

**VIRGÍNIA FONSECA PEDROSA**

**ALTERAÇÕES VASCULARES EM BELJUPIRÁS CULTIVADOS EM SISTEMA  
*OFFSHORE***

**RECIFE**

**2014**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

**VIRGÍNIA FONSECA PEDROSA**

**ALTERAÇÕES VASCULARES EM BEIJUPIRÁ CULTIVADO EM SISTEMA  
*OFFSHORE***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Veterinária.

Orientadora:  
Profa. Dra. Emiko Shinozaki Mendes

Co-orientadores:  
Prof. Dr. Fernando Leandro dos Santos  
Prof. Dr. Luis Alberto Romano

**RECIFE**

**2014**

Ficha catalográfica

P372a      Pedrosa, Virgínia Fonseca  
              Alterações vasculares em beijupirás cultivados em sistema *offshore* / Virgínia Fonseca Pedrosa. – Recife, 2014.  
              85 f. : il.

              Orientadora: Emiko Shinozaki Mendes.  
              Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) –  
              Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Medicina Veterinária, Recife, 2014.  
              Referências.

              1. Aterosclerose 2. Degeneração 3. Hiperplasia  
              4. Histopatologia 5. Morfometria 6. *Rachycentron canadum*  
              I. Mendes, Emiko Shinozaki, orientadora II. Título

CDD 636.089

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

**ALTERAÇÕES VASCULARES EM BEIJUPIRÁS CULTIVADOS EM SISTEMA  
*OFFSHORE***

Tese de Doutorado elaborada por  
**VIRGÍNIA FONSECA PEDROSA**

Aprovada em ...../...../.....

**BANCA EXAMINADORA**

Profa. Dra. EMIKO SHINOZAKI MENDES

Orientador – Departamento de Med. Veterinária da UFRPE

Prof Dr. LUIS ALBERTO ROMANO

Universidade Federal do Rio Grande-FURG (Membro externo)

Profa. Dra. ANDREA ALICE DA FONSECA OLIVEIRA

Departamento de Med. Veterinária da UFRPE

Profa. Dra. MÁRCIA DE FIGUEIREDO PEREIRA

Departamento de Med. Veterinária da UFRPE

Dra. FERNANDA SILVA DE MEIRELES

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Pernambuco-IFPE

## DEDICATÓRIA

Ao meu porto seguro, mainha e painho, meus maiores amores. Por todo o amor, dedicação, exemplo de vida. Grata por tudo, por ter sido presenteada com vocês em minha vida. Sinto-me uma pessoa iluminada só em tê-los comigo.  
Ao meu irmão Marquinhos, mesmo distante fisicamente, mas sempre presente em todas as horas.

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal Rural de Pernambuco e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária, em especial ao prof. Dr Hélio Manso e a secretária Lana, por toda atenção prestada ao longo do doutorado;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de doutorado;

Ao Laboratório de Sanidade de Animais Aquáticos (Lasaq) por todas as atividades desempenhadas em suas instalações durante a parte experimental do trabalho;

Ao Laboratório de Imunologia e Patologia de Organismos Aquáticos (LIPOA), da Universidade Federal de Rio Grande (FURG) por toda disponibilidade de suas instalações durante as análises complementares do trabalho, assim como ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da mesma entidade por todo aprendizado adquirido ao longo do período em que lá permaneci;

Ao Ministério da Pesca e Aquicultura – MPA pelo auxílio financeiro ao Projeto Cação de Escama;

À professora Dra Emiko Shinozaki Mendes pela orientação não somente em pesquisas, mas muitas vezes pessoal, durante o longo período em que trabalhamos juntas, além da confiança e incentivo no meu crescimento profissional;

Ao professor Dr Fernando Leandro dos Santos por toda confiança e auxílio indispensável na realização de meus trabalhos de pesquisa e por todo o risco aceito ao começarmos a trabalhar em uma área nova para todos nós;

Ao professor Dr Luís Alberto Romano primeiramente pela amizade e inspiração em seguir adiante nas pesquisas, além do auxílio permanente em todas as análises realizadas para finalizar o trabalho;

Ao professor Dr Ronaldo Olivera Cavalli e toda equipe do Laboratório de Piscicultura Marinha do Departamento de Pesca e Aquicultura da UFRPE, pela parceria realizada no projeto “Cação de Escama” e fornecimento dos animais requeridos para realização desta pesquisa;

À Paula Tiyemi Shinozaki Mendes e Roberto Ferreira Manghi pela ajuda incomensurável na estatística, que salvaram meus neurônios de um surto, obrigada pela ajuda intelectual e de desabafos;

A todos os professores, estudantes e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária da UFRPE e da Pós-Graduação em Aquicultura na FURG, por toda colaboração e ensinamento repassado;

Aos meus amigos de trabalho do Laboratório de Sanidade de Animais Aquáticos, por todo convívio, colaborações diárias nas pesquisas e desabafos. O menino Johny (João Guimarães), minha compa Monique Monteiro, Susu (Suely Bezerra), Kerolyne (Carolina Notaro), Rô

(Rodrigo Zeymer), Juju (Juliana Carvalho), Laelia Felix, Bio (Fabíola Carneiro), Alexandre Duarte, Arthur Vinicius, Renata Salgueiro e todos os outros que participaram de uma forma ou de outra das atividades do laboratório;

Aos amigos que fiz no Laboratório de Imunologia e Patologia de Organismos Aquáticos (LIPOA), Angélica Reis, Marta Klosterhoff, Fabiane Führ, Bianca Lopes, Bárbara Hostins, por todos os momentos preciosos que tanto me ajudaram na minha estadia gaúcha. Chimas, conversas, churrascos e coletas;

Aos amigos queridos do Cassino, por terem me dado tantas alegrias e carinho imenso no período em que estive longe da família. Churrascos, sorrisos, lamúrias, todo convívio maravilhoso que vocês me proporcionaram. Cito alguns, mas os não citados não deixam de ter importância emocional em minha vida: Leonardo Rocha, William Bauer, Juliana Padula, Joquinha (Joaquin Sanchez), Perla Couto, Nela Schuster, Bruna Ost Mergen, Raiza Azevedo, Shakirita (Adriana Salgado), Paula Beck, Luísa Fernandes, Sabrina Suita, Cami Dal, Juan Zamora e Isabel Moreno, Janaína Pedron, Marcelo Okamoto, o barba ruiva querido Ricardo Arruda, André Colferai, Pablo Del Mestre, entre tantos outros que com certeza ficarão para sempre em meu coração;

A todos os meus amigos de Recife, alguns por aqui, outros distantes, mas sempre presentes. Fica bem difícil citar nomes nesse ponto. Faltam páginas e palavras, tantos carnavais e amizade plena, que a tese mudaria de título para “gratidão”;

A toda minha família, tias, primos, sobrinhos e afilhados, pela compreensão nos momentos que precisei ficar ausente por conta dos estudos, por todo amor trocado em todas as etapas de minha vida;

E por fim, a Deus por sua luz sempre presente em minha vida. Sem Ele nada seria possível.

Gratidão eterna a todos!

## **O RIO E O OCEANO**

Diz-se que, mesmo antes de um rio cair no oceano ele treme de medo. Olha para trás, para toda a jornada, os cumes, as montanhas, o longo caminho sinuoso através das florestas, através dos povoados e vê à sua frente um oceano tão vasto que entrar nele nada

mais é do que desaparecer para sempre.

Mas não há outra maneira. O rio não pode voltar.

Ninguém pode voltar. Voltar é impossível na existência. Você pode apenas ir em frente.

O rio precisa se arriscar e entrar no oceano.

E somente quando ele entra no oceano é que o medo desaparece.

Porque apenas então o rio saberá que não se trata de desaparecer no oceano, mas tornar-se oceano.

Por um lado é desaparecimento e por outro lado é renascimento.

Assim somos nós.

Só podemos ir em frente e arriscar.

Coragem! Avance firme e torne-se Oceano!

**Osho**

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	13
2.1 Objetivo Geral .....	13
2.2 Objetivos Específicos .....	13
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	14
3.1 Aquicultura e o Beijupirá ( <i>Rachycentron canadum</i> ) .....	14
3.2 Sistema cardiovascular em teleósteos .....	16
3.3 Estrutura da parede do vaso arterial .....	18
3.4 Estresse ambiental e oxidativo em peixes .....	19
3.5 Lesões arteriais em peixes .....	20
3.6 Fisiopatogenia da aterosclerose .....	21
3.7 Classificação de lesões ateroscleróticas .....	23
3.8 Indicadores de lesão aterosclerótica .....	24
3.9 Sistema Renina-Angiotensina (SRA) e aterosclerose .....	26
<b>4 REFERENCIAS</b> .....	29
<b>5 ARTIGO I</b> .....	38
Hiperplasia em túnicas de artérias coronárias de beijupirás criados em sistema <i>offshore</i> .....	38
<b>6 ARTIGO II</b> .....	58
Morfometria de artérias coronárias de beijupirás com hiperplasia de túnicas.....	58
<b>7 ANEXOS</b> .....	74

## RESUMO

Atualmente existe um crescente interesse no desenvolvimento de projetos visando à implantação do cultivo de beijupirá (*Rachycentron canadum*), necessitando ampliar os conhecimentos acerca das necessidades nutricionais, ciclo reprodutivo e hábito da espécie, principalmente se considerar que estes fatores podem desencadear o aparecimento de doenças, inclusive por patologias circulatórias. Dentre estas, destaca-se a aterosclerose, uma doença inflamatória crônica que conduz a alterações na parede arterial. No presente trabalho, foram pesquisadas doenças vasculares no peixe, sob o ponto de vista da anatomia patológica. Sendo assim, foram avaliadas morfológicamente alterações vasculares em tecidos coletados de beijupirá provenientes de cultivo *offshore* em Pernambuco. Amostras de tecido cardíaco foram coletadas e submetidas à histopatologia e microscopia eletrônica de transmissão (MET), para averiguar a presença de alterações, com posterior identificação de lesões vasculares sugestivas de aterosclerose. As lâminas histológicas foram coradas por hematoxilina-eosina (HE), alcian blue, ácido periódico de Schiffh (PAS) e reticulina de Gomori. Na análise morfométrica 158 vasos arteriais foram avaliados, sendo as imagens analisadas com auxílio de um software. Os dados referentes à proporção da área do lúmen em relação à área da túnica média foram analisados de acordo com os modelos de regressão Beta para taxas e proporções. Foram observadas lesões arteriais em todo período de cultivo, principalmente na parede vascular, com hiperplasia de túnica íntima e média, formação de placa ateromatosa, infiltração de células espumosas e sinais de estenose luminal. Por meio da MET foram observadas alterações na estrutura das coronárias, com espessamento do endotélio e membrana basal, proliferação de fibroblastos e fibras colágenas, com acúmulo de material lipídico subendotelial, resíduos celulares aderidos à membrana basal e vesículas pinocitóticas com presença de lisossomos isolados. Foi constatado que os peixes da espécie *Rachycentron canadum* criados em cativeiro desenvolvem lesão arterial do tipo crônica degenerativa inflamatória e que o aumento no ganho de peso contribui para a redução da área do lúmen, levando a obstrução arterial, possivelmente com envolvimento de fatores nutricionais no surgimento das lesões.

**Palavras-chave:** aterosclerose, degeneração, hiperplasia, histopatologia, morfometria, *Rachycentron canadum*.

## ABSTRACT

Currently there is a growing interest in the development of projects aiming at the implementation of farmed beijupirá (*Rachycentron canadum*), requiring broaden knowledge about nutritional requirements, reproductive cycle and habit of the species, especially considering that these factors can trigger the onset of diseases, including circulatory diseases. Among them, atherosclerosis which is a chronic inflammatory disease that leads to changes in the arterial wall. In the present study, were investigated vascular diseases in fish, in the point of view of pathological anatomy. Thus, were evaluated morphologically vascular changes in tissues collected from beijupirá farmed in *offshore* in Pernambuco. Cardiac tissue samples were collected and submitted to histopathology and transmission electron microscopy (TEM) for the presence of alterations, with subsequent identification of vascular lesions suggestive of atherosclerosis. The histological slides were stained with hematoxylin-eosin (HE), blue alcian, periodic acid of Schiffh (PAS) and reticulin of Gomori. In the morphometric analysis 158 arteries were evaluated, and the images were analyzed with the aid of software. The data concerning to the proportion of the lumen area compared to the area of the media tunic were analyzed according to the Beta regression models for rates and proportions. Arterial lesions were observed throughout the farmed period, especially in the vascular wall, with hyperplasia of intima and media tunic, formation of atheromatous plaque, infiltration of foam cells and signs of luminal stenosis. By means of TEM, were observed changes in the structure of coronary, with thickening of endothelium and basement membrane, proliferation of fibroblasts and collagen fibers, with accumulation of lipid material subendothelial, cell debris adhered in the basement membrane and presence of pinocytotics vesicles with isolated lysosomes. It was found that fish of the specie *Rachycentron canadum* farmed in captivity develop arterial lesion of chronic inflammatory degenerative type, and also it was found that the increase in weight gain contributes to the reduction of the lumen area, leading to arterial obstruction.

**Keywords:** atherosclerosis, degeneration, hyperplasia, histopathology, morphometry, *Rachycentron canadum*.

## 1 INTRODUÇÃO

A aquicultura é uma atividade em crescimento, atingindo elevados números na produção. É vista como uma alternativa para incrementar a oferta de pescado no mundo, de modo a atender a crescente demanda nutricional da população.

Atualmente, a produção total da pesca de captura mundial continua mantendo-se estável, em cerca de 90 milhões de toneladas e nos últimos sete anos (2004-2010) os desembarques de todas as espécies marinhas apresentaram variações entre 72,1 milhões e 73,3 milhões de toneladas. Com relação a peixes provenientes de cultivos, em 2010 a produção mundial foi de 59,9 milhões de toneladas, um aumento de 7,5% a partir de 55,7 milhões de toneladas relatados em 2009 (FAO, 2012).

O cultivo de peixe marinho ainda encontra alguns entraves e no Brasil verificam-se apenas alguns projetos de implantação da atividade em alguns Estados da Federação. Desse modo, ainda não representa uma opção de atividade comercial em grande escala, restringindo-se quase que exclusivamente às iniciativas de pesquisa (ROUBACH et al., 2003).

Nos anos 70, o beijupirá foi apontado como uma espécie com potencial para aquicultura na Carolina do Norte, quando pesquisadores estudaram o crescimento de juvenis, em laboratório, obtida a partir de ovos fertilizados coletados na natureza (HASSLER e RAINVILLE, 1975). Nesse período, o cultivo de beijupirá também foi iniciado em Taiwan, cujos resultados foram igualmente considerados promissores (NHU et al., 2011). Com o desenvolvimento de pesquisas nos países asiáticos e nos Estados Unidos, foram obtidas taxas de sobrevivência de até 25% na larvicultura (BENETTI et al., 2008), contribuindo para a expansão da atividade em escala comercial.

