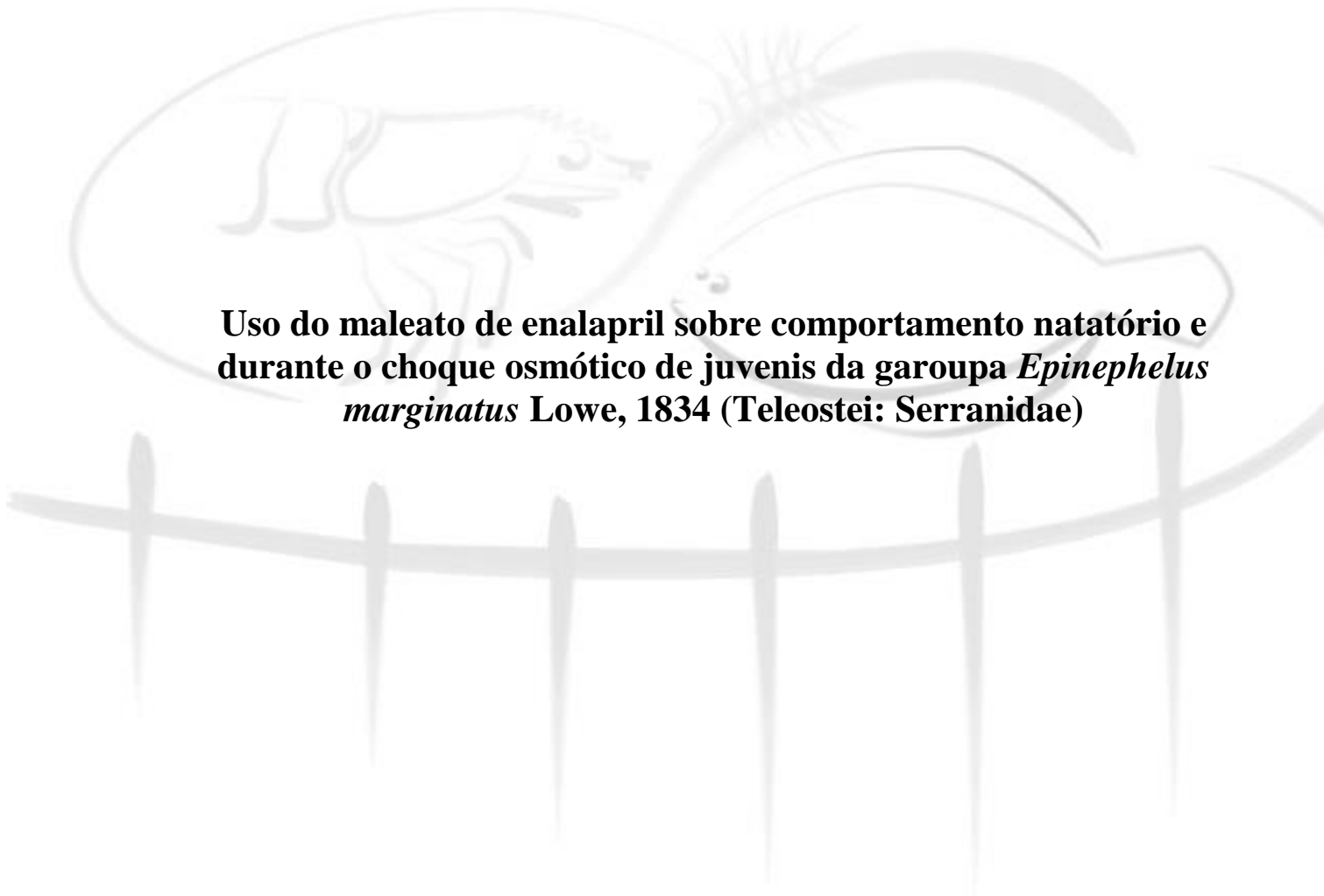


UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG

INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA – IO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA



Uso do maleato de enalapril sobre comportamento natatório e durante o choque osmótico de juvenis da garoupa *Epinephelus marginatus* Lowe, 1834 (Teleostei: Serranidae)

Bruna Ferraz Corrêa

Rio Grande

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG

INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA – IO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

Uso do maleato de enalapril sobre comportamento natatório e durante o choque osmótico de juvenis da garoupa *Epinephelus marginatus* Lowe, 1834 (Teleostei: Serranidae)

BRUNA FERRAZ CORRÊA

Dissertação apresentada no Programa de Pós-graduação em Aquicultura no Instituto de Oceanografia da Universidade Federal do Rio Grande com o objetivo de obter o título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Luis Alberto Romano

Rio Grande

Setembro de 2014

Índice

1. Introdução.....	1
1.1. Produção da garoupa <i>Epinephelus marginatus</i> (Lowe, 1834) (Teleostei: Serranidae).....	1
1.2. Estresse em peixes teleósteos.....	2
1.3. Sistema Renina Angiotensina em Peixes Teleósteos.....	4
1.4. Inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina I (IECAI).....	5
1.4.1. Maleato de Enalapril.....	6
1.5. Justificativa.....	6
2. Objetivos.....	7
2.1. Objetivo geral.....	7
2.2. Objetivos específicos.....	7
3. Uso do maleato de enalapril sobre comportamento e choque osmótico em garoupas <i>Epinephelus marginatus</i> Lowe, 1834 (Teleostei:Serranidae).....	8
4. Conclusões gerais.....	26
5. Referências.....	27

Agradecimentos

A Deus por tudo;

A minha família e meus bichinhos pela motivação, carinho e apoio tanto nos momentos tristes quanto felizes;

A Universidade Federal do Rio Grande, ao Instituto de Oceanografia e ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura pela oportunidade de fazer o Mestrado nesta instituição;

A CAPES tanto pela bolsa de demanda social quanto pela PROAP e taxa de bancada;

Ao Prof. Dr. Ricardo Berteaux Robaldo por recomendar o Programa de Pós-graduação em Aquicultura além de toda a ajuda e colaboração;

Ao Prof. Dr. Luis Alberto Romano por ser meu orientador;

Ao Laboratório de Piscicultura Marinha e Estuarina por terem me dado tanto a oportunidade de aprendizado em rotina e me ajudar durante todo o meu mestrado;

Ao Laboratório de Imunologia e Patologia de Organismos Aquáticos por me ajudarem durante todo o meu mestrado e colaboração;

Ao Laboratório Particular pelo processo das análises e a Diretora de Cinema de Buenos Aires Florencia Romano pela colaboração no processo das imagens e que sem isto eu não teria a Dissertação;

Aos Profs. Ana Maria Volker Azambuja e Paul Gerard Kinas pelo auxílio estatístico;

Ao Prof. Ma. Luis André Luz Barbas e ao Dr. Ricardo Vieira Rodrigues pela ajuda e colaboração;

A Ma. Maria Angélica Reis Garrido-Pereira pela colaboração durante meu mestrado;

Aos Colegas de Mestrado e Doutorado pela ajuda, ouvidos, carinho e atenção;

Ao Pessoal do Alojamento por me acolherem durante meu experimento e pela amizade;

Aos Funcionários por me deixarem minha vida mais agradável;

Aos Amigos de Pelotas, aos amigos do Morro Redondo, aos amigos da UFPel, ao CAP e ao NAE da FURG pela amizade, carinho e apoio tanto nos momentos felizes quanto tristes;

E as pessoas que me motivaram a mudar de linha de pesquisa e entusiasмам minha vida, Muito obrigada.

Resumo

A garoupa (*Epinephelus marginatus* Lowe, 1834) é uma espécie de peixe marinho que apresenta rápido crescimento e durante seu ciclo de vida eles podem migrar para ambientes com diferentes salinidades. O sistema renina-angiotensina (SRA) possui importante papel no estresse, sendo a Angiotensina II sua molécula ativa. O uso de inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) pode influenciar no estresse, fazendo diminuir. O objetivo do estudo é avaliar o efeito do maleato de enalapril (inibidor da enzima conversora de angiotensina I) em cativeiro e no choque osmótico no qual é um evento estressor. Foram usadas 120 garoupas, em dois sistemas de recirculação, com três tanques cada, sendo que um grupo recebeu a ração comercial peletizada e outro recebeu adicionado a ração 10mgKg^{-1} de maleato de enalapril durante 30 dias. Antes do final do experimento, em 20 dias, cada tanque foi filmado, 5 minutos cada sendo 1 minuto com zoom de 20X para verificar o comportamento de nado através da velocidade de nado e depois as imagens foram processadas. Já no fim do experimento foi coletado o sangue ($n=15$ para cada tratamento) para medir os parâmetros hormonais (cortisol, noradrenalina e adrenalina), metabólicos (glicose) e iônicos (sódio, potássio e cálcio) antes do choque. O choque osmótico foi de 10 minutos na água doce e foi retirado o sangue após 10 min, 2 horas e 6 horas que foram os tempos analisados. Os dados da velocidade de nado foram submetidos a teste T de student e o do choque por ANOVA de duas vias o teste de pos-hoc de Tukey com nível de significância $P<0,05$. O maleato de enalapril diminuiu a velocidade de nado significativamente e reduziu parâmetros hormonais, metabólicos e iônicos durante o choque osmótico mostrando que a redução da velocidade de nado pode ser pela redução do cortisol e da glicose no tratado comparado com o controle no experimento do choque osmótico podendo o Maleato de enalapril podendo ser usado como atenuante do estresse em cativeiro e em mudanças de salinidade em garoupa.

Abstract

The Dusky grouper (*Epinephelus marginatus* Lowe 1834) is a marine fish species that to present rapid growth and during your life cycle they can to migrate to environment with different salinities. The Renin-Angiotensin System (RAS) have an important role in stress, with Angiotensin II your active molecule. The Angiotensin Converting Enzyme (ACE) Inhibitors use can influence the stress, can low. The objective of study is evaluating the enalapril maleate effect (inhibidor of angiotensin converting enzyme I) in captivity and osmotic shock that is stressor event. Were used 120 dusky groupers, in two recirculation systems, with three tanks each, being one group receive the commercial pelletized food and other receive additional the food 10mgKg^{-1} of enalapril maleate during 30 days. Before the final of trial, in 20 days, was graded 5 minutes each being one minute with 20X zoom to evidence the swimming behavior through of swim velocity after images were processed. Already in the end of trial the blood was collected (n=15 by treatment) to measure the hormonal (cortisol, adrenaline and noradrenaline), metabolic (glucose) and ionic (sodium, potassium and calcium) parameters before shock. The osmotic shock was 10 minutes in freshwater and the blood was collected after 10 minutes, 2 hours and 6 hours that were analyzed times. The velocity data were submitted to student's test T and osmotic shock by two-way ANOVA and test post-hoc of Tukey with $P < 0.05$ significance level. Enalapril maleate reduce swimming velocity significantly and drop hormonal, metabolic and ionic parameters during osmotic shock showing that the reduction of swim velocity can be to cortisol and glucose reduction compared with control in osmotic shock trial may be used with attenuating of captivity stress and in salinity changes in dusky grouper.

1 **1. Introdução**

2

3 1.1. *Produção da garoupa* *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) (*Teleostei:* 4 *Serranidae*)

5 No Brasil e no mundo as atividades de piscicultura marinha crescem em
6 comparação a pesca extrativa (FAO, 2010). Em 2010 a produção de pescado no Brasil
7 foi de 479.399 toneladas o que representa 0,61% da produção mundial. As atividades de
8 piscicultura marinha foram menores que as continentais, com produção de pescado de
9 84.214,3 toneladas em 2011 comparadas com 544.490 toneladas da aquicultura
10 continental. Uma das espécies na produção marinha de pescado brasileira é a garoupa
11 (*Epinephelus* spp.) com 1.116,7 toneladas em 2011 (MPA, 2011).

