WENDELAAR BONGA, S. E. Stress responsiveness of the pituitary-interrenal axis during early life stages of common carp (*Cyprinus carpio*). **Journal of Endocrinology**, v. 157, p. 127-137, 1998.

SUZUKI, M.; BENNETT, P.; LEVY, A.; BAKER, B. Expression of MCH and POMC genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during ontogeny and in response to early physiological challenges. **General and Comparative Endocrinology**, v. 107, p. 341-350, 1997.

SZISCH, V.; PAPANDROULAKIS, N.; FANOURLAKI, E.; PAVLIDIS, M. Ontogeny of the thyroid hormones and cortisol in the gilthead sea bream, *Sparus aurata*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 142, p. 186-192, 2005.

THOMAS, P. Teleost model for studying the effects of chemicals on female reproductive endocrine function. **Journal of Experimental Zoology, The - Supplement**, v. 4, p. 126-128, 1990.

URBINATI, E. C.; CARNEIRO, P. C. F. Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura. In: CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C.; FRACALLOSSI, D. M.; CASTAGNOLLI, N. **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt, 2004. v. 1, p. 171-193.

VASQUES, L. H. Participação do hormônio triiodotironina (T3) no desenvolvimento inicial do matrinxã *Brycon cephalus*. 2003. 146f. Tese (Doutorado em Aquicultura) - Centro de Aquicultura da UNESP, Jaboticabal, 2003.

VEILLETTE, P. A.; SERRANO, X.; GARCIA, M. M.; SPECKER, J. L. Evidence for the onset feedback regulation of cortisol in larval Summer flounder. **General and Comparative Endocrinology**, v. 154, p. 105-110, 2007.

WENDERLAAR BONGA, S. E. The stress response in fish. **Physiological Reviews**, v. 77, n. 3, p. 791-825, 1997.

WITT, E. M.; LAIDLEY, C. W.; LIU, K. K. M.; HIRANO, T.; GRAU, E. G. Correlation between environmental iodine concentrations and larval growth, survival, and whole body concentrations of thyroid hormones and cortisol in pacific threadfin (*Polydactylus sexfilis*). **Aquaculture**. v. 289, p. 357-364, 2009.

WOJTASZEK, J., DZIEWULSKA-SZWAJKOWSKA, D., LOZINSKA-GABSKA, M., ADAMOWICZ, A., DZUGAJ, A., Hematological effects of high dose of cortisol on the carp (*Ciprinus carpio* L.): cortisol effect on the carp blood. **General and Comparative Endocrinology**. v. 125, p. 176-183, 2002.

WOYNAROVICH, E.; HORVARTH, L., **A propagação artificial de peixes de águas tropicais: manual de extensão**. FAO/CODEVASF/CNPq, 1983.