Embora apresente características produtivas favoráveis, são raros os dados a cerca da biologia e tecnologia de criação do beijupirá. Este desconhecimento provoca dificuldades para o avanço de cultivos, que podem ser aumentados com a intensificação dos cultivos, ocasionando alterações fisiológicas ou enfermidades decorrentes do estresse.

Entre as enfermidades que acometem o beijupirá em sistemas de cultivo, são relatadas algumas doenças parasitárias causada por *Sphaerospora* em beijupirás cultivados em tanque-rede (CHEN et al., 2001), *Amyloodinium* e *Trichodina* em juvenis de beijupirá (LIAO et al., 2004; CHANG et al., 2007) e, recentemente, o monogenóide *Neobenedenia melleni* foi relatado em cultivo da espécie no Brasil (KERBER et al., 2011). Também foi identificada a susceptibilidade do beijupirá ao iridovírus (CHENG et al., 2010) e a doenças bacterianas por *Mycobacterium marinum* (LOWRY e SMITH, 2006), *Vibrio alginolyticus*, *V. harveyi* (LIU et

al, 2004a; LIU et al, 2004b), *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. anguillarum*, *V. ordalii* (MACHEN, 2008), *Pasteurella piscicida*, *Photobacterium damsela*, *Streptococcus iniae* e por *Aeromonas hydrophila* e *Citrobacter* spp. (LIAO et al., 2004).

As lesões relacionadas ao sistema cardiovascular em peixes não são bem pesquisadas, sendo descritos apenas alguns estudos a respeito de alterações coronarianas semelhantes às encontradas em aterosclerose em humanos, com as lesões associadas à maturação sexual e desova em salmão (ROBERTSON e WEXLER, 1962) e em truta arco-íris (SCHMIDT e HOUSE, 1979), espécies que realizam migração para fins reprodutivos.

Uma vez que já foram descritas lesões vasculares em algumas espécies de peixes em condições naturais, buscou-se demonstrar alterações do sistema vascular em beijupirás em condições de cultivo.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Pesquisar alterações vasculares em beijupirá (*Rachycentron canadum*) provenientes de cultivo *offshore* em Pernambuco.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar morfológicamente as alterações cardíacas e de vasos coronários, para identificar as lesões vasculares de aspecto degenerativo, similares a aterosclerose de mamíferos e humanos, através de histologia clássica;
- Analisar as alterações cardíacas e de vasos coronários com a microscopia eletrônica de transmissão;
- Analisar a morfometria das artérias coronárias e relacionar as túnicas íntima, média e adventícia.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 AQUICULTURA E O BEIJUPIRÁ (*Rachycentron canadum*)

A pesca de captura e a aquicultura contribuíram com cerca de 148 milhões de toneladas de peixe em 2010, dos quais cerca de 128 milhões foram destinadas à alimentação humana. Dados preliminares para 2011 indicaram um aumento da produção de 154 milhões de toneladas, dos quais 131 milhões foram utilizados como alimento (FAO, 2012).

Segundo dados da FAO (2012), predominam na aquicultura mundial a produção de peixes de água doce (56,4 %) com 33,7 milhões de toneladas, seguida de moluscos (com 23,6%: 14,2 milhões de toneladas), crustáceos (9,6 %: 5,7 milhões de toneladas), peixes diádromos (6 %: 3,6 milhões de toneladas), peixes marinhos (3,1 %: 1,8 milhões de toneladas) e outros animais aquáticos (1,4 %: 0,814 milhões de toneladas).

A aquicultura e a maricultura vem sendo implantada no Brasil há alguns anos. Com sua extensa faixa litorânea, o Brasil apresenta grande potencial para expansão da maricultura. Os avanços significativos nesse aspecto já foram representados principalmente com o cultivo do camarão marinho (*Litopenaeus vannamei*) na região Nordeste e a partir da década de 90, com o cultivo de moluscos bivalves no sul do país (HAMILTON, 2006).

A piscicultura marinha é um dos setores que apresentam as mais elevadas taxas de crescimento em todo o mundo, mantendo-se acima de 10% ao ano, no período de 1990 a 2008 (FAO, 2010).

Entre as várias espécies de interesse, com potencial para a aquicultura no Brasil, destacam-se o robalo-flecha (*Centropomus undecimalis*), a cioba (*Lutjanus analis*), o ariocó (*Lutjanus synagris*), a garoupa (*Epinephelus marginatus*), o pagro rosa (*Pagrus pagrus*), o pampo (*Trachinotus marginatus*), o peixe-rei (*Odonthestes argentinensis*), a arabaiana (*Seriola dumerili*), o dourado (*Coryphaena hippurus*), a carapeba (*Eugerres brasilianus*), o mero (*Epinephelus itajara*), o badejo (*Mycteroperca bonaci*) e o beijupirá (*Rachycentron canadum*) (CAVALLI et al., 2011).

O *Rachycentron canadum* (LINNAEUS, 1766), chamado popularmente de beijupirá, está enquadrado na classe Actinopterygii, ordem Perciformes, sendo a única espécie integrante da família Rachycentridae (SHAFFER e NAKAMURA, 1989).

A espécie possui outros nomes populares, como bijupirá, pirambiju, cação de escama, falso tubarão, *lemonfish*, *crabeater*, *ling*, *black kingfish*, existindo variações nominiais no país e no mundo. Pode atingir até dois metros de comprimento, com registros de indivíduos com

68kg, e com expectativa de vida em ambiente natural de 15 anos (SHAFFER e NAKAMURA, 1989).

Apresenta hábito carnívoro oportunista, predando principalmente, peixes, crustáceos e lulas (KAISER e HOLT, 2005), sendo uma espécie pelágica (de águas oceânicas abertas), migratória, cosmopolita, e que não possui o hábito de formação de cardumes, sendo um peixe solitário. Em função disso, devido à ausência de conhecimento acerca de métodos de captura, não existe uma pescaria em escala comercial específica, sendo sua comercialização restrita a peixarias litorâneas de pequeno/médio porte quando ocorrem capturas não programadas, principalmente nos países ocidentais (FAO, 2012).

Do ponto de vista da pesca de captura, a abundância da espécie nos mares é pequena. No ano de 2002, o desembarque alcançou o valor de 10.400 toneladas em todo o mundo (SAMPAIO et al., 2010).

De acordo com estatísticas de pesca no ano de 2005 realizada pelo IBAMA (2007), o Brasil apresentou captura de 900 toneladas de beijupirá, sendo a maior parte registrada no estado do Pará.

Sua distribuição compreende os oceanos Atlântico, Índico e Pacífico, com exceção de toda a costa leste do oceano Pacífico e da costa leste do oceano Atlântico na Europa (SHAFFER e NAKAMURA, 1989). No Brasil, a espécie se distribui por todo litoral, sendo mais comumente encontrada na costa do nordeste (FIGUEIREDO e MENEZES, 1980). Ao atingir a forma adulta, são espécies costeiras e da plataforma continental, ocasionalmente habitando estuários (ROBINS e RAY, 1986).

O histórico do cultivo da espécie teve início na década de 70, com pesquisadores que conseguiram sobrevivência de ovos capturados do ambiente natural, mantendo-os por 131 dias em laboratório na Carolina do Norte (HASSLER e RAINVILLE, 1975).

Pesquisadores em Taiwan, em 1990, conseguiram obter a primeira desova em laboratório e, a partir de 1994, as desovas vêm ocorrendo rotineiramente oriunda de reprodutores mantidos em cativeiro (LIAO et al., 2004). Atualmente, 23 países estão desenvolvendo estudos com a espécie para aperfeiçoamento em sistema produtivo de cativeiro (NHU et al., 2011).

No Brasil, os resultados iniciais de reprodução têm sido satisfatórios, embora a produção de alevinos, em laboratório, ainda seja instável e os dados de engorda insuficientes para indicar se os níveis de produtividade serão similares aos observados em outros países (CAVALLI et al., 2011). Vale ressaltar ainda que o fator geográfico influencia o hábito alimentar da espécie em questão, tornando ainda mais evidente a necessidade de incentivos de

pesquisas a fim de que se determinem seus padrões reprodutivos e alimentares nas condições ambientais encontradas no litoral brasileiro (HAMILTON et al., 2013).

Parte da dificuldade na implementação do seu cultivo, se dá principalmente devido às elevadas taxas de mortalidade observadas na larvicultura, na fase inicial da alimentação exógena, onde ocorrem mudanças alimentares dramáticas (TANG et al., 2010)

A larvicultura do beijupirá vem sendo realizada em laboratórios com tanques em sistema de fluxo contínuo ou de recirculação e também com baixas densidades de estocagem em viveiros. Na fase de engorda, os animais são transferidos para tanques rede oceânicos *nearshore* e *offshore* (WEBB JR et al., 2007; BENETTI et al., 2008).

### **3.2 SISTEMA CARDIOVASCULAR EM TELEÓSTEOS**

O sistema cardiovascular do peixe consiste de um coração dividido em duas cavidades (átrio e ventrículo) (ROMANO, 1987; ROMANO, 1990), onde o fluxo do sangue não oxigenado atravessa o seio venoso, átrio, ventrículo e bulbo arterioso, seguindo para oxigenação nas brânquias (SHERRILL et al., 2009). Contribuindo na dinâmica circulatória, também estão presentes artérias, veias, arteríolas e capilares; o sangue e seus elementos: eritrócitos nucleados, trombócitos e leucócitos; vasos linfáticos e tecido reticuloendotelial; tecidos ou receptores neural, endócrino e parácrino (SHERRILL et al., 2009).

O sistema circulatório na maioria dos peixes teleósteos é simples. Possuem dois tipos principais de artérias: os vasos aferentes de paredes espessas, que realizam o transporte de sangue do coração para as brânquias e os vasos eferentes com paredes mais finas, que o conduzem das brânquias para o corpo (SHERRILL et al., 2009).

Alguns componentes de condução circulatória ainda não foram identificados morfológicamente no coração de peixes teleósteos (ICARDO, 2012), necessitando de uma definição mais precisa acerca da morfologia do seu sistema de condução (NAIR, 1973; SEDMERA et al., 2003).

O coração de peixes teleósteos assume uma forma tubular, de saco ou piramidal (SANTER et al., 1983). Assim como em mamíferos, é composto por tecido elástico e músculo cardíaco. O sangue venoso desloca-se a partir da primeira câmara cardíaca (seio venoso), compartimento contrátil de fina musculatura. O próximo compartimento é o átrio, separado do seio venoso pela válvula sinoatrial na junção sinoatrial, possuindo parede muscular fina, reticular e contrátil. Através da junção átrio-ventricular (AV), o sangue segue um fluxo sanguíneo unidirecional para chegar ao ventrículo. O ventrículo é o único compartimento

composto por duas camadas, sendo uma mais interna chamada esponjosa e uma externa chamada camada compacta (SHERRILL et al., 2009).

Na maioria das espécies de peixes teleósteos, o seio venoso que é responsável por transportar o sangue ao átrio, possui uma importante estrutura tecidual em forma de anel, que é identificada como um marcapasso cardíaco primário (YAMAUCHI, 1980).

A partir do ventrículo, o sangue venoso é bombeado através de um par de válvulas na junção ventrículo-bulbar, no bulbo arterial, fluindo em seguida pela aorta abdominal. A estrutura do bulbo arterial também difere entre as espécies, sendo formado por tecido elástico não contrátil em teleósteos e em elasmobrânquios ele é chamado de cone arterioso, possuindo uma parede fina de músculo contrátil com várias filas de válvulas transversais (RANDALL, 1970b).

Assim como na maioria dos vertebrados, os vasos da circulação de retorno do sangue ao coração e os localizados no coração são alimentados por artérias coronárias. A aorta dorsal após transportar sangue a porção cranial, cabeça e cérebro, se apresenta como um único vaso, sendo agora denominada artéria caudal, que conduz o sangue através do arco hemal ventral das vértebras (SHERRILL et al., 2009).

O retorno venoso depende da veia caudal, que está situada ventralmente à artéria caudal, protegida pelos arcos hemais. Em algumas espécies, o retorno da circulação requer bombas de fluxo com corações acessórios (SATCHELL, 1991).

Sumariamente, o coração somente bombeia sangue oxigenado para as brânquias para a respiração. Através da aorta ventral o sangue é conduzido pelas artérias branquiais aferentes para os arcos branquiais, onde são realizadas as trocas gasosas por meio de uma rede de capilares, retornando então como sangue oxigenado através das artérias branquiais eferentes para a aorta dorsal (SHERRILL et al., 2009).

O meio aquático é o principal fator a ser considerado como desafio, pois ele impõe limitações ao peixe. O calor específico da água obriga a maior parte dos peixes poiquilotermos a adaptar a sua temperatura a do ambiente (BALDISSEROTTO, 2009).

Algumas das variações observadas em peixes referem-se ao grande volume de sangue, baixa pressão sanguínea (ROBERTS, 2001), bem como o desenvolvimento de corações acessórios no hagfish (também chamado “enguia slim”) e a presença de uma circulação pulmonar e uma separação parcial do sangue oxigenado e desoxigenado no coração do lungfish (peixe dipnóico), associado com a transição de um ambiente aquático para fora d’água (BALDISSEROTTO, 2009).

### 3.3 ESTRUTURA DA PAREDE DO VASO ARTERIAL

As artérias podem ser classificadas, segundo o seu calibre, em: (a) de grandes calibres como a aorta, estas denominadas artérias elásticas; (b) artérias de médio calibre ou também chamadas musculares ou de distribuição; e, (c) as pequenas artérias e arteríolas, que na maioria dos casos estão distribuídas entre os tecidos e órgãos (ROBBINS, 2000).

Em relação à estrutura microscópica, pode-se dividir a parede das artérias em túnica íntima, média e adventícia. A túnica íntima é composta por endotélio e subendotélio, estando separada da túnica média pela lâmina elástica interna (YAMAMOTO, 1998). A túnica íntima compreende duas distintas camadas, a primeira em contato com o lúmen do vaso e outra em contato com a túnica média. A camada mais interna é formada por tecido não fibroso reticulado, composto por proteoglicanos. A camada em contato com a média é também denominada “musculoelástica”, por ser mais espessa e pela abundância de células musculares lisas, fibras elásticas (STARY et al., 1992; ROBBINS, 1974) e colágeno (YAMAMOTO, 1998).

A lâmina elástica externa separa a túnica média da adventícia, sendo formada pela condensação do tecido elástico no limite externo da túnica média (ROBBINS, 2000).

A camada mais externa, chamada adventícia, é formada por uma camada de tecido conectivo fibroso, onde está situada a *vasa vasorum*, vasos linfáticos e nervos (YAMAMOTO, 1992).

A *vasa vasorum* desempenha um papel importante na nutrição de artérias ateroscleróticas, invadindo as túnicas íntima e média, colaborando com o espessamento das artérias. Os canais nutritivos “neovasculares” possuem parede fina, e contribuem para hemorragias e ruptura da placa, além de trombose mural (WILLIAMS e HEISTAD, 1996).