12 O *Epinephelus* apresenta 11 espécies registradas para a costa brasileira. Entre
13 estas está a garoupa-verdadeira *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834), a qual ocorre
14 nas regiões Sudeste e Sul do Brasil, passa de um metro de comprimento e 40 kg de
15 peso. Ela possui grande interesse na pesca artesanal e esportiva do ponto de vista
16 econômico e turístico e é apontada como candidata para a piscicultura marinha
17 (Figueredo & Menezes 2000, Sanches *et al.* 2009a,b, Ramos *et al.* 2012). Ela é
18 hermafrodita protogínica, ou seja, matura inicialmente como fêmea e, em determinado
19 momento de seu desenvolvimento, sofre inversão sexual tornando-se macho assim
20 como os demais membros da subfamília Epinephelinae, família Serranidae (Sanches *et*
21 *al.* 2009b).

22 Conhecidos como garoupas, meros, chernes e badejos, estão entre as espécies
23 mais cultivadas do sudeste asiático devido ao seu alto valor comercial e por
24 apresentarem rápido crescimento, resistência ao manejo e adaptação a sistemas
25 intensivos de criação (Chou & Lee 1997). Está incluída na lista vermelha da
26 *Internacional Union for Conservation of Nature and Natural Resources* (IUCN) como
27 espécie ameaçada (Fennessy, 2006). Por isto ela tem sido apontada com potencialidades
28 para aquicultura e repovoamento (Glamuzina *et al.* 1998), porém é considerada uma
29 espécie difícil de reproduzir em cativeiro devido ao seu comportamento reprodutivo ser
30 influenciado pela estrutura social (Zabala *et al.* 1997a,b).

31 Muitos teleósteos vivem em ambientes onde estão sujeitos a diferenças
32 osmóticas e iônicas entre o ambiente interno e externo. As garoupas na natureza

33 confrontam com mudanças drásticas de salinidade no ambiente externo. Juvenis da
34 subfamília Epinepheline migram em direção aos estuários de areia e preferem habitar
35 zonas de água salobra. Durante estações quando a temperatura e salinidade declinam
36 gradualmente eles movem para áreas mais profundas ou migram para o mar (Doi *et al.*
37 1991). Os padrões de migração e modo de recrutamento em larvas e juvenis de garoupa
38 são claramente influenciados por fatores ambientais como temperatura e salinidade
39 (Caberoy & Qunitio, 2000).

40

41 1.2. *Mecanismos de Estresse em Peixes Teleósteos*

42

43 Mudanças de salinidade podem ser consideradas estressantes para os peixes. O
44 cortisol possui um importante papel na adaptação hiperosmótica embora possa
45 promover adaptação hiposmótica, dependendo da espécie (McCornick 2001, Mancera *et*
46 *al.* 2002, Laiz-Carrión *et al.* 2003).

47 Em relação ao comportamento em cativeiro os peixes são mais agressivos
48 devido a competição pelo recurso (alimento) e a densidade de estocagem (Ruzzante
49 1994, Huttingford 2004, Ashley 2007) e quando se está tentando domesticar alguma
50 espécie para fins de produção se tornam mais agressivos e estressados devido a
51 aclimação ao novo ambiente e diminuem seu crescimento devido a energia em vez de
52 ser armazenada e estocada está sendo liberada para o organismo consumir, perdendo
53 peso (Martins *et al.* 2012, Ashley 2007).

54 O comportamento anormal de peixes em cativeiro incluem comportamento
55 repetitivo e padrões anormais de atividade de nado (Ashley 2007). Compreender a
56 origem funcional do comportamento anormal é importante para avaliar se representa
57 diminuição do bem estar ou respostas adaptativas ao estresse (Dawkins 2003, 2004).

58 O mecanismo de estresse inicia-se a partir do Sistema Nervoso Central (SNC) no
59 hipotálamo que medeia o Sistema Nervoso Autônomo (SNA). A partir disto possui três
60 tipos de resposta: primária, secundária e terciária (McCornick 2001, Ashley 2007).

61 A resposta primária é mediada por hormônios. Começa com a ação de
62 neurotransmissores. O SNA simpático (SNAS) possui noradrenalina como seu principal
63 neurotransmissor nos órgãos-alvo e quando é desencadeada a resposta de luta ou fuga
64 pelo organismo são liberadas catecolaminas a partir de nervos adrenérgicos (Reid *et al.*

65 1998). A noradrenalina liberada pelas terminações do SNAS chegam às células
66 cromafins no rim cefálico, e estimulam a liberação de mais catecolaminas sendo a
67 resposta muito rápida (Randall & Perry 1992, Reid *et al.* 1998).

68 A ativação do limbo corticosteroide na resposta do estresse ocorre via
69 estimulação do eixo hipotálamo-pituitária-interrenal (HPI) resultando a liberação de
70 cortisol para a circulação. O estresse estimula a expressão e síntese do fator liberador de
71 corticotropina (CRF). Neurônios do CRF estimulam a síntese e clivagem do precursor
72 pro-opiomelanocortina para o hormônio adrenocorticotrópico (ACTH). Associado a
73 liberação do ACTH, CRF tem também efeitos modulatórios e comportamentais. CRF
74 tem sido demonstrado suprimir o apetite e o comportamento alimentar e também
75 estimula o aumento da atividade motora em salmonídeos. O tempo da resposta inter-
76 renal do ACTH pela produção de cortisol é variável entre espécies, mas tipicamente tem
77 uma latência de minutos em vez de horas (Wendellar-Bonga 1997, Pankhurst 2011). Ele
78 é o principal indicador de estresse em peixes, independente do estágio de
79 desenvolvimento. Brânquias, intestino e fígado são alvos importantes para o cortisol os
80 quais refletem as ações do hormônio no controle do balanço hidromineral e do
81 metabolismo energético (Wendellar-Bonga 1997, Mommsen 1999). A taxa de liberação
82 de cortisol é usualmente o principal fator no controle dos níveis de catecolaminas. Ele é
83 liberado em menor quantidade, mas seus efeitos são mais prolongados (Iwama *et al*
84 1999).

85 A resposta secundária é mediada por metabólitos produzidos a partir da
86 estimulação de cortisol e catecolaminas. O principal metabólito avaliado em peixes é a
87 glicose por ser de fácil análise e pelo consumo rápido do organismo. O cortisol e as
88 catecolaminas estimulam a glicogênese e gliconeogênese no fígado, resultando na
89 produção de glicose (Martinez- Porchas *et al* 2009, Pankhurst 2011, Wen-Ching *et al*
90 2012). E a resposta terciária do organismo a qual possui maior importância na
91 aquicultura é resposta imune e a influência no crescimento e reprodução (McCornick
92 2001, Ashley 2007).

93

94 1.3. Sistema Renina-Angiotensina (SRA) em peixes teleósteos

95

96 O SRA é um dos principais sistemas endócrinos que atuam no balanço
97 hidromineral em peixes que o sistema é ativado mediante desafios que podem vir a
98 produzir hipotensão como a transferência de salinidade ou hemorragia (Fuentes & Eddy
99 1997, Leedom *et al.* 2003, Butler & Brown 2007).

100 O SRA é uma cascata peptídica que se inicia na síntese e liberação da enzima
101 renina que cliva o angiotensinogênio para formar o decapeptídeo Angiotensina I (Ang I).
102 Nos peixes marinhos aglomerulares a renina é produzida nas células justaglomerulares
103 no rim cefálico (Taugner & Hackenthal 1989, Butler & Brown 2007). A próxima etapa
104 é a conversão da Ang I para o octapeptídeo Ang II pela enzima conversora de
105 angiotensina I (ECAI). As lamelas branquiais são o principal sítio na conversão de Ang
106 I para Ang II, porém outros tecidos como rins e cérebro possuem atividades
107 significantes de ECA (Butler & Brown 2007).

108 O SRA é um dos primeiros sistemas endócrinos que aparecem durante a
109 evolução dos vertebrados. Na escala filogenética se podem observar grânulos de renina
110 em quase toda a árvore vascular dos peixes ósseos (Romano 2004, Fournier *et al.* 2012).

111 Alguns estudos têm mostrado que o SRA é ativado em peixes mantidos em
112 meios hiperosmóticos, onde suas ações proporcionam manutenção do volume e pressão
113 sanguíneos (Wong *et al.* 2006). Em soma das ações pressoras e dipsogênicas da Ang II
114 descritas anteriormente, outros efeitos diretos e indiretos da Ang II são importantes para
115 sustentar o balanço de fluídos corporais como o cortisol. No linguado (*Platichthys*
116 *flesus*) a administração de Ang II estimulou o aumento dos níveis de cortisol
117 plasmáticos (Perrott & Balment 1990), enquanto que cortisol plasmático e Ang II
118 mudaram em paralelo quando o bagre (*Sparus sarba*) foi aclimatado em diferentes
119 salinidades (Wong *et al.* 2006). O cortisol aumentou com a transferência das enguias
120 (*Anguilla anguilla*) para água salgada e isto pode ser inibido pelo uso do captopril
121 (fármaco inibidor da ECA) (Kenyon *et al.* 1985). Há também um efeito direto do SRA
122 para regular a atividade da bomba de Na^+/K^+ -ATPase (NKA) em brânquias
123 (Marsigliante *et al.* 1997), rim (Marsigliante *et al.* 2000) e intestino (Marsigliante *et al.*
124 2001) de enguia e no bagre a Ang II produziu aumentos dose-dependentes na atividade
125 branquial da bomba de NKA (Wong *et al.* 2006).

126 Há também caráter dipsogênico sendo a Ang II liberada como um
127 neurotransmissor no hipotálamo estimulando a ingestão de água e age no centro

128 cardiovascular do tronco cerebral aumentando a frequência dos batimentos cardíacos
129 (Baldisserotto 2009, Le Mevel *et al.* 2012). Em peixes a Ang II aumentou a ingestão de
130 líquidos em espécies eurihalinas que vivem em águas salobras estuarinas e começaram a
131 beber em águas hipertônicas (Takei & Tsuchida 2000). Porém com o uso de captopril
132 (inibidor da ECA) diminuiu o caráter dipsogênico na enguia (*A. anguilla*) (Tierney *et al.*
133 1995).

134

135 1.4. Inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina I (IECAI)

136

137 Para atenuar o Sistema Renina Angiotensina são utilizados drogas que inibem
138 uma das etapas na qual produzem um mecanismo de realimentação que aumenta ou não
139 o efeito final no organismo. As mais utilizadas são drogas que inibem a ECA I inibindo
140 a conversão da Ang II (Skidgel & Erdös 2004, Regoli *et al.* 2012).

141 Os IECAI (captopril, enalapril, entre outros) são fármacos vasodilatadores que
142 reduzem a resistência periferal vascular mudando a taxa cardíaca, diminuindo a pressão
143 venosa pulmonar e possuem efeitos farmacocinéticos de 12-24h. Agem como
144 endotelioprotetores e vasodilatadores, reduzindo a pressão sanguínea, aumentando o
145 fluxo sanguíneo para o coração, cérebro e o rim e posteriormente para todos os tecidos,
146 prevenindo a ocorrência de trombozes e a formação de ateroma e reduzir a resistência à
147 insulina. Recentemente, os IECAs são considerados como medicamentos potentes para
148 usos como drogas preventivas em pacientes com altos riscos de desenvolverem infarto
149 no coração, ataque súbito, retinopatia e falência renal progressiva, além de controlarem
150 os níveis de cortisol e catecolaminas (Anderson *et al.* 1986, Regoli *et al.* 2012).

151 Quimicamente, os principais compostos usados como IECAs pertencem a três
152 categorias: as sulfidrilas (captopril), os fosfonatos (fosinopril) e os dicarboxilatos
153 (enalapril), três grupos de compostos que diferem na sua composição farmacocinética e
154 na sua ação a qual para uma dose terapêutica média de captopril dura 6-8h e o enalapril
155 de 12-18h (Williams 1988).