A célula endotelial regula as proteínas plasmáticas e atua como órgão endócrino, parácrino e autócrino, estando ligada à angiogênese (ROJAS, 2005). A camada endotelial vascular atua como uma estrutura receptora-efetora, reagindo a estímulos físicos ou químicos adquiridos a partir de modificações na conformação do vaso ou pela liberação de substâncias. Para tal, uma variedade de substâncias, agonistas e antagonistas entre si, são produzidas pelas células endoteliais, como vasodilatadores e vasoconstritores, pro-coagulantes e anti-coagulantes, pro-inflamatórios e anti-inflamatórios, fibrinolíticos e antifibrinolíticos, oxidantes e antioxidantes (ESPER et al., 2006), como exemplo destas substâncias, fibronectina, sulfato de heparan, interleucina I, ativador do plasminogênio tecidual (t-PA), promotores de crescimento, óxido nítrico (NO), prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), fator hiperpolarizante

derivado do endotélio (EDHF), o fator ativador de plaquetas (PAF) e a endotelina (GRYGLEWSKY et al., 1988). Com a ação de diferentes mecanismos agressores, o endotélio lesado causa a enfermidade hipertensiva, o processo aterogênico e aterotrombótico (ROJAS, 2005).

O músculo liso é o órgão abluminal do endotélio, contribuindo nas funções de vasodilatação, vasoconstricção e de proliferação celular (CLOWES et al., 1983) e por meio da dinâmica das substâncias produzidas pelas células endoteliais sobre o músculo liso, se obtém o tônus muscular (ROJAS, 2005). A túnica média e adventícia, a elastina e o colágeno, são componentes que determinam o comportamento mecânico das paredes arteriais (DOBRIN, 1983).

A ativação de células endoteliais em locais propensos ao desenvolvimento de lesão aterosclerótica gera o recrutamento de monócitos circulantes. A infiltração de monócitos e macrófagos na parede de grandes artérias caracteriza a inflamação crônica e favorece o desenvolvimento e progressão da aterosclerose (MESTAS e LEY, 2008).

### **3.4 ESTRESSE AMBIENTAL E OXIDATIVO EM PEIXES**

O meio aquático por ser um ambiente onde existe uma forte dinâmica entre seus componentes. Mudanças súbitas ou extremas na concentração de oxigênio dissolvido, pH e salinidade, acabam desencadeando uma resposta estressante nos animais, reduzindo sua habilidade em manter a homeostase (OBA et al., 2009).

Os agentes estressores são de diversas naturezas: químicas, através da variação do O<sub>2</sub> dissolvido, concentração elevada de amônia e nitrito em decorrência da matéria orgânica (COSTA et al., 2004); poluentes orgânicos e inorgânicos no ambiente (CARVALHO e FERNANDES, 2006); de natureza física, como por exemplo, o manuseio indevido, elevadas densidades populacionais, confinamento inadequado, captura ou transporte (URBINATI et al., 2004); e níveis de água reduzidos nos ambientes aquáticos (CADAVID GARCIA, 1984).

Ocorre no peixe exposto a agentes estressores, a ativação de dois eixos neuroendócrinos: eixo hipotálamo-sistema nervoso simpático-células de cromafins, que é responsável pela liberação de catecolaminas como produtos finais (sendo elas, adrenalina e noradrenalina); e o eixo hipotálamo-hipófise-inter-renal, que libera corticosteroides (cortisol e cortisona) (OBA et al. 2009).

Em 1977, pesquisadores elucidaram a existência de efeitos primários e secundários de estresse em peixes. Os efeitos primários seriam em nível endócrino, com liberação de cortisol,

e os secundários relacionados ao metabolismo e osmorregulação, com os animais sofrendo imunossupressão (MAZEAUD et al., 1977).

Quando o endotélio vascular perde a capacidade de manter um equilíbrio entre as túnicas, a camada íntima fica exposta e a aterosclerose evolui provocando um espessamento da camada média, sendo o estresse um dos principais responsáveis pelo espessamento das camadas arteriais em humanos (WILLIS, 1953).

O estresse oxidativo representa o resultado do desequilíbrio entre moléculas antioxidantes e oxidantes, gerado a partir de distúrbios na produção, distribuição ou por uma superabundância de ROS (espécies reativas de oxigênio) ou RNS (espécies reativas de nitrogênio) a partir de fontes endógenas ou fatores ambientais, ocasionando ação danosa das ROS e RNS sobre as células. Em função disso, tem sido relacionado na patogênese de diversas doenças, inclusive cardiovasculares (SIES, 1991).

Efeitos pró-oxidativos e pro-inflamatórios no endotélio vascular têm sido implicados na iniciação e progressão da arteriosclerose (SILVA e CERCHIARO, 2011). As LDL oxidadas (LDLox) impedem a saída de macrófagos da lesão, que por sua vez fagocitam grandes quantidades de lipídeos. O excesso de LDLox colabora no processo de transformação dos macrófagos em células “espumosas” que participam na formação das placas ateroscleróticas (DE FRANÇA e DE FRANÇA, 2001).

### **3.5 LESÕES ARTERIAIS EM PEIXES**

As informações acerca de alterações de vasos sanguíneos em teleósteos são escassas. Apenas se estudou comparativamente os vasos coronários de salmonídeos e sua possível analogia com enfermidade coronária vascular aterosclerótica no homem (ROBERTS, 1981).

Ao se acompanhar a maturação sexual e desova de salmões do Pacífico, foram observadas alterações histológicas e fisiológicas, semelhantes às características da síndrome de Cushing e hiperadrenocorticismismo. As lesões arteriais observadas foram de hiperplasia da íntima com deposição de mucopolissacarídeos, rompimento da membrana elástica interna e destruição de fibras musculares adjacentes à túnica media (ROBERTSON et al., 1961). Alterações coronarianas similares foram verificadas em estudo associando-as à maturação sexual e desova, em salmão (ROBERTSON e WEXLER, 1962) e em truta arco-íris (SCHMIDT e HOUSE, 1979).

Foi relatada em truta (*Salmo trutta morpha fario*), na Nova Zelândia, uma doença cardíaca calcificante, caracterizada por lesões que complicavam com dilatação vascular e

formação de placas calcificadas no bulbo arterial, demonstrando semelhança com a arteriosclerose em humanos. Na ocasião, os autores não estabeleceram pontos de vista definidos sobre a etiologia da doença (PRIOR et al., 1968).

Lesões proliferativas miointimais foram observadas em uma espécie de salmão de água doce, o salmão Chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*), durante a fase de migração, maturação e períodos de desova, tendo sido relacionadas com a elevada concentração plasmática de lipoproteína. Entretanto, foi descrita a relação temporal com o estado hormonal alterado, sem que o significado fisiopatológico para a aterogênese fosse explicado ou compreendido (EATON et al., 1984).

### **3.6 FISIOPATOGENIA DA ATEROSCLEROSE**

Doenças degenerativas vasculares estudadas em animais geralmente são agrupadas em três grupos: a arteriosclerose, a aterosclerose e a calcificação da túnica média arterial.

As causas da arteriosclerose são relacionadas a fatores hemodinâmicos, fatores químicos sanguíneos específicos, microtromboses, distúrbios endoteliais, distúrbios na permeabilidade e os metabólicos que acometem a parede arterial. Os efeitos mais importantes na arteriosclerose estão restritos a proliferações teciduais e endurecimento da túnica íntima. Os eventos relacionados à lipídoses, calcificações e ateromatose são vistos como ocorrências secundárias ou complicações (DAHME, 1965).

A aterosclerose representa a doença vascular com maior destaque em seres humanos, apresentando casuística baixa em animais, raramente levando a doença clínica como infarto do cérebro ou cardíaco (MCGAVIN e ZACHARY, 2006).

As lesões ateroscleróticas são espessamentos assimétricos focais da camada mais interna do vaso, a íntima. Estas placas estão constituídas por células, por elementos do tecido conjuntivo e por detritos celulares (STARY et al., 1992).

A ocorrência da aterosclerose está relacionada com algumas doenças cardiovasculares como angina, infarto do miocárdio, doença cerebrovascular e doença arterial periférica (MENDIVIL et al., 2002).

Representando a principal causa de ataque cardíaco, acidente vascular cerebral e gangrena das extremidades, a aterosclerose é apontada como responsável por 50% de toda a mortalidade que ocorre nos EUA, Europa e Japão. As lesões resultam de uma resposta inflamatória-fibroproliferativa excessiva a várias formas de agressão ao endotélio e do músculo liso da parede da artéria (ROSS, 1993).

Sumariamente, a aterosclerose representa uma doença imune-inflamatória crônica na qual as interações de monócitos com endotélio ativado são eventos cruciais que conduzem a alterações da íntima arterial. Na aterosclerose precoce, monócitos migram para a camada da íntima subendotelial onde diferenciam-se em macrófagos e células dendríticas. No espaço subendotelial, as células inflamatórias enriquecidas com lipoproteínas aterogênicas, sendo elas em sua maioria macrófagos que transformam-se em “células espumosas”. Essas “células espumosas” agregam-se e formam o núcleo de ateroma e com isso o processo progride, os centros de placas ateromatosas tornam-se necróticos, contendo lipídios, cristais de colesterol e resíduos celulares (BOBRY SHEV, 2006).

Dentre os fatores de risco de lesão aterosclerótica, destacam-se como principais a hipertensão arterial e a hiperlipidemia (particularmente a hipercolesterolemia) (BRASILEIRO FILHO, 2006).

O consumo de dieta rica em colesterol e gordura saturada, assim como pessoas que apresentam histórico familiar de hipercolesterolemia, gera uma elevada concentração arterial de Lipoproteínas de Baixa Densidade (LDL), uma vez que o fígado nessa situação possui um baixo número de receptores de LDL, sendo incapaz de remover a LDL sanguínea e tornando-a disponível para penetrar nas células endoteliais de artérias (FOX, 2004).

A hiperlipidemia promove uma disfunção endotelial, causando diminuição na síntese ou até inibição de substâncias vasodilatadoras. Através da vasodilatação, ocorre aumento dos espaços interendoteliais na parede vascular e as lipoproteínas conseguem migrar para a camada endotelial, acumulando-se no espaço subendotelial e progressivamente atingindo também a túnica íntima, contribuindo para o início da lesão aterosclerótica (BRASILEIRO FILHO, 2006). Por meio de radicais livres, o LDL englobado por células endoteliais é oxidado, se transformando em LDL oxidado, que contribui para a lesão endotelial celular, migração de monócitos e linfócitos na túnica íntima, conversão de monócitos em macrófagos modificados e outros eventos que corroboram com a progressão da aterosclerose (FOX, 2004).

A hipertensão arterial contribui ativamente no desenvolvimento da aterosclerose. A elevação de cifras tensionais, tanto sistólica como diastólica, é um importante fator de risco para a aterosclerose. A hipertensão arterial é um processo multifatorial, acelerando o desenvolvimento de aterosclerose por meio da interação de fatores genéticos e ambientais, como também por meio de fatores hemodinâmico-metabólicos. A heterogeneidade de genes que codificam os componentes do sistema renina-angiotensina, sobretudo o polimorfismo no sítio do angiotensinogênio e do receptor I da angiotensina II, representa um fator de

crescimento que estimula a proliferação de células musculares lisas bem como a síntese de elementos da matriz extracelular (BRASILEIRO FILHO, 2006).

O aumento do estresse oxidativo gerado a partir da hipertensão arterial, pode ativar genes envolvidos na resposta inflamatória, que na presença de hiperlipidemia leva à formação da placa aterosclerótica (ALEXANDER, 1995). A progressão da lesão surge primeiramente nas regiões onde ocorre espessamento intimal adaptativo, existindo uma correlação entre a distribuição sistêmica do espessamento intimal com as regiões mais afetadas pela aterosclerose (WILLIS, 1953; NAKASHIMA et al., 2002).

### 3.7 CLASSIFICAÇÃO DE LESÕES ATÉROSCLERÓTICAS

De acordo com o relatório publicado pela Associação Americana do Coração, de Stary et al. (1994) e Stary et al. (1995), é possível descrever os componentes característicos e mecanismos patogênicos das lesões ateroscleróticas, classificando-as em cinco tipos (Tabela 1).

Tabela 1: Classificação de tipos de lesão aterosclerótica (Stary et al., 1994; Stary et al., 1995)

TIPO DE LESÃO	DESCRIÇÃO
Tipo I	Presença de lipoproteína aterogênica suficiente para provocar aumento no número de macrófagos e formação de células espumosas. As alterações são mais evidentes em artérias pelo espessamento adaptativo da íntima.
Tipo II	Consiste principalmente de camadas de células espumosas macrofágicas e células musculares lisas carregados de lipídios. Estrias gordurosas em maior número e em camadas adjacentes.
Tipo III	Acúmulos lipídicos extracelulares entre as camadas de músculo liso que integra a túnica íntima.
Tipo IV	Acúmulo denso e bem definido de lípidio extracelular na túnica íntima. Esse tipo de lesão também é denominada “ateroma”. As aglomerações lipídicas agora denominam-se “núcleo lipídico”. Entre o núcleo e a superfície endotelial são encontrados macrófagos e músculo liso com e sem acúmulos intracelulares de lipídeos.

<b>TIPO DE LESÃO</b>	<b>DESCRIÇÃO</b>
Tipo V	<p>Identificada pela formação de um novo tecido conjuntivo fibroso no sítio da lesão, podendo desenvolver fissuras, hematoma, e/ou trombo. Classificam a lesão tipo V em três subtipos:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Tipo Va: além do tecido fibroso, o núcleo lipídico ainda presente. Múltiplas camadas de núcleo lipídico e tecido conjuntivo fibroso, sendo também denominada “fibroateroma”;</li> <li>- Tipo Vb: núcleo lipídico e outras estruturas na lesão estão calcificadas. A mineralização é a característica dominante, com depósitos minerais podendo substituir células mortas e lipídios extracelulares;</li> <li>- Tipo Vc: núcleo lipídico é mínimo ou ausente, sendo também denominada “lesão fibrótica”. A lesão é caracterizada pela substituição da túnica íntima por tecido conjuntivo fibroso.</li> </ul>
Tipo VI	<p>Ocorrem rupturas na superfície da lesão, hemorragias e/ou trombos. Classificadas em três subtipos:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Tipo VIa: é o tipo em que ocorre ruptura da superfície da lesão, incluindo fissuras e ulceração no local afetado.</li> <li>- Tipo VIb: lesões onde a ruptura da superfície da lesão é acompanhada de hematoma ou hemorragia;</li> <li>- Tipo VIc: as lesões são acompanhadas por trombos ou trombos remanescentes;</li> <li>- Tipo VIabc: indica a presença de todos os três tipos supracitados.</li> </ul>

A evolução das lesões ateroscleróticas gera um remodelamento arterial, podendo ocasionar alterações no diâmetro e na espessura do vaso arterial. Nas formas avançadas pode ocorrer dilatação progressiva sob a forma de aneurisma e estreitamento difuso do lúmen (STRONG, 1992).

### **3.8 INDICADORES DE LESÃO ATEROSCLERÓTICA**

Os principais fatores de risco envolvidos na aterogênese são bem estabelecidos em humanos, existindo uma variedade de estímulos que promovem a secreção de moléculas solúveis de adesão leucocitária que facilitam a adesão de monócitos às células endoteliais e

fatores quimiotáticos, que auxiliam a migração de monócito no espaço subintimal. A transformação que ocorre nos macrófagos na parede arterial e o colesterol de lipoproteínas são considerados essenciais no início do processo aterosclerótico (CALVILLO e SANDOVAL, 2004).

A possibilidade de expressão de genes que codificam as moléculas envolvidas no processo aterosclerótico, atingindo os tipos celulares específicos, permite oportunidades de novas formas de diagnóstico e medidas terapêuticas para a regressão das lesões e consequentemente, impedir sua formação (ROSS, 1993).

As células do endotélio quando ativadas a partir do acúmulo de lipídios modificados (LDL ox) aumentam a expressão das moléculas de adesão VCAM-1, ICAM-1, E-selectina, P-selectina, ocorrendo em seguida a migração e ativação de células inflamatórias como monócitos, mastócitos e linfócitos T (LIBBY e LEE, 2000). Após a instalação do processo inflamatório, as células musculares lisas migram e se multiplicam na túnica média desenvolvendo o ateroma (RAPOSO FILHO, 2010).

Estudo utilizando anticorpos monoclonais específicos para células do músculo liso, macrófagos humanos, células endoteliais e linfócitos, demonstrou que o tipo de célula predominante em lesões precoces de aterosclerose são as células musculares lisas, macrófagos e linfócitos T (KATSUDA et al., 1992). A principal classe de linfócitos T presentes nas lesões ateroscleróticas é CD4<sup>+</sup>. Em resposta local por meio de citocinas, células T (CD4<sup>+</sup>) diferenciam-se em linhagem de Th 1 ou Th 2. Entre os principais indutores de células Th1 e Th 2 são a interleucina (IL-12) e IL-10, respectivamente (DAUGHERTY e RATERI, 2002).

As células musculares lisas instaladas na túnica média proliferam e sintetizam a matriz extracelular, atingindo a túnica íntima, quando alteram o seu fenótipo de contrátil para sintético, aumentando a expressão de alpha-actina. As metaloproteinases são secretadas pela alpha-actina, células endoteliais e monócitos, e respondem a sinalização oxidativa, inflamatória, hemodinâmica e autoimune (GABBIANI et al., 1984).

Na progressão de doença aterosclerótica, várias proteínas de fase aguda como a proteína C-reativa (WANG et al., 2014), proteína amilóide sérica A, albumina e fibrinogênio, têm sido associadas ao aumento do risco vascular (DANESH et al., 1998). A concentração plasmática da interleucina – 6 (IL-6) é associada com o risco de infarto do miocárdio, desempenhando um papel central na inflamação e lesão dos tecidos (RIDKER et al., 2000). Dados demonstram uma forte correlação da IL – 6 com a proteína C – reativa e o fibrinogênio, por ser a IL – 6 principal estimulante para a produção de proteínas de fase aguda a nível hepático (BAUMANN e GAULDIE, 1990).

O endotélio vascular de sítios com risco de desenvolvimento da aterosclerose possui um aumento na permeabilidade através de vários componentes proteicos existentes no plasma, como fibrinogênio, albumina e a LDL (FREI, 1999).

Em algumas pesquisas foi demonstrado que as células encontradas na parede vascular, como as já citadas anteriormente, células musculares lisas e células endoteliais, produzem citocinas envolvidas em enfermidades cardiovasculares (HOJO et al., 2000).

A instabilidade da placa aterosclerótica é então uma consequência de uma complexa resposta inflamatória da parede vascular, tendo início por meio da ativação de macrófagos e células T, levando a degradação de tecido conectivo, produção elevada de citocinas e apoptose das células que compõem a parede vascular. Os macrófagos ativados originam as citocinas inflamatórias (CALVILLO e SANDOVAL, 2004).

### **3.9 SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA (SRA) E ATEROSCLEROSE**

O sistema renina-angiotensina também participa como componente central de resposta fisiológica e patológica do sistema cardiovascular, desempenhando um papel chave na homeostase cardiovascular e no desenvolvimento embriológico do rim e de outros órgãos em mamíferos e vários tipos de vertebrados (TUFRO-MCREDDIE et al., 1995). Nas células justaglomerulares no rim ocorre a síntese da enzima renina, que é liberada para a circulação e, eventualmente, na linfa renal (MORGAN et al., 1982).

Nos mamíferos, a renina age sobre o angiotensinogênio (substrato de renina) para formar a angiotensina I, que é posteriormente convertido por enzimas de conversão à angiotensina II (ANG II), que desempenha um papel importante na manutenção da homeostase cardiovascular e hidromineral (NISHIMURA, 1985).

Sendo o principal hormônio efetor, a ANG II está envolvida não apenas na mediação de efeitos fisiológicos de vasoconstrição e controle da pressão sanguínea, como também na inflamação, disfunção endotelial, aterosclerose, hipertensão e insuficiência cardíaca congestiva. Por meio de cascatas de sinalização, promovem eventos que contribuem para a disfunção vascular e progressão de doença aterosclerótica, com a contração vascular, crescimento de células musculares lisas, hipertrofia e migração celular (ROMANO et al., 1994a; MEHTA e GRIENGLING, 2007).

A ANG II desempenha um importante papel no desenvolvimento da aterosclerose, exercendo ação praticamente em todas as células vasculares envolvidas no processo como células endoteliais, células musculares lisas, fibroblastos, monócitos/ macrófagos e também

nos miócitos cardíacos. Alterações no fenótipo e na morfologia das células envolvidas com variação na expressão gênica aceleram a capacidade de respostas a tais estímulos levando a patologia vascular (SCHIEFFER et al., 2000).

Foi constatado o aumento da expressão do receptor de ANG II após lesão neointimal (VISWANATHAN, 1992). A sinalização da interação da ANG II com a interleucina 18 (IL-18) também vem sendo apontada como um dos mecanismos pelo qual a ANG II controla os seus efeitos pró-aterogênicos locais em células musculares lisas vasculares (MEHTA e GRIENGLING, 2007).

O sistema renina-angiotensina (SRA) é um sistema profundamente estudado em humanos por sua implicância entre outras no controle da pressão arterial (STIEFEL, 2011; FANELLI e ZATZ, 2011), com a ANGII associada a fatores de risco para aterosclerose, como hipercolesterolemia e hipertensão, tendo sido demonstrado que o aumento da angiotensina eleva os níveis de colesterol (DAUGHERTY et al., 2004). Ainda assim, o aumento da ANG II já foi relacionado com o desenvolvimento de aterosclerose aórtica e formação de aneurisma, independente da elevação de pressão arterial (DAUGHERTY et al., 2000).

A Ang II promove uma contração do músculo liso vascular tanto arterial como venoso e aumenta a contratilidade miocárdica, além de estimular a secreção de aldosterona e catecolaminas nas glândulas suprarrenais em mamíferos e também estimular diretamente a liberação de vasopressina e adenocorticotrofina na hipófise. Algumas investigações sugerem que este peptídeo atua como modulador intracelular do crescimento e metabolismo, tendo sido demonstrado por sondas moleculares, que a maioria dos órgãos contêm RNAm que codifica o angiotensinogênio (ROMANO et al., 1993 ).

O antagonismo de ações da ANG II pode retardar a progressão da doença aterosclerótica e estabilizar placas vulneráveis (MEHTA e GRIENGLING, 2007). Outros efeitos do bloqueio do SRA têm sido descrito sobre as modificações do envelhecimento celular, por aumento no número de mitocôndrias celulares e proteção de órgãos como o rim, durante enfermidades crônicas (FERDER et al., 1993; ROMANO et al., 1994b; INSERRA et al., 1996).

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

A angiotensina II (ANG II) foi recentemente identificada em peixes elasmobrânquios, e inclusive comparada com a de outros vertebrados, tendo sido encontrados receptores da ANG II nos vasos sanguíneos e em diferentes órgãos osmorreguladores, como rins e

brânquias (HAZON et al., 1999; FUENTES e EDDY, 1997; LEEDOM et al, 2003; TAKEI e TSUCHIDA, 2000).

Vários estudos sugerem que o SRA de teleósteos tem um papel na regulação da pressão arterial e controla algumas das respostas fisiológicas que prejudicam os hipotensores. Outro importante participante no controle cardiovascular em teleósteos é o sistema nervoso simpático (SNS) (BERNIER et al., 1999).

Têm sido demonstrado que a inibição da enzima de conversão da angiotensina I (ECA) reduz marcadamente a concentração plasmática de cortisol em enguias europeias, sugerindo que exerçam um papel importante sobre o cortisol nos mecanismos de estresse e resposta imune em peixes (ROMANO, 2004).

#### 4 REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, R. W. Hypertension and the pathogenesis of atherosclerosis oxidative stress and the mediation of arterial inflammatory response: a new perspective. **Hypertension**, v.25, p.155-161, 1995.
- BALDISSEROTTO, B. **Fisiologia de peixes aplicada à aquicultura**. 2. ed. Santa Maria: Editora UFSM, 2009, 352 p.
- BAUMANN, H.; GAULDIE, J. Regulation of hepatic acute phase plasma protein genes by hepatocyte stimulating factors and other mediators of inflammation. **Mol Biol Med.**, v.7, p.147-159, 1990.
- BENETTI, D. D.; SARDENBERG, B.; WELCH, A. W.; HOENIG, R.; ORHUN, M. R.; ZINK, I. intensive larvae husbandry and fingerling production of cobia *Rachycentron canadum*. **Aquaculture**, v. 281, p.22-27, 2008.
- BERNIER, N. J.; KAIYA, H.; TAKEI, Y.; PERRY, S. F. Mediation of humoral catecholamine secretion by the renin–angiotensin system in hypotensive rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Journal of Endocrinology**, v. 160, p. 351-363, 1999.
- BOBRY SHEV, Y. V. Monocyte recruitment and foam cell formation in atherosclerosis. **Micron**, v. 37, p. 208–222, 2006.
- BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo: Patologia**. 7. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2006, il. color: 1472 p.
- CADAVID GARCIA, E. A. **O clima do Pantanal Mato-grossense**. Emprapa Pantanal, 1984. Corumbá: Circular técnica, 14.
- CALVILLO, J. C.; SANDOVAL, I. R. B. Biomarcadores, inflamación, estrés oxidativo, lípidos y aterotrombosis. Atherosclerosis: Un proceso inflamatorio. **Archivos de Cardiología de México**, v. 74, sup. 2, 60 Aniversario/Abril-Junio, 2004.
- CARVALHO, C. S.; FERNANDES, M. N. Effect of temperature on copper toxicity and hematological responses in the neotropical fish *Prochilodus scrofa* at low and high pH. **Aquaculture**, v. 251, p. 109-117, 2006.
- CAVALLI, R.O. ; DOMINGUES, E. de C.; HAMILTON, S. Desenvolvimento da produção de peixes em mar aberto no Brasil: possibilidades e desafios. **R. Bras. Zootec.**, v. 40, p. 155-164 (supl. especial), 2011.
- CHANG, S. L.; LIAO, I. C.; LEAÑO, E. M. Nursery rearing of cobia in Taiwan: Problems, recent developments and strategies. In: LIAO, I. C.; LEAÑO, E. M. (Eds.). **Cobia aquaculture: research development and commercial production**. Manila: Asian Fisheries Society, 2007, p. 79-88.
- CHEN, S. C.; KOU, R. J.; WU, C. T.; WANG, P. C.; SU, F. Z. Mass mortality associated with a Sphaerospora-like myxosporidean infestation in juvenile cobia, *Rachycentron canadum*

(L.), marine cage cultured in Taiwan. **Journal of Fish Diseases**, v. 24, p. 189–195, 2001.

CHENG, T. C.; LAI, Y. S.; LIN, I. Y.; WU, C. P.; CHANG, S. L.; CHEN, T. I.; SU, M. S. Establishment, characterization, virus susceptibility and transfection of cell lines from cobia, *Rachycentron canadum* (L.), brain and fin. **Journal of Fish Diseases**, v. 33(2), p. 161-169, 2010.

CLOWES, A. W.; REIDY, M. A.; CLOWES, M. M. Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. I. Smooth muscle growth in the absence of endothelium. **Lab Invest.**, v. 49(3), p. 327-33, sep. 1983.

COSTA, O. F. T.; FERREIRA, D. J. S.; MENDONÇA, F. L. P.; FERNANDES, M. N. Susceptibility of the Amazonian fish, *Colossoma macropomum* (Serrasalminae) to short-term exposure to nitrite. **Aquaculture**, v. 232, p. 627-636, 2004.

DAHME, E. G. Atherosclerosis and arteriosclerosis in domestic animals. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.127, Comparative Cardiology, p. 657-670, 1965.

DANESH, J.; COLLINS, R.; APPLEBY, P.; PETO, R. Association of fibrinogen, C-reactive protein, albumin, or leukocyte count with coronary heart disease: meta-analyses of prospective studies. **JAMA**, v. 279, p. 1477-1482, 1998.

DAUGHERTY, A.; MANNING, M. W.; CASSIS, L. A. Angiotensin II promotes atherosclerotic lesions and aneurysms in apolipoprotein E-deficient mice. **J Clin Invest.**, v. 105, p. 1605-1612, 2000.

DAUGHERTY, A.; RATERI, D. L. T lymphocytes in atherosclerosis the yin-yang of Th1 and Th2 influence on lesion formation. **Circulation Research**, v.90, p.1039-1040, 2002.

DAUGHERTY, A.; RATERI, D. L.; LU, H.; INAGAMI, T.; CASSIS, L. A. Hypercholesterolemia stimulates angiotensin peptide synthesis and contributes to atherosclerosis through the AT1A receptor. **Circulation**, v. 110, p. 3849-3857, 2004.

DE FRANÇA, T. A.; DE FRANÇA, N. A. A. C. Aspectos morfológicos e citopatológicos das lesões ateroscleróticas em crianças e adolescentes e sua aterogênese. **Pediatria**, v.23, p.10-16, 2001.

DOBRIN, P. B. Vascular mechanics. In Handbook of physiology. **Section 2: the cardiovascular system**, 1983. v. 3 (eds J. T. Shepherd & F. M. Abboud), p. 65-102. Bethesda, MD: American Physiological Society.

EATON, R. P.; MCCONNELL, T.; HNATH, J.; BLACK, W.; SWARTZ, R. E. Coronary myointimal hyperplasia in freshwater lake Michigan salmon (Genus *Oncorhynchus*). Evidence for lipoprotein-related atherosclerosis. **Am J Pathol.**, v. 116(2), p. 311-318, aug. 1984.