156 Em peixes teleósteos a inibição da formação endógena usando lisinopril previne
157 o aumento dos níveis de Ang II e catecolaminas circulantes em hipóxia aguda em truta
158 arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (Lapner & Perry 2001) e o captopril diminuiu as

159 concentrações de cortisol plasmático em enguias na água doce (*A. anguilla*) (Kenyon *et*
160 *al* 1985).

161

162 1.4.1. *Maleato de Enalapril*

163

164 Maleato de Enalapril é uma pró-droga derivado de dois aminoácidos, L-alanina e
165 L-prolina a qual quando administrada oralmente é hidrolisada para a liberação do
166 composto ativo, o enalaprilato. O medicamento é 60% absorvido e 40% bioavaliável
167 como enalaprilato. Ambos os compostos vão para a excreção renal sem outro tipo de
168 metabolismo. A meia-vida funcional para acumulação de enalaprilato é 11h, e então é
169 aumentado na presença de uma redução na função renal (Davies *et al.* 1984).

170 Mecanismo de ação (farmacodinâmica): a ECA é uma peptidil-dipeptidase a
171 qual catalisa a conversão da Ang I à substância pressora Ang II. Depois da absorção o
172 enalapril é hidrolisado a enalaprilato o qual inibe a ECA. A inibição da ECA resulta na
173 diminuição da Ang II plasmática, diminui a secreção de aldosterona, promove aumento
174 dos níveis séricos de potássio e pode facilitar o trabalho cardíaco em mamíferos
175 (Gardner *et al.* 2004, Franco *et al.* 2011).

176

177 1.5. *Justificativa*

178

179 Há vários estudos em peixes teleósteos em relação aos agentes estressores como
180 mudanças de salinidade (Caberoy & Qunitio 2000, Prodocimo *et al.* 2007, Wen-Ching
181 *et al.* 2012), hipóxia (Bernier & Perry 1999, Lapner & Perry 2001) ou exercício intenso
182 (Sandlom *et al.* 2006).

183 Já em relação ao sistema renina-angiotensina, há muitos estudos na medicina
184 humana e veterinária principalmente relacionada com a formação de patologias como
185 hipertensão arterial, síndrome metabólica, dislipidemia, resistência à insulina, doenças
186 cardiovasculares e doença crônica renal (Stiefel *et al.* 2011, Zhou & Li 2011).

187 Já em peixes com SRA há estudos relacionados com mecanismos de estresse
188 como mudanças de salinidade (Fuentes & Eddy 1997, Wong *et al.* 2006), hipóxia
189 (Bernier & Perry 1999) e com ingestão de água (Takei & Tsuchida 2000) e relacionados
190 a hormônios usando inibidores (Cobb *et al.* 1999, Sandlom *et al.* 2006), ou não

191 (Furimsky *et al* 1996, Bernier *et al.* 1999) e com fármacos IECA em enguias de água
192 doce (*A. anguilla*) com captopril (Perrott & Balment 1990, Tierney *et al.* 1995, Wong *et*
193 *al* 2006) e enalapril na transferência da água doce na água salgada em salmão do
194 atlântico juvenil (*Salmo salar*) (Fuentes & Eddy 1997) sendo os fármacos aplicados via
195 intravascular, entretanto não há trabalhos que avaliam os efeitos destes fármacos
196 adicionados na ração durante eventos estressores, importantes para a aquicultura quando
197 se estuda uma espécie para fins de produção e avaliar o estresse em cativeiro. Se o uso
198 do maleato de enalapril diminuir o nível destes parâmetros poderia se constituir em uma
199 ferramenta para atenuar o estresse dos peixes e potencializar sua produção em cativeiro.

200

201 **2. Objetivos**

202

203 *2.1. Objetivo Geral*

204 Avaliar o uso do Maleato de Enalapril a partir do comportamento de nado e no
205 choque osmótico em juvenis da garoupa *E. marginatus*.

206

207 *2.2. Objetivos Específicos*

208 Analisar o uso do Maleato de Enalapril no comportamento natatório na garoupa
209 (*E. marginatus*);

210 Avaliar a utilização do Maleato de Enalapril nos parâmetros hormonais, iônicos
211 e metabólicos na garoupa *E. marginatus* durante o choque osmótico.

212

213

214

215

216

217

218

219

220

221

222

223 **Uso do maleato de enalapril sobre comportamento natatório e durante o choque**
224 **osmótico de juvenis da garoupa (*Epinephelus marginatus*)¹**

225

226 B. F. CORRÊA ¹; M. A. R. GARRIDO-PEREIRA ¹; L.A. ROMANO ^{1*}

227

228 ¹Laboratório de Imunologia e Patologia de Organismos Aquáticos, Estação Marinha de
229 Aquicultura, Instituto de Oceanografia, Universidade Federal do Rio Grande, Rio
230 Grande, Rio Grande do Sul, Brasil, *dcluis@yahoo.com

231

232

Resumo

233 A garoupa *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) (Teleostei: Serranidae) é uma
234 espécie marinha que na natureza sofre com mudanças de salinidade e que para
235 sobreviver apresenta respostas ao estresse. Os objetivos do estudo analisou o uso do
236 Maleato de Enalapril no comportamento natatório e nos parâmetros fisiológicos
237 (hormonais, iônicos e metabólicos) na garoupa *E. marginatus* no choque osmótico. Para
238 o comportamento natatório analisou a partir da velocidade de nado através de filmagem
239 e ela durou cinco minutos. Já o agente estressor avaliou durante quatro tempos, 120
240 garoupas divididas em dois sistemas de recirculação e verificou os níveis de cortisol,
241 catecolaminas, glicose e íons (sódio, cálcio e potássio). O Maleato de enalapril atenuou
242 o estresse diminuindo a velocidade de nado, cortisol, catecolaminas, glicose e íons
243 podendo ser usado na aquacultura como alternativa para aclimatar uma espécie em
244 cativeiro.

245

246 **Palavras-chave:** agente estressor; angiotensina II; bem-estar; choque osmótico.

247

248 **1. Introdução**

249

250 A garoupa *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) (Teleostei: Serranidae) é
251 hermafrodita protogínica, apresentando ocorrência ao longo das regiões Sudeste-Sul do

¹ A ser submetida no Periódico Aquaculture.

252 Brasil (Figueiredo e Menezes 2000). Essa espécie está incluída na Lista Vermelha da
253 União Internacional para Conservação da Natureza e Recursos Naturais (IUCN) como
254 espécie ameaçada (Fernessy 2006). Na natureza, a garoupa está confrontada com
255 mudanças de salinidade e frequentemente encontram-se frente ao estresse osmótico.
256 Dessa forma a sua sobrevivência necessita de mecanismos de controle rápido de volume
257 hídrico e regulação da pressão e por isto exibem uma ampla variação em suas respostas
258 a estressores como mudanças de salinidade (Caberoy e Quintio 2000; Estudillo e Duray
259 2003; Wong et al. 2006).

260 O Sistema Renina Angiotensina (SRA) é um dos principais sistemas endócrinos
261 que atua no equilíbrio hídrico entre os peixes e é ativado mediante desafios que
262 produzam hipotensão como transferência de salinidade no qual é um evento estressor
263 (Brown & Hazon 2007; Fuentes e Eddy 1997). Já o uso de fármacos inibidores da
264 Enzima Conversora de Angiotensina I (IECAI) pode atenuar o estresse em cativeiro ou
265 quando eles estão expostos a um agente estressor. Há estudos em peixes utilizando
266 fármacos IECA em enguias usando captopril (Tierney et al. 1995) e enalapril no salmão
267 do atlântico na transferência de salinidade (Fuentes e Eddy 1997). Porém não há estudos
268 que avaliam o efeito de drogas inibidoras da ECA aplicados na ração durante eventos
269 estressores em cativeiro e no comportamento de nado e se o uso deles na aquicultura
270 pode ser aplicado para tanto. Sendo assim o objetivo do estudo foram analisar o uso do
271 Maleato de Enalapril no comportamento natatório e nos parâmetros fisiológicos
272 (hormonais, iônicos e metabólicos) na garoupa *E. marginatus* durante o choque
273 osmótico.

274

275 **2. Material e Métodos**

276

277 **2.1. Comportamento natatório**

278 O experimento realizou no Laboratório de Piscicultura Estuarina e Marinha
279 (LAPEM) – Universidade Federal do Rio Grande, Brasil. 40 juvenis de garoupas
280 (controle: peso médio: 151,4±37g, comprimento médio: 20,41±1,8cm; maleato de
281 enalapril: peso médio: 157,6±32,3g, comprimento médio: 21,1±2cm) aclimatadas
282 durante 15 dias em dois sistemas de recirculação de água. Cada tratamento realizou em
283 dois sistemas independentes com 20 peixes em cada tanque. Cada sistema compreendeu

284 com três tanques (300L), uma bomba de circulação (1/3 HP), filtro de areia,
 285 esterilizador UV, skimmer e um sistema de aeração. Durante a aclimação elas
 286 recebiam alimentação duas vezes por dia com uma ração comercial peletizada (Guabi
 287 Foods Mongiana S.A. São Paulo, Brasil). Após metade delas recebeu ração comercial
 288 peletizada e a outra metade com 10mg. Kg⁻¹ de maleato de enalapril adicionados na
 289 ração. A partir do 20° dia realizou a análise de comportamento natatório a partir da
 290 velocidade de nado. Diariamente verificou a qualidade da água durante todo o
 291 experimento mostrado na Tabela 1.

292 Através da utilização da filmagem das garoupas consistiu a análise da
 293 velocidade de nado. Filmou-se durante a alimentação com a câmera a distância de 50
 294 cm do tanque, sendo que não se retirou a tela nem se realizou movimentos bruscos a fim
 295 de não interferir no comportamento dos peixes. A filmagem durou 5 minutos, sendo que
 296 entre o quarto e o quinto minuto observou-se com um zoom de 20× a fim de verificar o
 297 movimento de nado de uma única garoupa. Realizaram-se três filmagens no mesmo
 298 tanque, duas vezes por dia totalizando seis filmagens.

299

300 Tabela 1. Parâmetros de qualidade da água entre os dois tratamentos (média±desvio
 301 padrão) durante todo o experimento (até o 20° dia). ME: maleato de enalapril, NAT:
 302 Nitrogênio Amoniacal Dissolvido Total. As medições: temperatura e oxigênio
 303 dissolvido – oxímetro (E50, YSI, EUA), salinidade – refratômetro (Atago S/Milli-E,
 304 Japão), pH – pHmetro de bancada (Metter Toledo five easy FE20, Suíça-EUA),
 305 alcalinidade – método titrimétrico (APHA, 1998), NAT e Nitrito dissolvido – Aminot e
 306 Chaussepied (1983).

Parâmetros de qualidade da água		
Variáveis	Controle	ME
Temperatura (°C)	27,4±1,1	27,3±1
pH	8,09±0,1	8,1±0,1
Oxigênio dissolvido (mg.L ⁻¹)	5,3±1,2	5,74±1,2
Salinidade (%)	29,85±0,67	29,85±0,67
Alcalinidade (mg CO ₃ ⁻² .L ⁻¹)	171,7±11,6	165,3±12,1
NAT (N-NH ₄ ⁺) (mg.L ⁻¹)	0,53±0,3	0,54±0,3

Nitrito dissolvido (N-NO ₂ ⁻) (mg.L ⁻¹)	0,44±0,7	0,76±1,1
--	----------	----------

307

308 Com uma câmara Sony DSC HX100V 16,2 mpx, Japão executou a filmagem
 309 dos peixes e os vídeos processados no programa Video-Track, versão 3,4, Viewpoint
 310 Life Science Inc., Montreal, Canadá para avaliar a velocidade de nado dos peixes
 311 analisados no estúdio de Cinema na Universidade de Cinema, Buenos Aires, Argentina.
 312 Avaliou-se a velocidade de traslado do fundo a superfície em metros por segundo
 313 (m/s) no tanque ao final de 20 capturas de imagem em cada grupo.