ESPER, R. J.; NORDABY, R. A.; VILARIÑO, J. O.; PARAGANO, A.; CACHARRÓN, J. L.; MACHADO, R. A. Endothelial dysfunction: a comprehensive appraisal. **Cardiovascular Diabetology**, v.5, p.4, 2006.

FANELLI, C.; ZATZ, R. Linking oxidative stress, the renin-angiotensin system, and hypertension. **Hypertension**, v. 57, p. 373-374, 2011.

FAO. **Fisheries and Aquaculture Department**. The state of world fisheries and aquaculture, Rome, 2010, 197p.

FAO. **Fisheries and Aquaculture Department**. The state of world fisheries and aquaculture, Rome, 2012, 230p.

FERDER, L.; INSERRA, F.; ROMANO, L. A.; ERCOLE, L.; PSZENNY, V. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibition on mitochondrial number in the aging mouse. **Am J Physiol.**, v. 265 (1 Pt 1), p. 15-18, 1993.

FIGUEIREDO, J. L.; MENEZES, N. A. **Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. III Teleostei (2)**. São Paulo: USP, 1980, 90p.

FOURNIER, D.; LUFT, F. C.; BADER, M.; GANTEN, D.; ANDRADE-NAVARRO, M. A. Emergence and evolution of the renin-angiotensin-aldosterone system. **J Mol Med.**, v. 90, p. 495-508, 2012.

FOX, S. I. **Human physiology**. Boston : McGraw-Hill, 2004, il.,726 p.

FREI, B. On the role of vitamin C and other antioxidants in atherogenesis and vascular dysfunction. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 222, p. 196-204. 1999.

FUENTES, J; EDDY, F. B. Effect of manipulation of the renin-angiotensin system in control of drinking in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar L*) in fresh water and after transfer to sea water. **J. Comp. Physiol. B.**, v. 167, p. 438-443, 1997.

GABBIANI, G; KOCHER, O.; BLOOM, W. S.; VANDEKERCKHOVE, J.; WEBER, K. Actin expression in smooth muscle cells of rat aortic intimal thickening, human atheromatous plaque, and cultured rat aortic media. **J Clin Invest.**, v. 73(1), p. 148-52, 1984.

GRYGLEWSKY, R. J.; BOTTING, R. M.; VANE, J. R. Mediators produced by the endothelial cell. **Hypertension**, v. 12, p. 530-548, 1988.

HAMILTON, S. Perspectivas para o desenvolvimento da piscicultura marinha no Nordeste brasileiro, com ênfase no beijupirá. **Seminário Nordestino de Pecuária – PECNE**, 2006. Fortaleza-CE, Brasil.

HAMILTON, S.; SEVERI, W.; CAVALLI, R. O. Biologia aquicultura do beijupirá: uma revisão. **Bol.Inst.Pesca**, São Paulo, v. 39(4), p. 461-477, 2013.

HASSLER, W. W.; RAINVILLE, R. P. Techniques for hatching and rearing cobia, *Rachycentron canadum*, through larval and juvenile stages. **Univ. N. C. Sea Grant Coll. Prog. Raleigh**, North Carolina. Publ.UNC-SC-75-30, 26p, 1974.

HAZON, N.; TIERNEY, M. L.; Takei, Y. Reninangiotensin system in elasmobranch fish: A review. **J. Exp. Zool.**, v. 284, p. 526-34, 1999.

HOJO, Y.; IKEDA, U.; KATSUKI, T.; MIZUNO, O.; FUKAZAWA, H.; KUROSAKI, K.; FUJIKAWA, H.; SHIMADA, K. Interleukin 6 expression in coronary circulation after coronary angioplasty as a risk factor for restenosis. **Heart**, v. 84, p. 83-87, 2000.

IBAMA. Estatística da pesca: 2005. Brasil: Grandes regiões e unidades da federação, Brasília, 147p, 2007.

ICARDO, J. M. **The teleost heart: A morphological approach** (Chapter 2). Ontogeny and phylogeny of the vertebrate heart, 2012. (Eds) Sedmera, D.; Wang, T. p. 35-53.

INSERRA, F.; ROMANO, L. A.; DE CAVANAGH, E. M.; ERCOLE, L.; FERDER, L. F.; GOMEZ, R. A. 1996. Renal Interstitial Sclerosis in Aging: Effects of Enalapril and Nifedipine. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 7, p.676-680, 1996.

KAISER, J. B.; HOLT, G. J. **Species profile cobia. (S.I.): Southern Regional Aquaculture Center.** (Report, 7202), 2005.

KATSUDA, S.; BOYD, H. C.; FLIGNER, C.; ROSS, R.; GOWN, A. M. Human atherosclerosis: III. Immunocytochemical analysis of the cell composition of lesions of young adults. **American Journal of Pathology**, v. 140, n. 4, april 1992.

LEEDOM, T. A.; HIRANO, T.; GRAU, E. G. Effect of blood withdrawal and angiotensin II on prolactin release in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 135, p. 155-163, 2003.

LIAO, I. C.; HUANG, T. S.; TSAI, W. S.; HSUEH, C. M.; CHANG, S. L.; LEAÑO, E. M. Cobia culture in Taiwan: current status and problems. **Aquaculture**, v. 237, p. 155-165, 2004.

LIBBY, P.; LEE, R. T. Matrix matters. **Circulation**, v. 102, p. 1874-6, 2000.

LINNAEUS, C. Systema natura, 12. ed. London: Brit. Min. Nat. Hist., 1766, 491p.

LIU, P. C.; LIN, J. Y.; HSIAO, P. T.; LEE, K. K. Isolation and characterization of pathogenic *Vibrio alginolyticus* from diseased cobia *Rachycentron canadum*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 44 (1), p. 23-28, 2004a.

LIU, P. C.; LIN, J. Y.; CHUANG, W. H.; LEE, K. K. Isolation and characterization of pathogenic *Vibrio harveyi* (*V. carchariae*) from the farmed marine cobia fish *Rachycentron canadum* L. with gastroenteritis syndrome. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 20 (5), p. 495-499, 2004b.

LOWRY, T.; SMITH, S. A. Mycobacterium sp. infection in cultured cobia (*Rachycentron canadum*). **Bulletin European Association of Fish Pathology**. v. 26, p. 87-92, 2006.

MACHEN, J. W. **Vibrio spp. disinfection and immunization of cobia (*Rachycentron canadum*) for the prevention of disease in aquaculture facilities.** United States: Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University, 2008. Thesis (Master), 98p.

MAZEAUD, M. M.; FREDERIC MAZEAUD, F.; DONALDSON, E. M. Primary and

secondary effects of stress in fish: Some new data with a general review. **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 106, 3, 1977.

MCGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. F. **Pathologic basis of veterinary disease**. 4. ed. Elsevier Health Sciences, 2006, 1488 p.

MEHTA, P. K.; GRIENGLING, K. K. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. **Am J Physiol Cell Physiol.**, v. 292, c.82–97, 2007.

MESTAS, J.; LEY, K. Monocyte-Endothelial Cell Interactions in the Development of Atherosclerosis. **TCM.**, v. 18, n. 6, 2008.

MENDIVIL, C. O.; SIERRA, I. D.; PÉREZ, C. E.; HERNÁNDEZ ABAD, B. Antioxidantes y enfermedad vascular. **Clin Invest Arterioscl.**, v. 14(1), p. 26-40, 2002.

MORGAN, T.; DAVIS, J.; GILLIES, A. Release of renin into the circulation. **Kidney Int Suppl.**, p. 63-66, Aug 1982.

NAIR, M. G. The development of the nervous system in the heart of the Chinese carp, *Cyprinus carpio* (Linnaeus), with a special reference to its conduction system. **Mikroskopie**, v. 29, p. 1-7, 1973.

NAKASHIMA, Y.; CHEN, Y. X.; KINUKAWA, N.; SUEISHI, K. Distributions of diffuse intimal thickening in human arteries: preferential expression in atherosclerosis-prone arteries from an early age. **Virchows Arch.**, v.3, p.279-288, 2002.

NHU, V. C.; NGUYEN, H. Q.; LE, T. L.; TRAN, M. T.; SORGELOOS, P.; DIERCKENS, K.; REINERTSEN, H.; KJORSVIK, E.; SVENNEVIG, N. *Cobia *Rachycentron canadum** aquaculture in Vietnam: recent developments and prospects. **Aquaculture**, v. 315, p. 20-25. 2011.

NISHIMURA, H. Evolution of the renin-angiotensin system and its role in control of cardiovascular function in fishes. **NATO ASI Series**, v. 103, p. 275-293, 1985.

OBA, E. T.; MARIANO, W. dos S.; SANTOS, L. R. B. dos. Estresse em peixes cultivados: agravantes e atenuantes para o manejo rentável. Manejo e sanidade de peixes em cultivo, 2009. Capítulo 8, Tavares-Dias, M (Organizador). Embrapa Amapá, Macapá, p.226-247.

PRIOR, I. A. M.; WEBBER, W. L.; ALEXANDER, W. S.; BARCLAY, S. de C. Calcific Heart Disease in New Zealand Brown Trout. **Nature**, v. 220, p. 261-262, 19 october 1968.

RANDALL, D; BURGGREN, W.; FRENCH, K. **Eckert Animal Physiology: Mechanisms and Adaptations**. 4. ed. New York: W.H. Freeman & Company, 1997.

RANDALL, D. J. **Gas exchange in fish**. In **Fish Physiology**. (eds W. S. Hoar & D. J. Randall), London: Academic Press., v. 4, 1970, p. 253-292 (a).

RANDALL, D. J. The circulatory system. In: Hoar, W.S.; Randall, D.J., editors, **Fish physiology: the nervous system, circulation, and respiration**, vol. 4. London: Academic

Press; 1970. p. 133–72. (b).

RAPOSO FILHO, J. J. F. **Suco de laranja tem efeito sinérgico à estatina e ao genfibrozila no tratamento da aterosclerose**. São Paulo: Faculdade de Medicina de São Paulo, 2010. Tese (Doutorado), Programa de Cardiologia, 88p.

RIDKER, P. M.; HENNEKENS, C. H.; BURING, J. E.; RIFAI, N. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. **N. Engl. J. Med.**, v. 342, p. 836-843, 2000.

ROBBINS, S. L. **Patologia estrutural e funcional**. 6. ed. Guanabara Koogan, 2000, 1251p.

ROBERTS, R. J. **Patologia de los peces**. Madrid: Mundi-Prensa, 1981, 366p.

ROBERTS, R. J. The anatomy and physiology of teleosts in : **Fish Pathology** (Ed Elsevier Health Sciences). London, 2001, p. 12-54.

ROBERTSON, O. H.; WEXLER, B. C.; MILLER, B. F. Degenerative changes in the cardiovascular system of the spawning Pacific salmon ( *Oncorhynchus tshawytscha*). **Circulation Research**, v. 9, p. 826-272, 1961.

ROBERTSON, O. H.; WEXLER, B. C. Histological changes in the organs and tissues of senile castrated Kokanee salmon (*Oncorhynchus nerka kennerlyi*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 2, i. 5, p. 458-472, October 1962.

ROBINS, C. R.; RAY, G. C. **Field guide to Atlantic coast fishes of North America**. Boston: Houghton Mifflin Co., 1986, 354 p.

ROJAS, E. M. El endotelio: 25 años después / Endothelium: 25 years later. **Revista Med.**, v. 13(1), p. 45-61, jul. 2005.

ROMANO, L.A. Estudio Histopatológico de los Peces. **Documental Veter.**, v.8, n.7, 1987.

ROMANO, L.A. Ictiopatología. **Ecognicion** (Supl. Esp.), Buenos Aires, Argentina, v.1, p. 32-36, 1990.

ROMANO, L.A.; CAVANAGH, E.; INSERRA, F.; FERDER, L. Efecto de Diferentes Concentraciones de Captopril como Atrapador de Radicales Libres en Hígado de Ratón. **Medicina (Buenos Aires)**, v. 53, p. 57-59, 1993.

ROMANO, L. A.; INSERRA, F.; ERCOLE, L.; PSZENNY, V.; CAVANAGH, E. M. V. de; GOMEZ, R. A.; FERDER, L. Estudio de Células Productoras de Renina y de su Síntesis durante la Inhibición Crónica de la Enzima Convertidora de la Angiotensina I. **Medicina**, v. 56, p. 172-178, 1994a.

ROMANO, L.A.; FERDER, L.; INSERRA, F.; ERCOLE, L.; GOMEZ, R. A. Intraglomerular Expression of Alfa-Smooth Muscle Actin in Aging Mice. **Hypertension**, v. 23, p. 889-893, 1994b.

ROMANO, L. A. Estudio de la expresión fenotípica de la renina durante la inhibición de la

enzima convertidora de la Angiotensina I en *Carpa Koi*. **Comunicación Científica CIVA** (<http://www.civa2004.org>), 2004, p. 634-645.

ROSS, R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. **Nature**, v. 362, p. 801-809, 29 april 1993.

ROUBACH, R.; CORREIA, E.S.; ZAIDEN, S.; MARTINO, R. C.; CAVALLI, R. O. Aquaculture in Brazil. **World Aquaculture**, v. 34 (1), p. 28-35, 2003.

SAMPAIO, L. A., TESSER, M. B.; WASIELESKY, W. Avanços da maricultura na primeira década do século XXI: piscicultura e carcinocultura marinha. **Revista brasileira de Zootecnia**, v.39, p. 102-111, 2010.

SANTER, R. M.; WALKER, M.G.; EMERSON, L.; WITTHAMES, P. R. On the morphology of the heart ventricle in marine teleost fish (teleostei). **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v.76, i. 3, p. 453-457, 1983.

SATCHELL, G.H. **Physiology and form of fish circulation**. New York: Cambridge University Press, 1991.

SCHIEFFER, B.; SCHIEFFER, E.; HILFIKER-KLEINER, D.; HILFIKER, A.; KOVANEN, P.T.; KAARTINEN, M.; NUSSBERGER, J.; HARRINGER, W.; DREXLER, H. Expression of angiotensin II and interleukin 6 in human coronary atherosclerotic plaques: potential implications for inflammation and plaque instability. **Circulation**, v. 101, p. 1372-1378, 2000.

SCHMIDT, S. P.; HOUSE, E. W. Time study of coronary myointimal hyperplasia in precocious male steelhead trout, *Salmo gairdneri*. **Atherosclerosis**, v. 34, p. 375-381, 1979.

SEDMERA, D.; RECKOVA, M.; DEALMEIDA, A.; SEDMEROVA, M.; BIERMANN, M.; VOLEJNIK, J.; SARRE, A.; RADDATZ, E.; MCCARTHY, R. A.; GOURDIE, R. G.; THOMPSON, R. P. Functional and morphological evidence for a ventricular conduction system in zebra fish and *Xenopus* hearts. **Am J Physiol.**, v. 284, h.1152-1160, 2003.

SHAFFER, R. V.; NAKAMURA, E. L. Synopsis of biological data on the cobia *Rachycentron canadum* (Pisces: Rachycentridae). **FAO Fisheries Synop.** 153 (NMFS/S 153). U.S. Dep. Commer., NOAA Tech. Rep. NMFS 82, 1989. 21pp.