314 A análise estatística foi a comparação entre as médias da velocidade de nado
 315 entre controle e tratamento por teste t de Student com nível de significância de p<0,05 e
 316 elas foram feitas no software R (R 3.0.2) (R Development, 2009).

317

318 2.2. Agente estressor – choque osmótico

319

320 Para esta análise utilizou 120 juvenis de garoupas (controle: peso médio:
 321 153,5±33,9g, comprimento médio: 20,59±1,72cm; maleato de enalapril: peso médio:
 322 163,6±33,9g, comprimento médio: 21,1±1,59cm), previamente aclimatados durante 15
 323 dias em ótimas condições de qualidade de água (Tab. 2) em dois sistemas de
 324 recirculação em aquicultura.

325

326 Tabela 2. Parâmetros de qualidade da água entre os dois tratamentos (média±desvio
 327 padrão) durante todo o experimento. ME: maleato de enalapril, NAT: Nitrogênio
 328 Amoniacal Dissolvido Total. As medições: temperatura e oxigênio dissolvido –
 329 oxímetro (E50A, YSI, EUA), salinidade – refratômetro (Atago S/Milli-E, Japão), pH –
 330 pHmetro (Metter Toledo five easy FE20, Suíça-EUA), alcalinidade – método
 331 titrimétrico (APHA, 1998), NAT e Nitrito dissolvido – Aminot e Chaussepied (1983).

Parâmetros de qualidade da água		
Variáveis	Controle	ME
Temperatura (°C)	26,89±0,9	26,7±0,9
pH	8,01±0,2	8,03±0,13
Oxigênio dissolvido (mg.L ⁻¹)	5,4±1,02	5,5±1,2

Salinidade (‰)	29,9±0,54	29,9±0,54
Alcalinidade (mg CO ₃ ⁻² L ⁻¹)	161,9±16,3	158,5±16,4
NAT (N-NH ₄ ⁺) (mg.L ⁻¹)	0,3±0,3	0,3±0,3
Nitrito dissolvido (N-NO ₂ ⁻) (mg.L ⁻¹)	0,25±0,5	0,4±0,8

332 Através de uma ração comercial alimentou as garoupas duas vezes por dia
333 durante 15 dias (Guabi, Foods Mongiana S. A. São Paulo, Brazil). Após este tempo, o
334 experimento consistiu de uma metade (n=60) das garoupas receberam a ração mais
335 10mg.Kg⁻¹ de maleato de enalapril e a outra metade recebeu somente a ração. Em
336 ambos os grupos a ração foi dada duas vezes por dia durante 30 dias. Após executou-se
337 o choque osmótico no qual é o agente estressor no estudo.

338 O choque osmótico consistiu da transferência dos peixes para a água doce
339 (salinidade 0‰) por 10 minutos. Coletou as amostras de sangue antes do choque (AC),
340 após o choque (0h) e 2 e 6 horas após (2h e 6h) as quais foram os tempos de
341 recuperação. Nos tempos de recuperação acondicionaram-se em seis tanques de 70L,
342 sendo que em cada um consistiu de cinco peixes. Para cada tempo executou em tanques
343 diferentes a fim de não interferir nos resultados. Utilizaram-se 30 peixes por tempo
344 analisado, 15 por tratamento. Em todos os tempos amostraram-se peixes diferentes,
345 totalizando 120. Então, cada garoupa foi anestesiada com benzocaína (150 ppm) e o
346 sangue periférico coletado pela punção da veia caudal com uma agulha de 26-gauge
347 com heparina e junto a uma seringa de 1 mL. Não houve mortalidades durante ou após a
348 coleta de sangue e durante o experimento de choque osmótico. Cada amostra de sangue
349 retirado dentro dos tubos de plasma de todos os peixes imediatamente antes e após o
350 choque osmótico. As amostras de soro obtiveram-se após a centrifugação em 3000g
351 para 10 min em 4 °C e estocadas em um Ultrafreezer (Indrel, Paraná, Brazil) -86 °C até
352 as análises. As concentrações de cortisol, glicose e íons (Na⁺, Ca⁺² e K⁺) no soro
353 determinou-se usando um analisador automático bioquímico (Cobas 6000 analyzer,
354 Roche, Germany) através da análise de imunoensaio competitivo. Enquanto que a
355 detecção fluorimétrica (HPLC) foi usada para as catecolaminas adrenalina e
356 noradrenalina.

357 Para comparar tempos de recuperação e tratamentos usou análise de variância
358 ANOVA duas-vias, seguido do teste post-hoc de Tukey a fim de avaliar se houveram

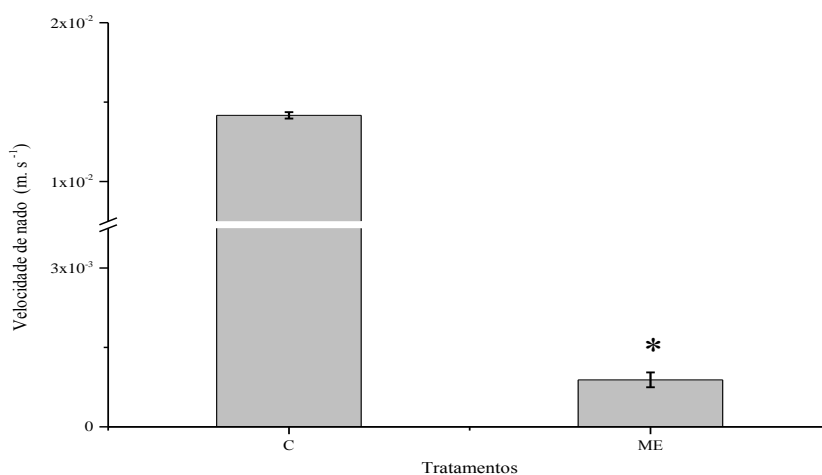
359 diferenças significativas entre as variâncias. Consideraram-se significativos os dados se
360 $P < 0,05$.

361

362 3. Resultados

363 3.1. Comportamento natatório

364 Entre os tratamentos houve diferenças significativas na velocidade de nado,
365 sendo o tratado com maleato de enalapril ($8,87 \cdot 10^{-4} \pm 1,4 \cdot 10^{-4} \text{ m.s}^{-1}$) com velocidade
366 menor que o tratamento controle ($1,325 \cdot 10^{-3} \pm 6 \cdot 10^{-5} \text{ m.s}^{-1}$) (teste t, $P < 0,05$) (Fig. 1).



367

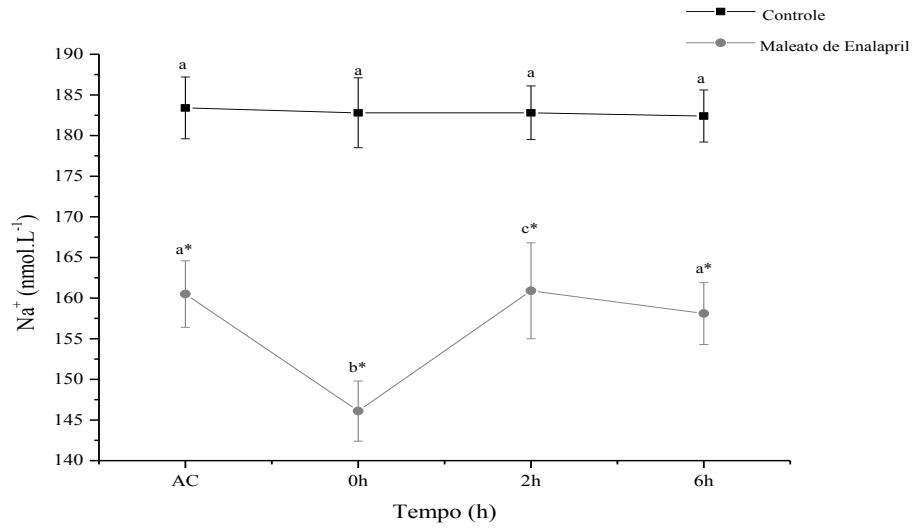
368 **Fig 1:** Gráfico dos resultados do Comportamento de Nado através da velocidade de
369 nado (m.s^{-1}) de garoupa (*Epinephelus marginatus*). C: controle, ME: Maleato de
370 Enalapril (10 mg. Kg^{-1}). As barras representam as médias e as linhas representam o
371 desvio padrão. Asterisco indica diferença significativa do tratamento em relação ao
372 controle. $P < 0,05$.

373

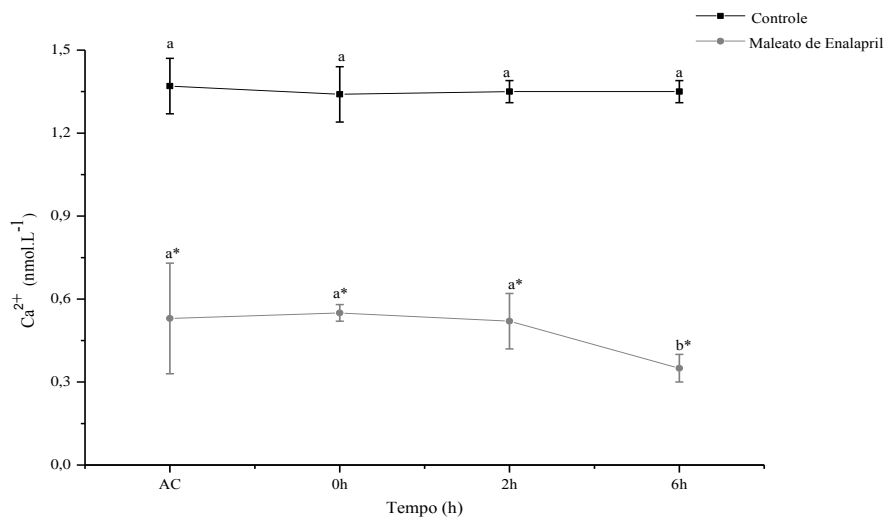
374 3.2. Agente estressor – Choque osmótico

375 Os resultados apresentam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os
376 tratamentos. O tratamento com Maleato de Enalapril reduziu as concentrações de
377 catecolaminas, cortisol, glicose, sódio e cálcio em comparação ao tratamento controle
378 (Fig. 2 e 3). Em relação aos tempos avaliados e os tratamentos houve diferenças
379 significativas o sódio, o cálcio e a glicose. E as concentrações iônicas não mostraram
380 alterações entre os tempos, somente entre os tratamentos, em que com ME houve uma

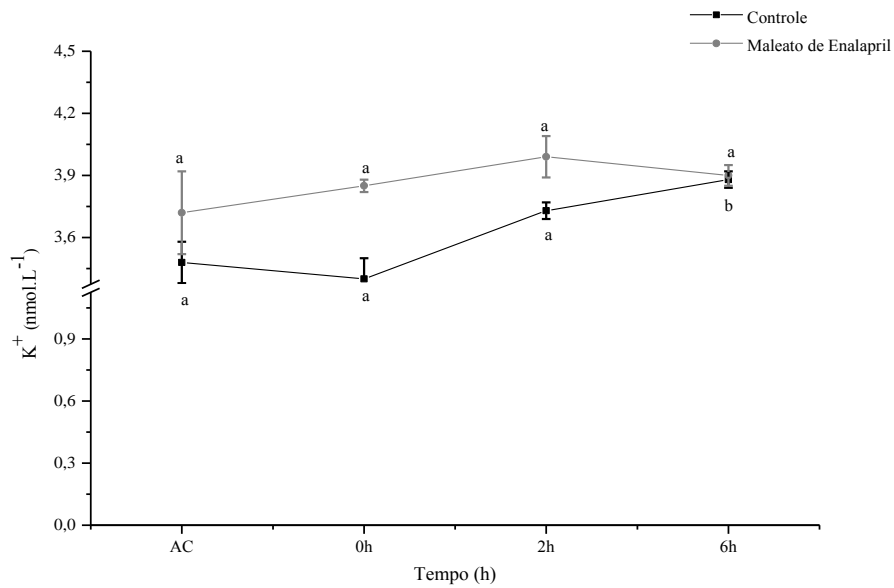
381 queda nos níveis de sódio e cálcio e um aumento nos níveis de potássio comparado com
382 o controle.



383

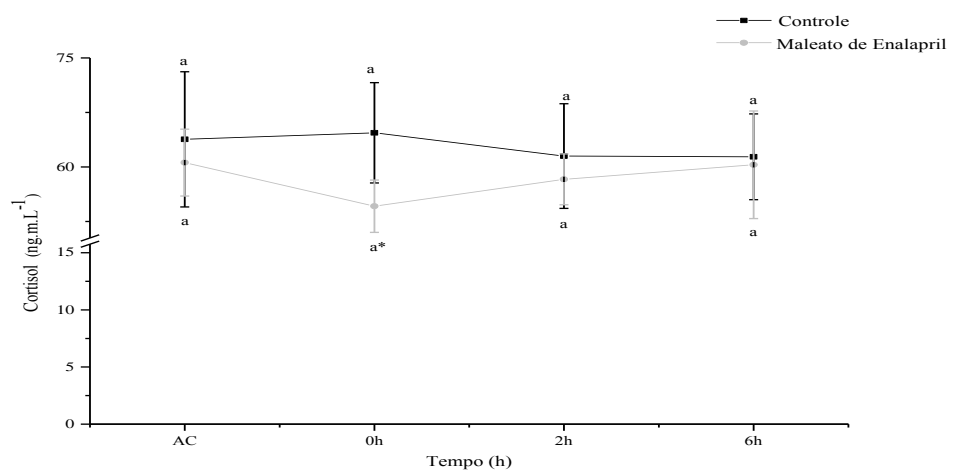


384

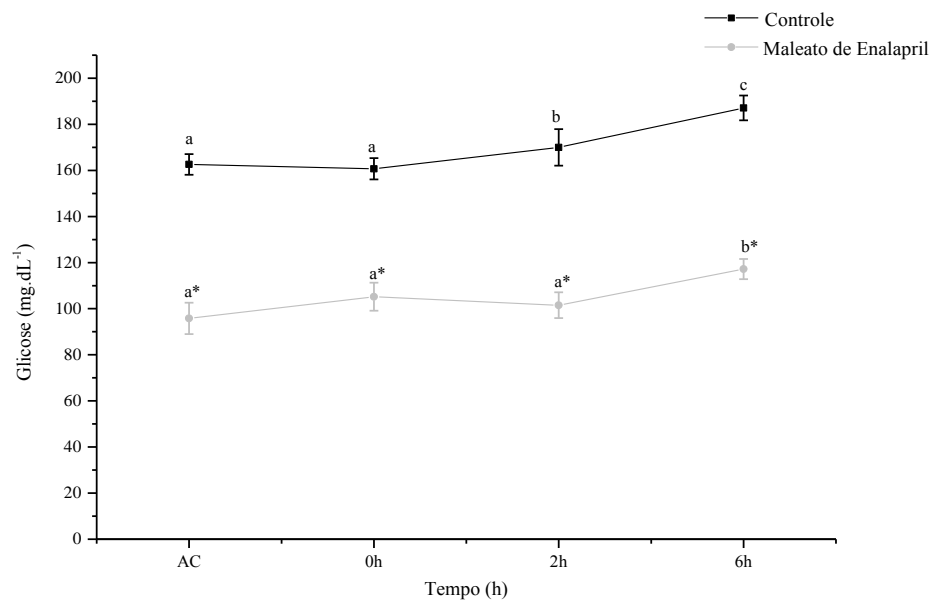


385

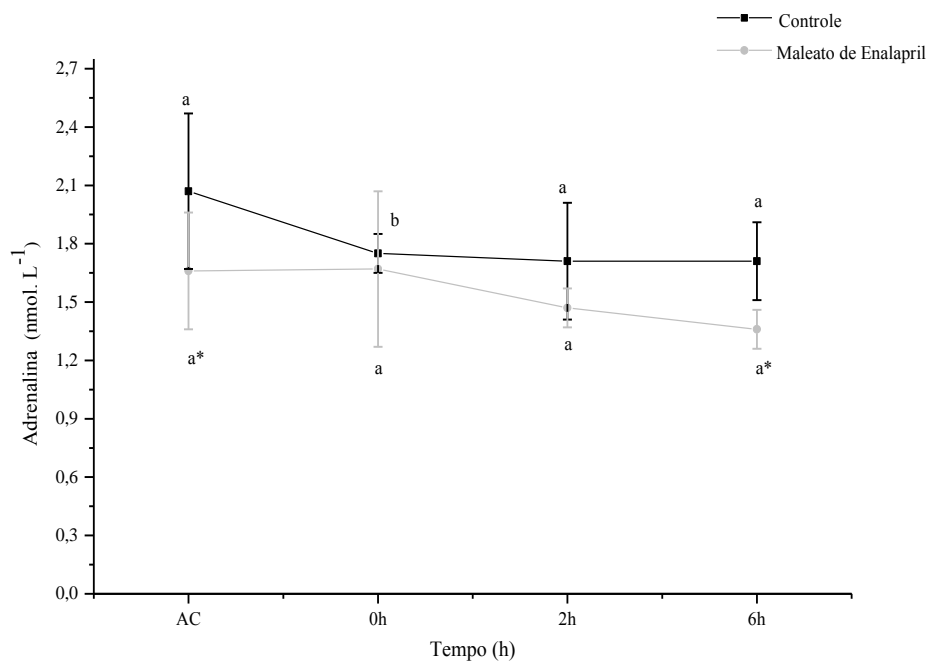
386 **Fig. 2:** Gráfico das concentrações sorológicas de sódio, cálcio e potássio no choque
 387 hiposmótico da garoupa (*Epinephelus marginatus*) entre os tratamentos. AC: antes do
 388 choque hiposmótico. Letras diferentes na mesma linha representam diferenças
 389 significativas ao longo do tempo no mesmo tratamento. * Representa diferenças
 390 significativas entre os tratamentos para o mesmo tempo experimental. (média ±dp,
 391 ANOVA duas-vias, Tukey, p<0,05).



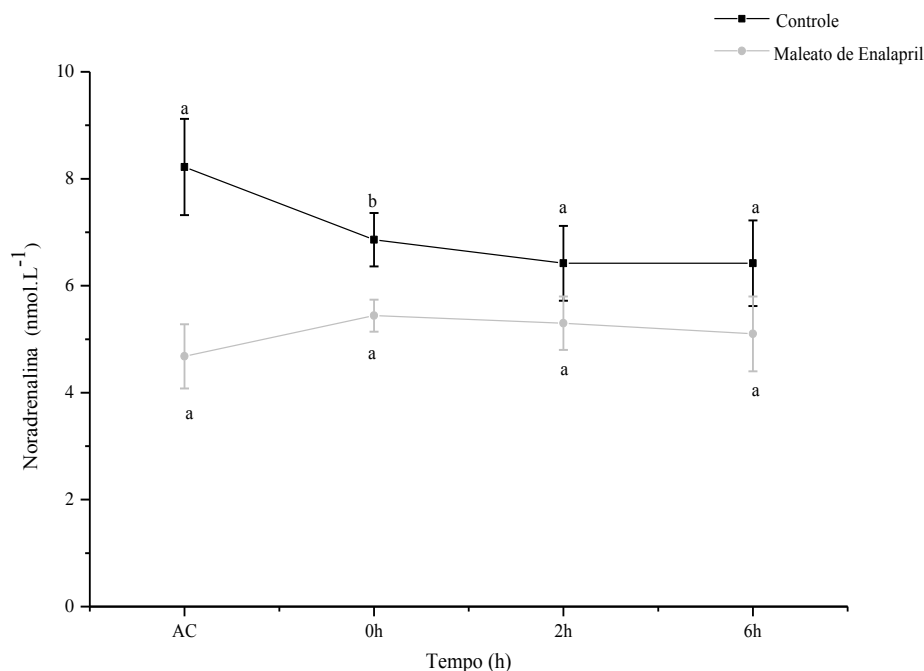
392



393



394



395

396 **Fig. 3:** Gráfico das concentrações sorológicas de cortisol, glicose, adrenalina e
 397 noradrenalina no choque hiposmótico da garoupa (*Epinephelus marginatus*) entre os
 398 tratamentos. AC: antes do choque hiposmótico. Letras diferentes na mesma linha
 399 representam diferenças significativas ao longo do tempo. * Representa diferenças
 400 significativas entre os tratamentos para o mesmo tempo experimental. (média ±dp,
 401 ANOVA duas-vias, Tukey, $p < 0,05$).

402

403 Entre os tratamentos antes do choque osmótico tiveram diferenças significativas às
 404 catecolaminas (NOR: ME: $4,68 \pm 0,6$; Controle: $8,22 \pm 0,9$; AD: ME: $1,65 \pm 0,3$; Controle:
 405 $2,07 \pm 0,4$ nmol.L⁻¹) (Fig. 3), glicose (ME: $95,8 \pm 6,8$; Controle: $162,7 \pm 4,5$ mg.dL⁻¹), sódio
 406 (ME: $160,5 \pm 4,1$; Controle: $183,5 \pm 3,8$ nmol.L⁻¹) e cálcio (ME: $0,5 \pm 0,2$; Controle:
 407 $1,4 \pm 0,1$ nmol.L⁻¹), sendo o tratado menor do que o controle. Os outros dados não
 408 apresentaram diferenças significativas. Somente o potássio apresentou aumento (ME:
 409 $3,8 \pm 0,4$ nmol.L⁻¹) comparado ao controle ($3,5 \pm 0,4$ nmol.L⁻¹).

410

Já durante o choque osmótico no tratamento em quase todos os parâmetros
 411 avaliados tiveram queda exceto o potássio que aumentou ($3,9 \pm 0,3$ nmol.L⁻¹) comparado
 412 com o controle ($3,5 \pm 0,4$ nmol.L⁻¹) (Fig. 2). Entre os parâmetros tiveram diferenças

413 significativas o cortisol (ME: $54,6 \pm 3,6$; Controle: $64,7 \pm 6,9$ ng.mL⁻¹) (Fig. 3), o sódio
414 (ME: $146,1 \pm 3,7$; Controle: $182,9 \pm 4,3$ nmol.L⁻¹), a glicose (ME: $105,2 \pm 6,1$; Controle:
415 $160,7 \pm 4,6$ mg.dL⁻¹) e o cálcio (ME: $0,5 \pm 0,03$; Controle: $1,3 \pm 0,1$ nmol.L⁻¹).

416 Durante o primeiro tempo de recuperação avaliado (2h) entre os parâmetros no
417 tratamento tiveram queda a glicose, o sódio, o cálcio, o cortisol e as catecolaminas
418 comparado com o controle. E tiveram diferenças significativas a adrenalina (ME:
419 $1,47 \pm 0,1$; Controle: $1,71 \pm 0,3$ nmol.L⁻¹), a glicose (ME: $101,5 \pm 5,6$; Controle: $170 \pm 7,9$
420 mg.dL⁻¹), o sódio (ME: $160,9 \pm 5,9$; Controle: $182,9 \pm 3,3$ nmol.L⁻¹) e o cálcio (ME:
421 $0,5 \pm 0,1$; Controle: $1,4 \pm 0,04$ nmol.L⁻¹) entre os dois tratamentos.