SHERRILL, J.; WEBER III, E. S.; MARTY, G. D.; HERNANDEZ-DIVERS, S. Fish Cardiovascular physiology and disease. **Vet Clin Exot Anim.**, v. 12, p. 11-38, 2009.

SIES, H. Oxidative stress: From basic research to clinical application. **The American Journal of Medicine**, v. 91 (sup 3C), 30 sep. 1991.

SILVA, D. da C.; CERCHIARO, G. Relação patofisiológicas entre estresse oxidativo e aterosclerose. **Quim. Nova**, v. 34, n. 2, p.300-305, 2011.

STIEFEL, P. Role of the renin-angiotensin system and aldosterone on cardiometabolic syndrome. **International Journal of Hypertensio**, p. 1-8, 2011.

STARY, H. C.; BLANKENHORN, D. H.; CHANDLER, A. B.; GLAGOV, S.; INSULL, W.;

RICHARDSON JR, M. A definition of the intima of human arteries and of its atherosclerosis-prone regions. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. **Circulation**, v. 85, p. 391-405, 1992.

STARY, H. C.; CHANDLER, A. B.; GLAGOV, S.; GUYTON, J. R.; INSULL, W. JR.; ROSENFELD, M. E.; SCHAFFER, A.; SCHWARTZ, C. J.; WAGNER, W. D.; WISSLER, R. W.; A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis: a report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. Special report. **Arterioscler Thromb.**, v. 14, p. 840-856, 1994.

STARY, H. C.; CHANDLER, A. B.; DINSMORE, R. E.; FUSTER, V.; GLAGOV, S.; INSULL JR, W.; ROSENFELD, M. E.; SCHWARTZ, C. J.; WAGNER, W. D.; WISSLER, R. W. A Definition of Advanced Types of Atherosclerotic Lesions and a Histological Classification of Atherosclerosis. A Report From the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. **Circulation**, v. 92: p. 1355-1374, 1995.

STRONG, J. P. Atherosclerotic lesions. Natural history, risk factors, and topography. **Arch Pathol Lab Med.**, v. 116, n. 12, p. 1268-1275, dec. 1992.

TAKEI, Y; TSUCHIDA, T. Role of the renin-angiotensin system in drinking of seawater-adapted eels *Anguilla japonica*: a reevaluation. **Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol.**, v. 279, p. 1105-1111, 2000.

TANG, B. G.; CHEN, G. ; WU, Z. H. Application of a microdiet in cobia *Rachycentron canadum* (Linnaeus, 1766) larvae rearing. **Aquacult. Res.**, v. 41, p. 315-320, 2010.

TUFRO-MCREDDIE, A.; ROMANO, L. A.; HARRIS, J. M.; FERDER, L.; GOMEZ, R. A. Angiotensin II regulates nephrogenesis and renal vascular development. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 269, p. 110-F115, 1995.

URBINATI, E. C.; ABREU, J. S.; CAMARGO, A. C. S.; LANDINES, M. A. Loading and transport stress in juvenile matrinxã (*Brycon cephalus*) at various densities. **Aquaculture**, v. 229, p. 389-400, 2004.

VISWANATHAN, M.; STROMBERG, C.; SELTZER, A.; SAAVEDRA, J. M. Balloon angioplasty enhances the expression of angiotensin II AT1 receptors in neointima of rat aorta. **J Clin Invest.**, v. 90, p. 1707-1712, 1992.

WANG, J.; LIU, J. H.; ZHU, X. L.; ZHANG, M.; WANG, S. P.; ZHENG, Z. Nonculprit lesion progression in patients with ST elevation myocardial infarction after primary percutaneous coronary intervention. **Int Heart J.**, v. 55(1), p. 48-52, 2014.

WEBB, J. R.; KA, G. M.; HITZFELDER, C. K.; FAULK; HOLT, G. J. Growth of juvenile cobia, *Rachycentron canadum*, at three different densities in a recirculating aquaculture system. **Aquaculture**, v. 264, p. 223-227, 2007.

WILLIAMS, J. K.; HEISTAD, D. D. Structure and function of vasa vasorum. **Trends Cardiovasc Med.**, v. 6(2), p. 53-7, feb. 1996.

WILLIS, G. C. S. Intimal ground substance in atherosclerosis. **Can Med Assoc J.**, v. 69, n. 1, p. 17-22, 1953.

YAMAUCHI, A. **Fine structure of the fish heart.** In: Bourne G (ed) Heart and heart-like organs. New York: Academic, 1980. v. 1, p. 119-148.

**5 ARTIGO I**

**HIPERPLASIA EM TÚNICAS DE ARTÉRIAS CORONÁRIAS DE BELJUPIRÁS  
CRIADOS EM SISTEMA *OFFSHORE***

Manuscrito a ser submetido:

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia  
(Brazilian Journal of Veterinary and Animal Sciences)

ISSN: 0102-0935

1 **Hiperplasia em táticas de artérias coronárias de beijupirás criados em sistema *offshore***

2 V.F. Pedrosa<sup>1\*</sup>, L.A. Romano<sup>2</sup>, F.L. dos Santos<sup>3</sup>, J.M. Guimarães<sup>1</sup>, A.D.R. da Silva<sup>4</sup>, E.S.  
3 Mendes<sup>3</sup>

4  
5 <sup>1</sup>Doutorando(a) do Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária, UFRPE, PE; e-mail:  
6 [vikavet@yahoo.com.br](mailto:vikavet@yahoo.com.br)

7 <sup>2</sup>Professor associado da Universidade Federal do Rio Grande, FURG, RS

8 <sup>3</sup>Professor adjunto do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural  
9 de Pernambuco, UFRPE, PE

10 <sup>4</sup>Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura da  
11 Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, PE

12  
13 **RESUMO**

14  
15 As lesões coronarianas já foram relatadas em espécies de peixes anádromos com  
16 características semelhantes às observadas em aterosclerose humana, mas não em peixes  
17 cultivados sem interferência de padrões reprodutivos. Objetivou-se descrever lesões  
18 coronarianas em beijupirá (*Rachycentron canadum*) criados em sistema *offshore*, em 54  
19 exemplares coletados ao longo do cultivo de oito meses. Amostras de tecido cardíaco de  
20 alevinos e juvenis foram submetidas à análise histopatológica e microscopia eletrônica de  
21 transmissão (MET), para visualização de lesões coronarianas, sendo as lâminas histológicas  
22 coradas pela técnica de hematoxilina-eosina, ácido periódico de Schiffh, alcian blue e  
23 reticulina de Gomori. Exames realizados pela fotomicroscopia de luz evidenciaram lesões  
24 arteriais caracterizadas por hiperplasia das táticas íntima e média de artérias coronárias, em  
25 respectivamente 29,63% e 79,63% dos animais, com redução do lúmen arterial. Na MET,  
26 foram observadas alterações na estrutura das coronárias com espessamento do endotélio e  
27 membrana basal, proliferação de fibroblastos e fibras colágenas, com acúmulo de material  
28 lipídico subendotelial, resíduos celulares aderidos à membrana basal e vesículas pinocitóticas  
29 com presença de lisossomos isolados. Constatou-se que os peixes da espécie *Rachycentron*  
30 *canadum* criados em cativeiro desenvolveram lesão arterial do tipo crônica degenerativa  
31 inflamatória.

32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42 **Palavras-chave:** aterosclerose, hiperplasia, histopatologia, microscopia eletrônica de  
43 transmissão, *Rachycentron canadum*.

44           **Hyperplasia in tunics of coronary arteries in beijupirá farmed in *offshore* system**

45

46

47

48   **ABSTRACT**

49

50   The coronary lesions have been reported in species of anadromous fish similar to  
51   characteristics observed in human atherosclerosis, but not in farmed fish without interference  
52   of reproductive patterns. This study aimed to describe coronary lesions in beijupirá  
53   (*Rachycentron canadum*) farmed in *offshore* system, in 54 specimens collected along the  
54   cultivation of eight months. Samples of heart tissue of fry and juveniles to histopathological  
55   analysis and transmission electron microscopy (TEM) for visualization of coronary lesions,  
56   the histology slides were stained using hematoxylin-eosin, periodic acid Schiffh, alcian blue,  
57   and reticulin of Gomori. Examinations performed by light microscopy light showed arterial  
58   lesions characterized by hyperplasia of the intima and media tunics, respectively in 29.63%  
59   and 79.63 % of the animals, with reduced lumen. In TEM, were observed changes in the  
60   structure of the coronary endothelium and thickening of the basement membrane,  
61   proliferation of fibroblasts and collagen fibers, with subendothelial accumulation of lipid  
62   material, cellular debris adhering to the basement membrane and presence of pinocytotics  
63   vesicles and isolated lysosomes. It has been found that fish *Rachycentron canadum* species  
64   farmed in captivity develop arterial lesion of chronic inflammatory degenerative type.

65

66

67

68

69

70

71

72

73

74

75

76

77

78

79

80

81   **Keywords** atherosclerosis, hyperplasia, histopathology, transmission electron microscopy,  
82   *Rachycentron canadum*.

## 83 INTRODUÇÃO

84

85 Os processos degenerativos arteriais podem ser classificados em arterioscleróticos e  
86 ateroscleróticos, sendo a aterosclerose uma variante morfológica da arteriosclerose. O termo  
87 “arteriosclerose” designa o endurecimento das artérias e é relacionado a uma gama de  
88 processos que englobam o espessamento arterial e a perda de elasticidade das artérias  
89 (Robbins, 2000).

90 Existe uma série de alterações da parede vascular que precedem o surgimento da  
91 aterosclerose, tais como hiperplasia da íntima, aparecimento de células  
92 espumosas/macrófagos, acúmulo de colesterol, agregação plaquetária, trombogênese e  
93 inflamação tecidual, levando a uma hipertrofia nas túnicas arteriais (Daoud *et al.*, 1964; Stary  
94 *et al.*, 1995; Subbotin, 2007).

95 As túnicas arteriais podem apresentar alterações, como o aumento das células que  
96 formam uma multi-camada entre a membrana elástica interna e a muscular e o aumento do  
97 tamanho das fibras musculares lisas que formam a túnica média da parede arterial, gerando  
98 hiperplasia. Com o espessamento da túnica média arterial, ocorre a expressão da alfa-actina  
99 no músculo liso, permanente ou transitoriamente, progredindo para uma lesão aterosclerótica  
100 (Stary *et al.*, 1995).

101 Em peixes teleósteos, as patologias relacionadas ao sistema cardiovascular não  
102 possuem ainda uma etiopatogenia definida, por ser pouco pesquisada. Em alguns estudos, as  
103 alterações coronarianas em peixes teleósteos foram associadas à maturação sexual e desova  
104 em salmão (Robertson e Wexler, 1962) e em truta arco-íris (Schmidt e House, 1979).

105 Em humanos, verificou-se que quando o endotélio vascular perde a capacidade de  
106 manter um equilíbrio entre as túnicas, a camada íntima fica exposta e a aterosclerose evolui  
107 provocando um espessamento da camada média. O estresse é um dos principais responsáveis  
108 por este espessamento das camadas arteriais (Willis, 1953).

109 Na aterosclerose, doença inflamatória crônica, tem sido defendida a idéia de que a  
110 atividade inflamatória persistente em pacientes com doenças autoimunes representa o  
111 principal mecanismo que promove a aterogênese, causando lesão ao endotélio e alterando o  
112 metabolismo de lipoproteínas envolvidas no processo. O que indica ainda um relevante papel  
113 da imunidade na progressão da doença (Narshi *et al.*, 2011).

114 Em alguns estudos, a aterosclerose foi caracterizada como processo inflamatório, em  
115 que os leucócitos contribuem com a estenose arterial e consequente espessamento neointimal  
116 da túnica, devido ao seu volume no interior da camada íntima (Moreno *et al.*, 1996).

117 Apesar de vários autores terem se referido a sinais de lesão coronariana em algumas  
118 espécies de peixes, com características semelhantes às observadas na aterosclerose em  
119 humanos, é desconhecida a ocorrência de tais lesões em peixes cultivados, em diferentes  
120 estágios de crescimento, com ou sem interferência de diferentes padrões reprodutivos, o que  
121 foi relatado por tais autores como sendo um fator relevante no surgimento das lesões  
122 (Robertson e Wexler, 1962; House *et al.*, 1979; Schmidt e House, 1979; Eaton *et al.*, 1984). O  
123 estresse proveniente de mecanismos fisiológicos ou até mesmo em função de falhas no  
124 manejo como nutrição inadequada, surgem como possíveis fatores que interferem no  
125 surgimento de desordens nos animais.

126 Diante do exposto, objetivou-se avaliar beijupirás cultivados em sistema *offshore*, no  
127 tocante as lesões cardiovasculares, mais precisamente nas artérias coronárias.

128

## 129 MATERIAL E MÉTODOS

130

131 Os exemplares de beijupirás foram obtidos a partir de cultivo *offshore*, situado a cinco  
132 quilômetros da costa, no estado de Pernambuco/Brasil. Durante oito meses de cultivo, foram  
133 alimentados duas vezes ao dia com ração comercial de produção nacional, com concentrações  
134 de proteína bruta (PB) e lipídios totais de 41,76% e 7,93%, respectivamente.

135 Os 54 peixes coletados, sendo 15 alevinos e 39 juvenis, foram eutanasiados por  
136 imersão em cloridrato de benzocaína (éster etílico do ácido paraaminobenzóico) e,  
137 posteriormente, submetidos à necrópsia, seguindo-se as recomendações de Reimschuessel *et*  
138 *al.* (1988). Amostras de tecido cardíaco foram fixadas em formalina tamponada a 10% para  
139 análise histopatológica. Os tecidos foram desidratados em séries crescentes de etanol,  
140 embebidos em parafina e seccionados em micrótomo a cinco micra (5µm).

141 As lâminas histológicas foram coradas por hematoxilina-eosina (HE), ácido periódico  
142 de Schiffh (PAS), alcian blue e a técnica de reticulina de Gomori, sendo posteriormente  
143 examinadas em microscópio óptico.