422 Entre os tempos de recuperação (2 e 6h) comparados com o tempo anterior ao
423 estresse (AC) com o maleato de enalapril tiveram diferenças significativas a adrenalina
424 (2h: $1,47 \pm 0,1$; 6h: $1,36 \pm 0,1$; AC: $1,65 \pm 0,3$ nmol.L⁻¹), o cálcio (2h: $0,5 \pm 0,1$; 6h:
425 $0,4 \pm 0,05$; AC: $0,5 \pm 0,2$ nmol.L⁻¹) que tiveram uma queda e a glicose (2h: $101,5 \pm 5,6$;
426 6h: $117,2 \pm 4,4$; AC: $95,8 \pm 6,8$ mg.dL⁻¹) que teve um aumento .

427 Entre os tempos de recuperação (2 e 6h) comparados com o tempo anterior ao
428 estresse (AC) com o controle tiveram diferenças significativas a noradrenalina, (2h:
429 $6,42 \pm 0,7$; 6h: $6,67 \pm 0,8$; AC: $8,22 \pm 0,9$ nmol.L⁻¹) a adrenalina (2h: $1,71 \pm 0,3$; 6h:
430 $1,72 \pm 0,2$; AC: $2,07 \pm 0,4$ nmol.L⁻¹), a glicose (2h: $170 \pm 7,9$; 6h: $187 \pm 5,4$; AC: $162,7 \pm 4,5$
431 mg.dL⁻¹) e o potássio somente em 6h (6h: $3,9 \pm 0,3$ nmol.L⁻¹; AC: $3,5 \pm 0,4$ nmol.L⁻¹).

432 Entre os tempos de recuperação (2 e 6h) comparado com o choque osmótico (0h)
433 tanto no controle como o tratado apresentaram quase o mesmo resultado apresentando
434 diferenças significativas a adrenalina com uma queda e a glicose um aumento nos
435 tempos de recuperação; a noradrenalina somente no controle e o cálcio no tratado.

436 E no segundo tempo de recuperação analisado (6h) entre os parâmetros no
437 tratamento houve queda das concentrações de glicose, sódio, cálcio, e as catecolaminas
438 e tiveram diferença significativa a adrenalina (ME: $1,36 \pm 0,1$; Controle: $1,72 \pm 0,2$
439 nmol.L⁻¹), o sódio (ME: $158,8 \pm 3,8$; Controle: $182,5 \pm 3,2$ nmol.L⁻¹) e o cálcio (ME:
440 $0,4 \pm 0,05$; Controle: $1,4 \pm 0,04$ nmol.L⁻¹) tiveram queda e somente a glicose (ME:
441 $117,2 \pm 4,4$; Controle: $187 \pm 5,4$ nmol.L⁻¹) teve um aumento.

442

443 **4. Discussão**

444

445 **4.1. Comportamento natatório**

446

447 Em relação à velocidade de nado houve diferenças significativas entre o
448 tratamento comparado com o controle. Esta diferença pode ser devido ao estresse em
449 cativeiro que com o uso do maleato de enalapril diminuiu as concentrações de cortisol e
450 assim diminuindo a velocidade de nado. O uso de IECA (captopril) diminuiu as
451 concentrações de cortisol no sangue (Kenyon et al. 1985; Tierney et al. 1995). O
452 cortisol é o principal componente para a resposta primária ao estresse e está relacionado
453 ao bem estar assim como afeta funções fisiológicas e cerebrais modificando o
454 comportamento, aumentando a agressividade (Ellis et al. 2012). O enalapril por alterar o
455 metabolismo energético pode afetar o desempenho de nado. Testes de cortisol no robalo
456 (*Dicentrarchus labrax*) mostrou que os peixes tratados com cortisol nadaram melhor e
457 em maior distância do que o controle (Carbonara et al. 2010), mostrando que há uma
458 relação entre o cortisol e a velocidade de nado, como aconteceu neste estudo.

459 Neste estudo as garoupas mostraram os níveis de catecolaminas, glicose e cálcio
460 maiores previamente a realização do choque osmótico. As práticas na piscicultura
461 apresentam muitas situações onde o estresse e danos físicos podem fortemente aumentar
462 a susceptibilidade de ocorrer patologias e um destes casos pode ser explicado pelo
463 comportamento da garoupa em ambiente de cativeiro (Ashley, 2007) e as etapas do
464 estresse no organismo envolvem aumentos nas catecolaminas, cortisol e glicose, o que
465 ocorreu com o controle comparado com o tratamento com o Maleato de Enalapril. Este
466 foi o primeiro estudo com o uso de fármacos IECA no comportamento em cativeiro de
467 peixes teleósteos.

468

469 **4.2. Choque osmótico – agente estressor**

470

471 O Maleato de Enalapril diminuiu as concentrações sorológicas de catecolaminas
472 em todos os tempos comparado com o controle. Em truta arco-íris (*Oncorhynchus*
473 *mykiss*) com o uso de lisinopril (10^{-4} mol.kg⁻¹) diminuiu significativamente a liberação
474 de catecolaminas e a quantidade basal comparado com o controle (Bernier et al. 1999).
475 A Ang II pode agir como um potente secretagogo não-colinérgico de adrenalina
476 humoral em truta, atuando na liberação de catecolaminas, como observado no estudo de

477 Bernier & Perry (1999). Dessa forma agindo na ativação do sistema nervoso autônomo
478 simpático no qual está envolvida a resposta primária do estresse (Bernier et al. 1999;
479 Bernier e Perry 1999; Carey & Padia 2008). Portanto o uso o Maleato de Enalapril por
480 inibir a formação de Ang II diminuiu as concentrações de catecolaminas, como ocorreu
481 no presente estudo.

482 Entre os tempos avaliados o cortisol apresentou diferença significativa somente
483 no choque osmótico entre controle e tratamento. Estudos com tratamento de cortisol têm
484 sido mostrados para aumentar a tolerância à água salgada em peixes (Mommsen et al.
485 1999; Wen-Ching et al. 2012). No trabalho de Wen-Ching et al. (2012) os níveis
486 sorológicos de cortisol e glicose de peixes transferidos de 24 para 29 e 34% de água
487 salgada da garoupa *E. malabaricus* aumentou significativamente após 10 e 20 min,
488 respectivamente. Sem diferenças significativas nos níveis de cortisol e glicose
489 sorológicos foram observados para os peixes após 30 min em todos os tratamentos,
490 diferente do presente estudo (*E. marginatus*). Em água doce houve uma diminuição das
491 concentrações de cortisol assim como no presente estudo, mostrando que o cortisol está
492 envolvido na transferência para água salgada. E no bagre (*S. barba*) (Wong et al. 2006)
493 quando foram testados em diferentes salinidades, aqueles que estavam em água salobra
494 (6 e 13‰) estiveram com mais baixos níveis de cortisol do que aqueles na água salgada
495 (33‰). Portanto, aumento dos níveis de cortisol no choque osmótico da garoupa explica
496 o estresse primário e na tolerância a água salgada.

497 O SRA possui significância fisiológica no controle da secreção de cortisol
498 segundo Perrott e Balment (1990). A administração do ME nas garoupas houve uma
499 redução sorológica de cortisol em todos os tempos. Em linguado (*P. flesus*) o uso de
500 captopril (72mg.Kg^{-1}) junto com papaverina (relaxante de músculo liso) diminuiu os
501 níveis de cortisol circulante (Perrott e Balment 1990). Enquanto, no bagre (*Sparus*
502 *barba*) a injeção intra-arterial de captopril (500nmol.100g^{-1}) diminuiu os níveis de
503 cortisol em peixes na água salgada a 33 e 6‰ (Wong et al. 2006). No presente estudo o
504 uso do maleato de enalapril reduziu significativamente as concentrações de cortisol
505 mostrando a relação com o SRA.

506 Nos níveis de glicose na garoupa apresentou aumento durante os tempos de
507 recuperação (2 e 6h) comparado com antes do choque e durante o choque osmótico
508 entre os dois tratamentos, depois dos aumentos de cortisol e de catecolaminas em que

509 nos tempos de recuperação houve uma queda nos dois parâmetros, provando que a
510 hiperglicemia mostra como um mecanismo de estresse secundário, onde há a
511 mobilização de metabólitos para a corrente sanguínea (McCornick 2001). E o
512 tratamento com Maleato de Enalapril houve queda das concentrações de glicose em
513 todos os tempos comparado com o controle.

514 O estresse provoca aumentos nos níveis plasmáticos de glicose. Elevações dos
515 níveis de glicose no plasma são geradas inicialmente por glicogenólise mediada por
516 catecolaminas e, em estágios tardios, gluconeogênese mediada por cortisol (Mommsen
517 et al. 1999; Begg e Pankhurst 2004). De acordo com Wagner et al. (2003) tem sido
518 demonstrado que somente as catecolaminas podem aumentar os níveis de açúcares. O
519 cortisol ativa processos de glicogenólise e gluconeogênese em peixes; mas também
520 causa o aumento das células cromafins na liberação de catecolaminas, o qual aumenta
521 mais a glicogenólise e modula as funções respiratórias e cardiovasculares (Reid et al.
522 1998). Este processo aumenta os níveis de substrato (Glicose) para produzir bastante
523 energia de acordo com a demanda (Martinez-Porchas et al. 2009). Hiperglicemia é
524 assim considerada como o mais comum indicador de estresse devido aos níveis de
525 cortisol e adrenalina elevados (Barton et al. 2002). Para a garoupa *E. malabaricus* a
526 glicose aumentou diretamente com a salinidade e o tempo de exposição (Wen-Ching et
527 al. 2012), assim como em *E. marginatus*, mostrando que no presente que a glicose
528 possui relação com o estresse secundário.

529 Na garoupa no tratamento houve uma diminuição das concentrações sorológicas
530 de sódio na transferência da água salgada para água doce, enquanto que no controle as
531 concentrações mantiveram inalteradas. No salmão do atlântico da transferência da água
532 doce para a água salgada houve um aumento dos níveis plasmáticos de Na^+ e Cl^- na
533 concentração de 200mg.Kg^{-1} de enalapril (Fuentes & Eddy, 1997). No linguado (*P.*
534 *flesus*) (Bond et al. 2002) as concentrações plasmáticas de sódio e cloreto foram 14-
535 17% mais baixas em água doce comparado a água salgada, embora os de cálcio de
536 magnésio mantiveram inalterados no linguado os da garoupa mantiveram inalterados.
537 No salmão (*Salmo gairdneri*) em que se avaliou a captura associada com a remoção do
538 peixe no aquário o estresse resultou no aumento das concentrações plasmáticas de
539 cortisol, um pequeno aumento da glicose, Na^+ e Mg^{+2} e uma queda nos níveis de
540 potássio (Laidley e Leatherland 1988), assim como verificado na garoupa. Enquanto que

541 os níveis de cálcio aumentaram no controle comparado com o tratamento como na truta
542 arco-íris, que neste estudo o cortisol exerce efeitos hipercalcêmicos por estimular a
543 entrada de Ca^{+2} da água e que este forma uma parte intrínseca das ações
544 mineralocorticoides estabelecida do cortisol em peixes (Filk e Perry 1989). Um dos
545 mecanismos pelo qual o cortisol aclimata os peixes em água salgada é por diferenciação
546 celular das células de cloreto e por estimulação da enzima $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$. Ele pode
547 estar envolvido na produção de glicose para prover energia para síntese de proteínas e a
548 ativação da bomba de sódio na água salgada (Mommsen, 1999) e ele tem sido mostrado
549 para estimular a entrada de cálcio e a bomba de sódio branquial na truta arco-íris em
550 água doce (Flik e Perry, 1989).

551

552 **5. Conclusões**

553 Podemos concluir que o maleato de enalapril (10mg.Kg^{-1}) atenuou o estresse em
554 peixes no ambiente de produção de acordo com a redução da velocidade de nado, assim
555 como na concentrações de cortisol, catecolaminas e glicose. Entretanto não alteraram as
556 concentrações iônicas sanguíneas dos peixes entre os tratamentos, podendo ser usado na
557 aquicultura para aclimatizar uma espécie ao ambiente de produção.

558

559 **6. Agradecimentos**

560 Agradecemos a contribuição do Prof. MsC. Luis André Luz Barbas e do Dr.
561 Ricardo Vieira Rodrigues ao estudo. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de
562 Ensino Superior (CAPES) pelo suporte financeiro, da Doutora Bioquímica pelas
563 Análises sanguíneas, do Laboratório de Piscicultura Marinha e Estuarina e Laboratório
564 de Imunologia e Patologia de Organismos Aquáticos pelo apoio técnico e pela diretora
565 de cinema Florencia Romano da Universidade do Cinema em Buenos Aires, Argentina.

566

567 **7. Referências**

568 Aminot, A., Chaussepied, M., 1983. Manual des Analyses chimiques en milieu marin
569 (Manual of chemical analysis in marine medium). Brest, CNEXO. 395p.
570 APHA – American Public Health Association, 1998. Standard methods for the
571 examination of water and freshwater. Washington, USA. 1193p.

572 Arnold-Reed, D.E., Balment, R.J., 1994. Peptide hormones secretion of cortisol in the
573 trout. *Gen. Comp. Endocrinol.* 96, 85-91.

574 Barton, B.A., 2002. Stress in Fishes: A Diversity of Responses with Particular
575 Reference to Changes in Circulating Corticosteroids. *Integ. and Comp. Biol.* 42,517–
576 525.

577 Begg, K., Pankhurst, N.W., 2004. Endocrine and metabolic responses to stress in a
578 laboratory population of the tropical damselfish *Acanthochromis polyacanthus*. *J. Fish*
579 *Biol.* 64, 133–145.

580 Bernier, N.J., Kaiya, K., Takei, Y., Perry, S.F., 1999. Mediation of humoral
581 catecholamine secretion by the renin–angiotensin system in hypotensive rainbow trout
582 (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Endocrinol.* 160,351–363.

583 Bernier, N.J., Perry, S.F., 1999. Cardiovascular effects of angiotensin-II-mediated
584 adrenaline release in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *J. Exp. Biol.* 202, 55–66.

585 Bond, H., Winter, M.J., Warne, J.M., McCrohan, C.R., Balment, R.J. 2002. Plasma
586 Concentrations of Arginine Vasotocin and Urotensin II Are Reduced Following
587 Transfer of the Euryhaline Flounder (*Platichthys flesus*) from Seawater to Fresh Water.
588 *Gen. Comp. Endocrinol.* 120, 113-120.

589 Brown, J.A., Hazon, N., 2007. The Renin-Angiotensin Systems of Fish and their roles
590 in Osmoregulation, In: Baldisseroto, B., Mancera, J.M., Kapoor, B.G., (Eds), *Fish*
591 *Osmoregulation*. Science Publishers, Enfield, pp. 85-134.

592 Carey, R.M., Padia, S.H., 2008. Angiotensin AT2 receptors: control of renal sodium
593 excretion and blood pressure. *Trends Endocrinol. Metab.* 19, 84–87.

594 Caberoy, N.B., Quintio, G.F., 2000. Changes in Na⁺, K⁺ -ATPase activity and gill
595 chloride cell morphology in the grouper *Epinephelus coioides* larvae and juveniles in
596 response to salinity and temperature. *Fish Physiol. Biochem.* 23, 83-94.

597 Carbonara, P., Corsi, I., Focardi, S., Lembo, G., Rochira, S., Scolamacchia, M.,
598 Spedicato, M.T., Scott, R., 2010. The effects of stress induced by cortisol administration
599 on the repeatability of swimming performance tests in the European sea bass
600 (*Dicentrarchus labrax* L.). *Mar. Freshw. Behav. Phy.* 43(4), 283-296.

601 Ellis, T., Yildiz, H.Y., López-Olmeda, J., Spedicato, M.T, Tort, L., Øverli, Ø., Martins,
602 C.I.M., 2012. Cortisol and finfish welfare. *Fish Physiol. Biochem.* 38,163-188.

603 Estudillo, C.B., Duray, M.N., 2003. Transport of hatchery-reared and wild grouper
604 larvae, *Epinephelus* sp. *Aquaculture* 219,279–290.

605 Fennessy, S.T., 2006. Reproductive biology and growth of the yellowbelly rockcod
606 *Epinephelus marginatus* (Serranidae) from South-East Africa. *Afr. J. Mar. Sci.* 28, 1-11.

607 Figueiredo, J.L., Menezes, N.A., 2000. Manual de peixes marinhos do Sudeste do
608 Brasil. USP, São Paulo.

609 Flik, G., Perry, S.F., 1989. Cortisol stimulates whole body calcium uptake and the
610 branchial calcium pump in freshwater rainbow trout. *J. Endocrinol.* 120, 75–82.

611 Fuentes, J., Eddy, F.B., 1997. Effect of manipulation of the renin-angiotensin system in
612 control of drinking in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in fresh water and after
613 transfer to sea water. *J. Comp. Physiol. B* 167, 438-443.

614 Kenyon, C.J., Mckeever, A., Oliver, J.A., Henderson, I.W., 1985. Control of Renal and
615 Adrenocortical Function by the Renin- Angiotensin System in Two Euryhaline Teleost
616 Fishes. *Gen. Comp. Endocrinol.* 58, 93-100.

617 Laidley, C.W., Leatherland, J.F., 1988. Cohort sampling, anaesthesia and stocking-
618 density on plasma cortisol, thyroid hormone, metabolite and ion levels in rainbow trout,
619 *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Biol.* 33, 73–88.

620 Martinez-Porchas, M., Martinez-Cordova, L.R., Ramos-Enriques, R., 2009. Cortisol and
621 Glucose: Reliable indicators of fish stress? *Panam. J. Aquat. Sci.* 4, 158-178.

622 McCormick, S.D., 2001. Endocrine control of osmoregulation in fish. *Am. Zool.* 282,
623 290–300.

624 Mommsen, T.P., Vijayan, M.M., Moon, T.W., 1999. Cortisol in teleosts: dynamics,
625 mechanisms of action, and metabolic regulation. *Rev. Fish Biol. Fish* 9, 211-268.

626 Perrott, M.N., Balment, R.J., 1990. The Renin-Angiotensin System and the Regulation
627 of Plasma Cortisol in the Flounder, *Platichthys flesus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 78, 414-
628 420.

629 R Development Core Team. 2009. R: A language and environment for statistical
630 computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-
631 07-0. Disponível em: <<http://www.rproject.org>>. Acesso em: 24 nov 2013.

632 Reid, S.G., Bernier, N.J., Perry, S.F., 1998. The adrenergic stress response in fish:
633 control of catecholamine storage and release. *Comp. Biochem. Physiol. C* 120, 1–27.

634 Tierney, M.L., Luke, G., Cramb, G., Hazon, N., 1995. The role of the renin-angiotensin
635 system in the control of blood pressure and drinking in the European eel, *Anguilla*
636 *anguilla*. Gen. Comp. Endocrinol. 100, 39-48.

637 Wagner, G.N., Singer, T.D., Mckinley, R.S., 2003. The ability of clove oil and MS-222
638 to minimize handling stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). Aquac.
639 Res. 34, 1139-1146.

640 Wen-Ching, T., Jiann-Chu, C., Sha-Yen, C., 2012. The effects of a sudden salinity
641 change on cortisol, glucose, lactate, and osmolality levels in grouper *Epinephelus*
642 *malabaricus*. Fish Physiol. Biochem. 38, 1323-1329.

643 Wong, M.K.S., Takei, Y., Woo, N.Y.S., 2006. Differential status of the renin –
644 angiotensin system of silver sea bream (*Sparus sarba*) in different salinities. Gen.
645 Comp. Endocrinol. 149, 81-89.

646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665

666 **4. Conclusões gerais**

667 Podemos concluir que o maleato de enalapril (10mg.Kg^{-1}) diminuiu a velocidade
668 de nado, diminuindo o estresse em peixes em cativeiro o qual foi atenuante em todos os
669 parâmetros comparados com o controle, podendo ser usado na aquicultura para
670 aclimatizar uma espécie ao ambiente de produção por reduzir as concentrações de
671 catecolaminas e glicose. Entretanto os dados iônicos não apresentaram diferenças entre
672 os tempos avaliados somente no controle e tratamento.

673

674

675

676

677

678

679

680

681

682

683

684

685

686

687

688

689

690

691

692

693

694

695

696

697

698 **5. Referências**

- 699 ANDERSON, S, HG RENNKE & BM BRENNER. 1986. Therapeutic advantage of
700 converting enzyme inhibitors in arresting progressive renal disease associated
701 with systemic hypertension in the rat. *J. Clin. Invest.* 77(6): 1993-2000.
- 702 ASHLEY, PJ. 2007. Fish welfare: Current issues in aquaculture. *Appl. Anim. Behav.*
703 *Sci.*104:199–235.
- 704 BALDISSEROTTO B. 2009. Fisiologia de Peixes aplicada a Piscicultura. 2 ed. Santa
705 Maria, Editora UFSM. 352p.
- 706 BERNIER, NJ, H KAIYA, Y TAKEI & SF PERRY. 1999. Mediation of humoral
707 catecholamine secretion by the renin–angiotensin system in hypotensive
708 rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *J. Endocrinol.* 160:351–363.
- 709 BERNIER, NJ & SF PERRY. 1999. Cardiovascular effects of angiotensin-II-mediated
710 adrenaline release in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *J. Exp. Biol.* 202:
711 55–66.
- 712 BUTLER, DG & JA BROWN. 2007. Stanniectomy attenuates the renin–angiotensin
713 response to hypovolemic hypotension in freshwater eels (*Anguilla rostrata*) but
714 not blood pressure. *J. Comp. Physiol.*177:143–151.
- 715 CABEROY, NB & GF QUNITIO. 2000. Changes in Na⁺, K⁺ -ATPase activity and gill
716 chloride cell morphology in the grouper *Epinephelus coioides* larvae and
717 juveniles in response to salinity and temperature. *Fish Physiol. Biochem.* 23:
718 83-94.
- 719 CHOU, R & HB LEE. 1997. Commercial marine fish farming in Singapore. *Aquac.*
720 *Res.* 28(10): 767-776.
- 721 COBB, CS, R WILLIAMSON & JA BROWN. 1999. Angiotensin II-Induced Calcium
722 Signalling in Isolated Glomeruli from Fish Kidney (*Oncorhynchus mykiss*) and
723 Effects of Losartan, *Gen. Comp. Endocrinol.* 113:312–321.
- 724 DAVIES, RO, H J GOMEZ, JD IRVIN & JF WALKER. 1984. An overview of the
725 clinical pharmacology of enalapril. *Br. J. clin. Pharmac.* 18: 215-229.
- 726 DAWKINS, MS 2003. Behaviour as a tool in the assessment of animal welfare. *Zool.*
727 106, 383–387.
- 728 DAWKINS, MS 2004. Using behaviour to assess animal welfare. *Anim. Welfare* 13,
729 S3–S7.