144 As amostras de tecido cardíaco também foram avaliadas em microscopia eletrônica de  
145 transmissão (MET). Após fixação em 10% de formalina tamponada, os tecidos foram cortados  
146 em blocos milimétricos de 1mm, em seguida imersos em fixador de Carson com cerca de  
147 quinze vezes seu volume, sendo posteriormente armazenados a 4°C até sua manipulação. A  
148 formulação da formalina tampão fosfato Millonig's modificado seguiu o protocolo: 186g de  
149 di-hidrogenofosfato de ortofosfato de sódio (NaH<sub>2</sub>PO<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O) e 4,2g de hidróxido de sódio  
150 (NaOH) adicionados e dissolvidos em 800ml de água destilada, sendo o volume final ajustado

151 para 900ml com água destilada e, por fim, foi adicionada 100ml de solução de formaldeído a  
152 36%. O pH do fixador apresentava valores entre 7,2 a 7,4 e a osmolaridade do veículo tampão  
153 com 290 mmolkg<sup>-1</sup> (Carson *et al.*, 1973). Depois de fixadas, todas as amostras de tecido  
154 cardíaco foram lavadas por um total de três horas, fracionadas em três lavagens em tampão  
155 fosfato 0,12 M de Millonig's, pH 7,2, com 3% de sacarose. Os tecidos foram submetidos a  
156 pós-fixação durante 90 minutos em tampão fosfato a 1% de tetróxido de ósmio de Millonig's,  
157 seguida de séries crescentes de desidratação em etanol e embebidos em resina araldite. Os  
158 tecidos foram seccionados com ultramicrótomo e corados com acetato de uranila e citrato de  
159 chumbo para posterior exame em microscópio eletrônico (JEOL, JEM- T8, Japão).

160

## 161 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

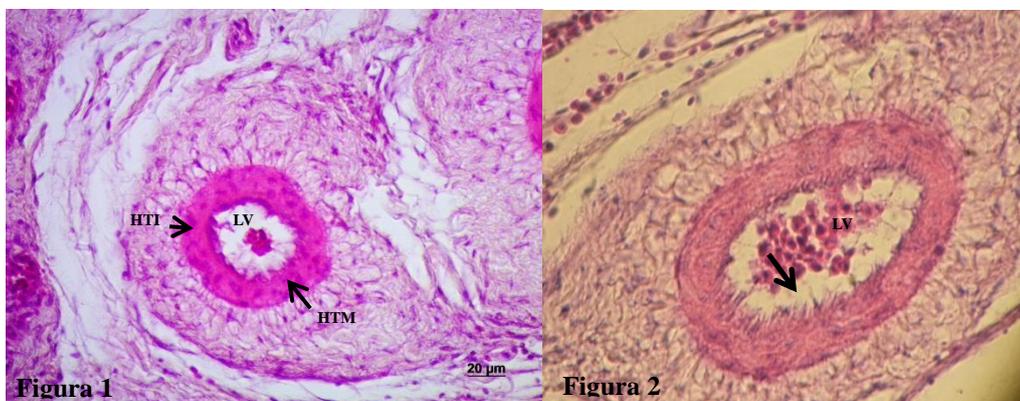
162

163 Os peixes analisados foram cultivados por oito meses em sistema *offshore*, com  
164 temperatura variando entre 26,1 e 29,9°C, salinidade de 31,0 a 37,3, oxigênio dissolvido de  
165 5,2 a 8,0mg/L e transparência entre 6,0 e 17,5m, com peso final médio de 347g.

166 Foram observadas lesões coronarianas arteriais, principalmente do tipo hiperplásica da  
167 túnica íntima e média dos vasos no exame histopatológico, estando presentes independentes  
168 do tempo de cultivo. A hiperplasia da túnica íntima esteve presente em 29,63% dos animais  
169 coletados e da túnica média em 79,63%.

170 Nas lâminas coradas pelo método da hematoxilina-eosina foram observadas  
171 hiperplasia de células endoteliais da túnica íntima, aumento de tecido subendotelial e  
172 infiltração de “células espumosas” na parede do vaso, que são características de início de  
173 lesão vascular, cujo desfecho poderia ser o estabelecimento da aterosclerose (Fig. 1 e 2).

174



175

176 **Figura 1:** Hiperplasia de túnica íntima (HTI) e túnica média (HTM) em artérias coronárias; Lúmen  
177 vascular (LV). H&E-coloração, Bar = 20, 51x37mm (600 x 600 DPI).

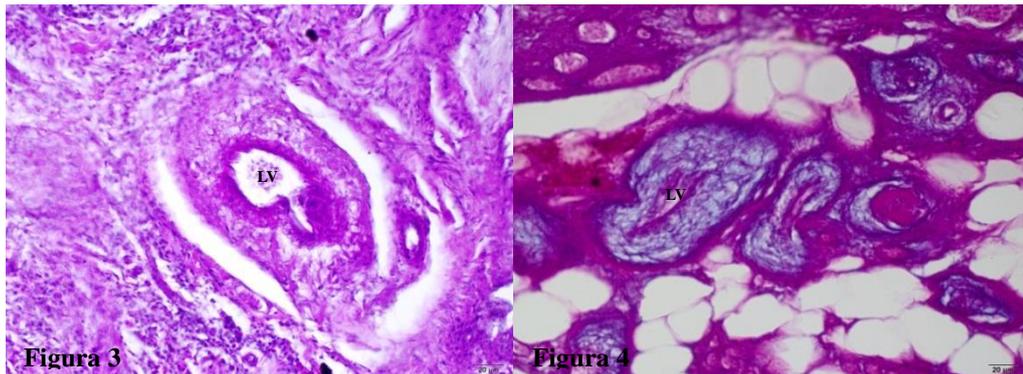
178

179 **Figura 2:** Hiperplasia de túnica média e presença de “células espumosas” (seta) em artérias coronárias.  
180 H&E-coloração, Bar = 20, 51x37mm (600 x 600 DPI).

180

180 A oclusão luminal é bem identificada nos tecidos submetidos a coloração com PAS  
181 (Fig. 3) e alcian blue (Fig. 4), onde é possível visualizar sinais de estenose luminal. As artérias  
182 coronárias analisadas evidenciaram alterações na estrutura das túnicas, com sinais de  
183 hiperplasia e obstrução luminal, com acúmulo de proteoglicanos na análise histopatológica  
184 com coloração alcian blue, demonstrando a presença de alterações na composição da matriz  
185 extracelular (França e França, 2001).

186



187

188

189

190

191

192

193

194

195

196

197

198

199

200

201

202

203

204

205

206

207

208

209

**Figura 3**

Figura 3: Lesões na artéria coronária com estreitamento do lúmen vascular (LV). Coloração PAS, Bar = 20, 51x37mm (600 x 600 DPI).

**Figura 4**

Figura 4: Lesões na artéria coronária com estreitamento do lúmen vascular (LV). Coloração Alcian Blue, Bar = 20, 51x37mm (600 x 600 DPI).

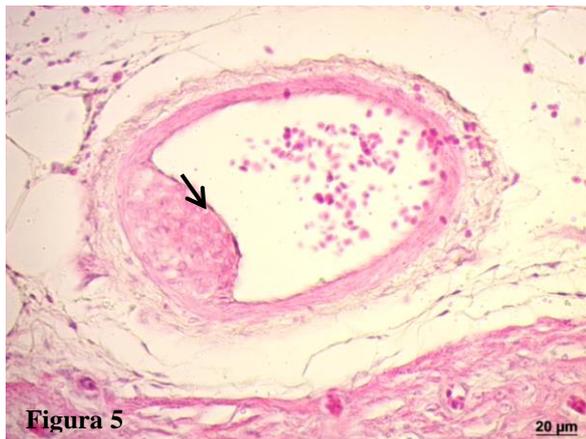
As alterações histológicas em artérias coronárias foram descritas em teleósteos anádromos, com hábito migratório, sendo a hiperplasia miointimal e sinais de arteriosclerose coronária associadas ao período de desova e maturação sexual (House *et al.*, 1979; Eaton *et al.*, 1984). Estes fatores não devem ter interferido no desenvolvimento das lesões coronarianas do beijupirá, por eles não realizarem migração para fins reprodutivos. Além disso, os animais do experimento foram coletados antes de completar um ano de idade, sendo uma parte coletada inclusive durante a fase de alevinos, que apresentaram o mesmo tipo de lesão.

Após a primeira descrição de ocorrência de alterações em vasos coronários de salmonídeos (Robertson *et al.*, 1961), houve grande interesse em se definir os componentes responsáveis pelo surgimento das lesões. Porém, não foi possível identificar a etiologia da lesão aqui descrita em beijupirás, semelhantemente aos relatos de Prior *et al.* (1968), que não conseguiram apresentar a etiologias das alterações coronarianas observadas em truta da Nova Zelândia, constando de uma doença cardíaca mais avançada e calcificante, caracterizada por lesões que progrediram para dilatação vascular e formação de placas calcificadas no bulbo arterial, demonstrando semelhança com a arteriosclerose em humanos.

Uma possível relação da arteriosclerose coronária com a maturação sexual foi encontrada em truta arco-íris e na prateada, em indivíduos sexualmente maduros e que

210 apresentavam hiperplasia miointimal. Na ocasião, foi verificada que a integridade de artérias  
211 coronárias dependia do equilíbrio de hormônios sexuais, como gonadotrofinas, estradiol,  
212 testosterona, cortisol e ACTH, que podem desempenhar um importante papel na indução ou  
213 regressão de degeneração vascular (Mckenzie *et al.*, 1978), o que também não se aplica para o  
214 caso relatado neste trabalho, por não envolver animais sexualmente maduros.

215 No coração dos animais analisados nesta pesquisa, placas de ateromas foram  
216 encontradas em alguns vasos, caracterizando a gravidade da lesão, com possível evolução  
217 para uma isquemia e infarto do miocárdio, por oclusão luminal (Fig. 5). A hipertrofia da  
218 camada muscular arterial observada é compatível com o aumento da resistência da circulação  
219 periférica, o que faz o conjunto de alterações encontradas serem classificadas como lesão  
220 vascular crônica degenerativa inflamatória. Acredita-se ainda que a hiperplasia da túnica  
221 média com oclusão do lúmen vascular, observada nas artérias coronárias, possibilite a  
222 ocorrência de uma isquemia miocárdica.



223 **Figura 5**  
224 Figura 5: Formação de placa de ateroma em artérias  
225 coronárias (seta). H&E-coloração, Bar = 20, 51x37mm (600  
226 x 600 DPI).

227  
228 Nas artérias de beijupirá foi verificado por meio de MET, além de espessamento  
229 endotelial e de membrana basal, proliferação de fibroblastos e fibras colágenas (Fig. 6),  
230 igualmente ao observado em pesquisa utilizando a cabra (*Capra hircus*) como modelo de  
231 estudo de aterosclerose em humanos, onde foi relatada a presença de colágeno e fibras  
232 elásticas na lâmina interna de artérias coronárias (Ogeng'o et al. 2010).

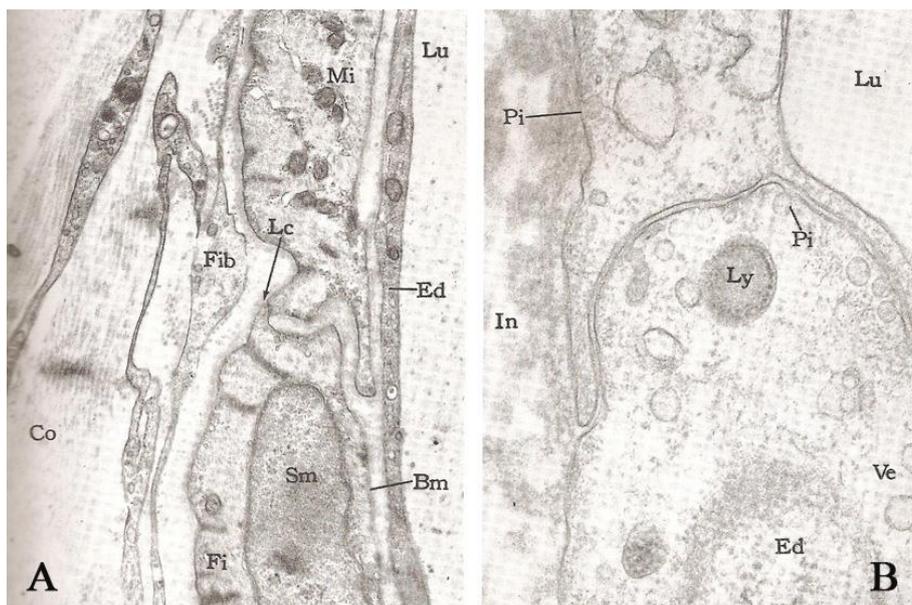


Figura 6. A: Alterações na estrutura de artérias coronárias. Lúmen arterial (Lu), endotélio (Ed), espessamento de membrana basal (Bm), células musculares lisas (Sm) com mitocôndrias abundantes (Mi) e proliferação de fibroblastos (Fib) e fibras colágenas (Co). Aderências laterais nas células musculares lisas (Lc), 15.000X. B: Células endoteliais da artéria (Ed), abundantes vesículas picnóticas (Pi) e lisossomos isolados (Ly); membrana elástica interna (In). 50.000 X.

233  
234  
235  
236  
237  
238  
239  
240

241 Na hiperplasia da túnica íntima ocorre uma resposta secundária da parede arterial, em  
242 consequência dos esforços mecânicos e estresse de cisalhamento, levando a doença arterial  
243 oclusiva (Stary *et al.*, 1992), pela migração e proliferação anormal de células de músculo liso  
244 associada com a deposição de matriz extracelular de tecido conjuntivo na parede (Daves e  
245 Hagen, 1994).

246 A progressão da lesão foi observada com maior espessamento do endotélio e  
247 membrana basal, com acúmulo de material amorfo lipídico subendotelial e resíduos celulares  
248 aderidos à membrana basal (Fig. 7), o que representa bem a lesão aterosclerótica descrita em  
249 humanos, que consiste de depósitos lipídicos e acúmulo de macrófagos, com proliferação de  
250 células espumosas na túnica íntima (Stary *et al.*, 1992).



251  
252  
253  
254  
255  
256  
257  
Figura 7: Parede arterial coronária com lesões avançadas. Espessamento do endotélio (En) e da membrana basal (Mb), com acúmulo de material amorfo de aspecto lipídico subendotelial (AM). Observa-se resíduos celulares aderidos à membrana basal (CR). 15.400 X.

258       As células espumosas foram visualizadas na parede vascular de beijupirás (Fig 2)  
259 como componentes essenciais da placa aterosclerótica (Masuda e Ross, 1990), o que ainda  
260 pode ser agravado com a formação de placas fibrosas, que causam a interrupção do fluxo  
261 sanguíneo, com consequente necrose isquêmica (Libby e Hansson, 1991). A ocorrência de  
262 células espumosas na lesão já foi evidenciada por Koppang *et al.* (2007), demonstrando que  
263 ocorre em salmonídeos uma forma similar da aterosclerose humana clássica.

264       A infiltração de vesículas pinocitóticas com presença de lisossomos isolados também  
265 visualizada no lúmen por meio de MET (Fig. 5), caracteriza o processo de pinocitose que  
266 ocorre em macrófagos quando macromoléculas aderem à membrana celular. Após o  
267 surgimento da vesícula pinocitótica os lisossomos ligam-se à vesícula, transformando-se em  
268 um órgão digestivo da célula, que entre suas funções está a de hidrólise de proteínas,  
269 carboidratos e lipídios no interior da célula (Guyton e Hall, 2011).