- 730 DOI, M, MBH MOHD-NAWI, NRB NIKLAH & ZB TALIB. 1991. Artificial
731 propagation of the grouper *Epinephelus suillus* at the marine finfish hatchery in
732 Tanjong Demong, Terengganu, Malaysia. Technical Report No. 167. Dept. of
733 Fisheries, Ministry of Agriculture, Malaysia.
- 734 FAO. 2010. The state of World Fisheries and Aquaculture. Disponível em:
735 <ftp://ftp.fao.org/FI/STAT/summary/a-0a.pdf>. Acesso em: 21 set 2013.
- 736 FENNESSY, ST. 2006. Reproductive biology and growth of the yellowbelly rockcod
737 *Epinephelus marginatus* (Serranidae) from South-East Africa. *Afr. J. Mar. Sci.*
738 28: 1-11.
- 739 FIGUEIREDO JL, NA MENEZES. 2000. Manual de peixes marinhos do Sudeste do
740 Brasil. USP, São Paulo.
- 741 FOURNIER, D, FC LUFT, M BADER, D GANTEN & MA ANDRADE-NAVARRO.
742 2012. Emergence and evolution of the renin–angiotensin–aldosterone system.
743 *J. Mol. Med.* 90:495–508.
- 744 FRANCO, RP, T CHAMPION, JPE PASCON, GB PEREIRA-NETO, D PAULINO-
745 JUNIOR & AA CAMACHO. 2011. Utilização do Maleato de Enalapril,
746 Furosemida, Espironolactona e suas associações em cães com doença
747 degenerativa mixomatosa da válvula mitral. *ARS Veterinária* 27(2): 85-93.
- 748 FUENTES, J & FB EDDY. 1997. Effect of manipulation of the renin-angiotensin
749 system in control of drinking in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar* L) in
750 fresh water and after transfer to sea water. *J. Comp. Physiol. B* 167: 438-443.
- 751 FURIMSKY, M, TW MOON & SF PERRY. 1996. Calcium signalling in isolated single
752 chromaffin cells of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Comp Physiol*
753 *B* 166: 396–404.
- 754 GARDNER, SY, CE ATKINS, RA SAMS, AB SCHWABENTON & MG PAPICH.
755 2004. Characterization of the Pharmacokinetic and Pharmacodynamic
756 Properties of the Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor, Enalapril, in
757 Horses. *J. Vet. Intern. Med.* 18 (2):231–237.
- 758 GLAMUZINA, B, B SKARAMUCA, N GLAVIC & V KOZUL. 1998. Preliminary
759 studies on reproduction and early life stages in rearing trial with dusky grouper,
760 *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834). *Aquac. Res.* 29(10): 769-771.

761 HUNTINGFORD, FA. 2004. Implications of domestication and rearing conditions for
762 the behaviour of cultivated fishes. *J. Fish Biol.* 65(A): 122–142.

763 IWAMA, GK, MM VIJAYAN, RB FORSYTH & PA ACKERMEN. 1999. Heat shock
764 proteins and physiological stress in fish. *Amer. Zool.* 39:901 – 909.

765 KENYON, CJ, A MCKEEVER, JA OLIVER & IW HENDERSON. 1985. Control of
766 Renal and Adrenocortical Function by the Renin- Angiotensin System in Two
767 Euryhaline Teleost Fishes. *Gen Comp. Endocrinol.* 58: 93-100.

768 LAIZ-CARRIÓN, R, MP MARTÍN DEL RÍO, JM MÍGUEZ, JM MANCERA & JL
769 SOENGAS. 2003. Influence of cortisol on osmoregulation and energy
770 metabolism in gilthead seabream *Sparus aurata*. *J. Exp. Zool. A* 298: 105–118.

771 LAPNER, KN & SF PERRY. 2001. The role of angiotensin II in regulating
772 catecholamine secretion during hypoxia in rainbow trout *Oncorhynchus*
773 *mykiss*. *J. Exp. Biol.* 204: 4169–4176.

774 LE MÉVEL, JC, F LANCIEN, N MIMASSI & J. MICHAEL CONLON. 2012. Brain
775 neuropeptides in central ventilatory and cardiovascular regulation in trout.
776 *Front. Endocrinol.* 3:1-15.

777 LEEDOM, TA, T HIRANO & EG GRAU. 2003. Effect of blood withdrawal and
778 angiotensin II on prolactin release in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*.
779 *Comp. Biochem. Physiol. A* 135:155–163.

780 MANCERA, JM, R LAIZ-CARRIÓN & MP MARTÍN DEL RÍO. 2002.
781 Osmoregulatory action of PRL, GH, and cortisol in the gilthead seabream
782 (*Sparus aurata* L.). *Gen. Comp. Endocrinol.* 129: 95–103.

783 MARSIGLIANTE, S, A MUSCELLA, GP VINSON & C STORELLI. 1997.
784 Angiotensin II receptors in the gill of sea water- and freshwater-adapted eel. *J.*
785 *Mol. Endocrinol.* 18: 67–76.

786 MARSIGLIANTE, S, A MUSCELLA, S BARKER & C STORELLI. 2000.
787 Angiotensin II modulates the activity of the Na⁺/K⁺ATPase in eel kidney. *J.*
788 *Endocrinol.* 165: 147–156.

789 MARSIGLIANTE, S, A MUSCELLA, S GRECO, MG ELIA, S VILELLA & C
790 STORELLI. 2001. Na⁺/K⁺ATPase activity inhibition and isoform-specific
791 translocation of protein kinase C following angiotensin II administration in
792 isolated eel enterocytes. *J. Endocrinol.* 168:339–346.

793 MARTINEZ-PORCHAS, M, LR MARTINEZ-CORDOVA & R RAMOS-ENRIQUES.
794 2009. Cortisol and Glucose: Reliable indicators of fish stress? *Panam. J.*
795 *Aquat. Sci.* 4:158-178.

796 MARTINS, CIM, L GALHARDO, C NOBLE, B DAMSGÅRD, MT SPEDICATO, W
797 ZUPA, M BEAUCHAUD, E KULCZYKOWSKA, JC MASSABUAU, T
798 CARTER, SR PLANELLAS & T KRISTIANSEN. 2012. Behavioural
799 indicators of welfare in farmed fish. *Fish. Physiol. Biochem.* 38:17–41.

800 MCCORMICK, SD. 2001. Endocrine control of osmoregulation in fish. *Amer. Zool.*
801 282: 290–300.

802 MOMMSEN TP, MM VIJAYAN, TW MOON. 1999. Cortisol in teleosts: dynamics,
803 mechanisms of action, and metabolic regulation. *Rev Fish Biol Fish* 9:211-268.

804 MPA. 2011. Boletim estatístico da Pesca e Aquicultura. Disponível em:
805 <[http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes_e_Estatisticas/Boletim%20](http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes_e_Estatisticas/Boletim%20MPA%202011FINAL2.pdf)
806 [MPA%202011FINAL2.pdf](http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes_e_Estatisticas/Boletim%20MPA%202011FINAL2.pdf)>. Acesso em: 21 set 2013.

807 PANKHURST, NW. 2011. The endocrinology of stress in fish: An environmental
808 perspective. *Gen. Comp. Endocrinol.* 170: 265–275.

809 PERROTT, MN & RJ BALMENT. 1990. The Renin-Angiotensin System and the
810 Regulation of Plasma Cortisol in the Flounder, *Platichthys flesus*. *Gen. Comp.*
811 *Endocrinol.* 78:414-420.

812 PRODOCIMO, V, F GALVEZ, CA FREIRE & CM WOOD. 2007. Unidirecional Na⁺
813 and Ca⁺² fluxes in two euryhaline teleost fishes, *Fundulus heteroclitus* and
814 *Oncorhynchus mykiss*, acutely submitted to a progressive salinity increase. *J*
815 *Comp Physiol B* 177: 519-528.

816 RAMOS, FM, SANCHES EG, FUJIMOTO RY, COTTENS KF & CERQUEIRA VR.
817 2012. Crescimento de juvenis da garoupa-verdadeira *Epinephelus marginatus*
818 submetidos a diferentes dietas. *Bol. Inst. Pesca*, São Paulo, 38(1): 81 – 88.

819 RANDALL, DJ & SF PERRY. 1992. Catecholamine. In: Hoar, WS, DJ Randall, TP
820 Farrell (eds) *Fish Physiology*, Vol. XII, Academic Press, New York.

821 REGOLI, D, GE PLANTE & F GOBEIL JR. 2012. Impact of kinins in the treatment of
822 cardiovascular diseases, *Pharmacol. Ther.* 135: 94–111.

- 823 REID, SG, NJ BERNIER & SF PERRY. 1998. The adrenergic stress response in fish:
824 control of catecholamine storage and release. *Comp. Biochem. Physiol. C* 120:
825 1–27.
- 826 ROMANO, LA. 2004. Estudio de la expresión fenotípica de la renina durante la
827 inhibición de la enzima convertidora de la Angiotensina I en Carpa Koi. III
828 Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura, 634-645.
- 829 RUZZANTE, DE. 1994. Domestication effects on aggressive and schooling behavior
830 in fish. *Aquacul.* 120: 1-24.
- 831 SANCHES, EG, OLIVEIRA IR & SERRALHEIRO PCS. 2009. Crioconservação do
832 Sêmen da garoupa-verdadeira *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834)
833 (Teleostei, Serranidae). *B. Inst. Pesca*, São Paulo, 35(3): 389 – 399a.
- 834 SANCHES, EG, OLIVEIRA IR & SERRALHEIRO PCS. 2009. Inversão sexual da
835 garoupa-verdadeira *Epinephelus marginatus*. *Rev. Bras. Saúde Prod. An.*
836 10(1): 198-209b.
- 837 SKIDGEL, RA & EG ERDÖS. 2004. Angiotensin converting enzyme (ACE) and
838 neprilysin hydrolyze neuropeptides: a brief history, the beginning and follow-
839 ups to early studies, *Peptides* 25:521–525.
- 840 STIEFEL, P, AJ VALLEJO-VAZ, S GARCÍA-MORILLO & J VILLAR. 2011. Role
841 of the Renin-Angiotensin System and Aldosterone on Cardiometabolic
842 Syndrome. *Int. J. Hypertens.*, 2011:1-8.
- 843 TAKEI, Y & T TSUCHIDA. 2000. Role of the renin-angiotensin system in drinking of
844 seawater-adapted eels *Anguilla japonica*: a reevaluation. *Am. J. Physiol.*
845 *Regulatory Integrative Comp Physiol* 279: 1105–1111.
- 846 TIERNEY, ML, G LUKE, G CRAMB & N HAZON. 1995. The role of the renin-
847 angiotensin system in the control of blood pressure and drinking in the
848 European eel, *Anguilla anguilla*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 100:39-48.
- 849 TAUGNER, R & E HACKENTHAL. 1989. The Juxtaglomerular Apparatus: Structure
850 and Function. Springer-Verlag: Alemanha.
- 851 WEN-CHING, T, C JIANN-CHU & C SHA-YEN. 2012. The effects of a sudden
852 salinity change on cortisol, glucose, lactate, and osmolality levels in grouper
853 *Epinephelus malabaricus*. *Fish Physiol. Biochem.* 38: 1323-1329.

- 854 WENDEELAR-BONGA, SE. 1997. The stress response in fish. *Physiol. Rev.* 77:591-
855 625.
- 856 WILLIAMS, GH. 1988. Converting-enzyme inhibitors in the treatment of hypertension.
857 *N. Engl. J. Med.* 319: 1517–1525.
- 858 WONG, MKS, Y TAKEI & NYS WOO. 2006. Differential status of the renin –
859 angiotensin system of silver sea bream (*Sparus sarba*) in different salinities.
860 *Gen. Comp. Endocrinol.* 149: 81-89.
- 861 ZABALA, M, A GARCIA- RUBIES, P LOUISY & E SALA. 1997. Spawning
862 behaviour of the Mediterranean dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe,
863 1834) (Pisces, Serranidae) in the Medes Islands Marine Reserve (NW
864 Mediterranean, Spain). *Sci Mar*, 61:65-77a.
- 865 ZABALA, M, P LOUISY, A GARCIA-RUBIES & V GRACIA. 1997. Socio-
866 behavioural context of reproduction in the Mediterranean dusky grouper
867 *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) (Pisces, Serranidae) in the Medes
868 Islands Marine Reserve (NW Mediterranean, Spain). *Sci Mar*, 61: 78-98b.
- 869 ZHUO, JL & XC LI. 2011. New insights and perspectives on intrarenal renin-
870 angiotensin system: Focus on intracrine/intracellular angiotensin II.
871 *Peptides* 32: 1551–1565.