270       Farrell (2002) mencionou a rápida taxa de crescimento como indutor de estresse,  
271 contribuindo para o início da lesão coronariana. Isso ressalta a importância de pesquisas sobre  
272 o real envolvimento de fatores dietéticos, especialmente ácidos graxos poli-insaturados, na  
273 proliferação de células musculares lisas em artérias coronárias, com consequente  
274 desenvolvimento de lesões ateroscleróticas em salmonídeos.

275 Os lipídios apresentam um papel essencial na vida reprodutora de salmonídeos,  
276 fornecendo energia para atividade reprodutora e sendo consumido durante a migração sexual  
277 (McVeigh *et al.*, 2007). Dietas com maior teor lipídico do que protéico ainda tem efeito  
278 positivo na maturação precoce, provavelmente devido ao aumento da quantidade de energia  
279 de reserva (Jonsson *et al.*, 2013). Uma vez que outros autores descreveram as lesões em  
280 salmonídeos sendo associadas a períodos reprodutivos, a mobilização de gordura necessária  
281 para essa fase aparece como um possível desencadeador no surgimento das lesões, que não se  
282 aplica nos animais aqui analisados e identificados com lesão, por serem muito jovens.

283 A espécie aqui em estudo é bem conhecida por seu rápido ganho de peso (Liao e  
284 Leaña, 2007), embora seu cultivo ainda se encontre incipiente em relação à qualidade de  
285 alimento ofertado e real necessidade nutricional, no que se refere a níveis adequados dos  
286 elementos que compõem a ração.

287 Levando em conta o hábito das espécies dos beijupirás, o sistema cardiovascular é  
288 adequado para o meio aquático e adaptações estratégicas ambientais e de estilo de vida podem  
289 resultar em variações interespecíficas na fisiologia cardiovascular (Baldisserotto, 2009), não  
290 se excluindo, portanto, o efeito do estresse nas lesões ateromatosas.

291 O papel do estresse no início da doença aterosclerótica já foi bem evidenciado em  
292 humanos. Quando o endotélio vascular perde a capacidade de manter um equilíbrio entre as  
293 túnicas, a camada íntima fica exposta e a aterosclerose evolui provocando um espessamento  
294 da camada média (Willis, 1953). Sendo o beijupirá uma espécie com hábito solitário, o  
295 adensamento que ocorre nos cultivos pode contribuir para uma situação desfavorável ao  
296 animal, desencadeando uma série de alterações fisiológicas que podem refletir em lesões  
297 vasculares, com possível aumento de pressão arterial.

298 Ainda em relação ao estresse como um fator importante no surgimento das lesões  
299 arteriais em beijupirá, ocorre uma elevação nos níveis de cortisol devido a exposição a  
300 situações estressantes, ocorrendo respostas que ameaçam o bem estar e a saúde, com respostas  
301 endócrinas em nível de catecolaminas e corticosteroides e respostas secundárias relacionadas  
302 ao metabolismo, equilíbrio hidromineral e cardiovascular, respiratório e nas funções  
303 imunológicas. A ação isolada ou combinada de respostas primárias e secundárias resulta em  
304 alterações na concentração de componentes sanguíneos e ao nível celular (Barton, 2002).

305

306

307

308

309 **CONCLUSÃO**

310

311 Os peixes da espécie *Rachycentron canadum* (beijupirá) criados em cativeiro  
312 desenvolvem alterações cardiovasculares, com lesão arterial do tipo crônica degenerativa  
313 inflamatória.

314

315

316

317

318

319

320

321

322

323

324

325

326

327

328

329

330

331

332

333

334

335

336

337

338

339

340

341

342

343 **REFERENCIAS**

344

345 BALDISSEROTTO, B. *Fisiologia de peixes aplicada à aquicultura*. 2.ed. Santa Maria:  
346 Editora UFSM, 2009. 352 p.

347

348 BARTON, B.A. Stress in Fishes: A diversity of responses with particular reference to changes  
349 in circulating corticosteroids. *Integ. and Comp. Biol.*, v. 42, p.517-525, 2002.

350

351 CARSON, F.L.; MARTIN, J.H.; LYNN, J.A. Formalin fixation for electron microscopy: a  
352 reevaluation. *American Journal of Clinical Pathology*, v.59, p.365-373 1973.

353

354 DAOUD, A.; JARMOLYCH, J.; ZUMBO, A.; FANI, K. Preatheroma phase of coronary  
355 atherosclerosis man. *Exp Mol Pathol.*, v.90, p.475-484, 1964.

356

357 DAVES, M.G.; HAGEN, P-O. Pathobiology of intimal hyperplasia *British Journal of*  
358 *Surgery*, v. 81, 9, p.1254-1269, 1994.

359

360 EATON, R.P.; MCCONNELL, T.; HNATH, J. et al. Coronary myointimal hyperplasia in  
361 freshwater lake Michigan salmon (Genus *Oncorhynchus*). Evidence for lipoprotein-related  
362 atherosclerosis. *Am J Pathol.*, v.116(2), p.311-8, 1984.

363

364 FARREL, A.P. Coronary arteriosclerosis in salmon: growing old or growing fast?. *Comp*  
365 *Biochem Physiol A Mol Integ Physiol.*, v.132(4), p.723-35, Aug 2002.

366

367 FRANÇA, T.A. DE; FRANÇA, N.A. DE A.C. de. Aspectos morfológicos e citopatológicos  
368 das lesões ateroscleróticas em crianças e adolescentes e sua aterogênese. *Pediatria* (São  
369 Paulo) v.1, p.10-16, 2001.

370

371 GUYTON, A.C.; HALL, J.E. *Tratado de fisiologia médica*. 12.ed., Rio de Janeiro:  
372 Elsevier/Medicina Nacionais, 2011. 1216p.

373

374 HOUSE, B.W.; DOMAUER, R.J.; VANLENTEN, B.J. Production of coronary  
375 arteriosclerosis with sex hormones and HCG in juvenile steelhead and rainbow trout, *Salmo*  
376 *gairdneri*, *Atherosclerosis*, v.34, p.197, 1979.

377

378 JONSSON, B.; JONSSON, N; FINSTAD, A.G. Effects of temperature and food quality on age  
379 and size at maturity in ectotherms: an experimental test with *Atlantic salmon*. *Journal of*  
380 *Animal Ecology*, v. 82, i.1, p.201-210, 2013.

381

382 KOPPANG, E.O.; FISCHER, U.; SATOH, M.; JIRILLO, E. Inflammation in fish as seen from  
383 a morphological point of view with special reference to the vascular compartment. *Current*  
384 *Pharmaceutical Design*, v.13, p.3649-3655, 2007.

385

386 LIAO, I.C.; LEAÑO, E.M. *Cobia aquaculture: research, development and commercial*  
387 *production*. Taiwan: Asian Fisheries Society, 2007. 178p.

388

389 LIBBY, P.; HANSSON, G.K. Involvement of the immune system in human atherogenesis:  
390 current knowledge and unanswered questions. *Lab Invest.*, v.64(1), p.5-15, 1991.

391

392 MASUDA, J.; ROSS, R. Atherogenesis during low level hypercholesterolemia in the  
393 nonhuman primate. II. Fatty streak conversion of fibrous plaque. *Arteriosclerosis*, v.10(2),  
394 p.178-87, 1990.

395

396 MCVEIGH, B.R.; HEALEY, M.C.; WOLFE, F. Energy expenditures during spawning by  
397 chum salmon *Oncorhynchus keta* (Walbaum) in British Columbia. *Journal of Fish Biology*,  
398 v.71, i.6, p.1696-1713, 2007.

399

400 MCKENZIE, J.E.; HOUSE, E.W.; MCWILLIAM, J.G.; JOHNSON, D.W. Coronary  
401 degeneration in sexually mature rainbow and steelhead trout, *Salmo gairdneri*.  
402 *Atherosclerosis*, v.29, p.431-437, 1978.

403

404 MORENO, H.J.R.; METZE, K.; BENTO, A.C. et al. Chronic nitric oxide inhibition as a  
405 model of hypertensive heart muscle disease. *Basic Res Cardiol.*, v.91(3), p.248-55, 1996.

406

407 NARSHI, C.B.; GILES, I.P.; RAHMAN, A. The endothelium: an interface between  
408 autoimmunity and atherosclerosis in systemic lupus erythematosus? *Lupus*, v.20(1), p.5-13,  
409 Jan 2011.

410

411 OGENG'O, J.A.; MALEK, A.A.; KIAMA, S.G. Structural organization of tunica intima in the  
412 aorta of the goat. *Folia Morphol.*, v.69, n.3, p.164-169, 2010.

413

414 PRIOR, I.A.M.; WEBBER, W.L.; ALEXANDER, W.S.; BARCLAY, S. de C. Calcific heart  
415 disease in New Zealand brown trout. *Nature*, v.220, p.261-262, 19 October 1968.

416

417 REIMSCHUESSEL, R.; MAY, E.B.; BENNETT, R.O.; LIPSKY, M.M. Tropical fish  
418 medicine. Necropsy examination of fish. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, v.18(2),  
419 p.427-33, 1988.

420

421 ROBBINS, S.L. *Patologia estrutural e funcional*. 6.ed. Guanabara Koogan, 2000. 1251p.

422

423 ROBERTSON, O.H.; WEXLER, B.C.; MILLER, B.F. Degenerative changes in the  
424 cardiovascular system of the spawning pacific salmon ( *Oncorhynchus tshawytscha*).  
425 *Circulation Research*, v.9, p.826-272, 1961.

426

427 ROBERTSON, O.H.; WEXLER, B.C. Histological Changes in the organs and tissues of senile  
428 castrated kokanee salmon (*Oncorhynchus nerka kennerlyi*). *General and Comparative*  
429 *Endocrinology*, v.2, i.5, p.458-472, October 1962.

430

431 SCHMIDT, S.P.; HOUSE, E.W. Time study of coronary myointimal hyperplasia in precocious  
432 male steelhead trout, *Salmo gairdneri*. *Atherosclerosis*, v.34, p.375-381, 1979.

433

434 STARY, H.C.; BLANKENHORN, D.H.; CHANDLER, A.B. et al. A definition of the intima  
435 of human arteries and of its atherosclerosis-prone regions. A report from the Committee on  
436 Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*,  
437 v.85, p.391-405, 1992.

438

439 STARY, H.C.; CHANDLER, A.B.; DINSMORE, R.E. et al. A definition of advanced types of  
440 atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the  
441 Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart

442 Association. *Circulation*, v.92, p.1355-1374, 1995.

443

444 SUBBOTIN, V.M. Analysis of arterial intimal hyperplasia: review and hypothesis.  
445 *Theoretical Biology and Medical Modelling*, 4, 41, 2007.

446

447 WILLIS, G.C.S. Intimal Ground Substance in Atherosclerosis. *Can. Med. Assoc. J.*, v.69, n.1,  
448 p.17-22, 1953.

449

450

# **INSTRUÇÕES AOS AUTORES**

## **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**

*(Brazilian Journal of Veterinary and Animal Sciences)*

### **Política Editorial**

O periódico *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science)*, ISSN 0102-0935 (impresso) e 1678-4162 (on-line), é editado pela FEPMVZ Editora, CNPJ: 16.629.388/0001-24, e destina-se à publicação de artigos científicos sobre temas de medicina veterinária, zootecnia, tecnologia e inspeção de produtos de origem animal, aquacultura e áreas afins.

Os artigos encaminhados para publicação são submetidos à aprovação do Corpo Editorial, com assessoria de especialistas da área (relatores). Os artigos cujos textos necessitarem de revisões ou correções serão devolvidos aos autores. Os aceitos para publicação tornam-se propriedade do Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (ABMVZ) citado como *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* Os autores são responsáveis pelos conceitos e informações neles contidos. São imprescindíveis originalidade, ineditismo e destinação exclusiva ao ABMVZ.

### **Reprodução de artigos publicados**

A reprodução de qualquer artigo publicado é permitida desde que seja corretamente referenciado. Não é permitido o uso comercial dos resultados. A submissão e tramitação dos artigos é feita exclusivamente on-line, no endereço eletrônico <[www.abmvz.org.br](http://www.abmvz.org.br)>.

Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis nos endereços [www.scielo.br/abmvz](http://www.scielo.br/abmvz) ou [www.abmvz.org.br](http://www.abmvz.org.br).

### **Orientação para tramitação de artigos**

- Toda a tramitação dos artigos é feita exclusivamente pelo Sistema de publicação online do ABMVZ no endereço [www.abmvz.org.br](http://www.abmvz.org.br).
- Apenas o autor responsável pelo artigo deverá preencher a ficha de submissão, sendo necessário o cadastro do mesmo no Sistema.
- Toda comunicação entre os diversos atores do processo de avaliação e publicação (autores, revisores e editores) será feita exclusivamente de forma eletrônica pelo Sistema, sendo o autor responsável pelo artigo informado, automaticamente, por e-mail, sobre qualquer mudança de status do artigo.
- A submissão só se completa quando anexado o texto do artigo em Word e em pdf no campo apropriado.
- Fotografias, desenhos e gravuras devem ser inseridas no texto e também enviadas, em separado, em arquivo com extensão jpg em alta qualidade (mínimo 300dpi), zipado, inserido no campo próprio.
- Tabelas e gráficos não se enquadram no campo de arquivo zipado, devendo ser inseridas no corpo do artigo.
- É de exclusiva responsabilidade de quem submete o artigo certificar-se de que cada um dos autores tenha conhecimento e concorde com a inclusão de seu nome no mesmo submetido.
- O ABMVZ comunicará via eletrônica a cada autor, a sua participação no artigo.

Caso, pelo menos um dos autores não concorde com sua participação como autor, o artigo será recusado.

### **Tipos de artigos aceitos para publicação:**

- **Artigo científico**

É o relato completo de um trabalho experimental. Baseia-se na premissa de que os resultados são posteriores ao planejamento da pesquisa.

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Filiação, Resumo, Abstract, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão (ou Resultados e Discussão), Conclusões, Agradecimentos (quando houver) e Referências. O número de páginas não deve exceder a 15, incluindo tabelas e figuras. O número de Referências não deve exceder a 30.

▪ **Relato de caso**

Contempla principalmente as áreas médicas, em que o resultado é anterior ao interesse de sua divulgação ou a ocorrência dos resultados não é planejada. Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Filiação, Resumo, Abstract, Introdução, Casuística, Discussão e Conclusões (quando pertinentes), Agradecimentos (quando houver) e Referências. O número de páginas não deve exceder a 10, incluindo tabelas e figuras.

O número de Referências não deve exceder a 12.

▪ **Comunicação**

É o relato sucinto de resultados parciais de um trabalho experimental, dignos de publicação, embora insuficientes ou inconsistentes para constituírem um artigo científico. O texto, com título em português e em inglês, Autores e Filiação deve ser compacto, sem distinção das seções do texto especificadas para “Artigo científico”, embora seguindo aquela ordem. Quando a Comunicação for redigida em português deve conter um “Abstract” e quando redigida em inglês deve conter um “Resumo”. O número de páginas não deve exceder a 8, incluindo tabelas e figuras. O número de Referências não deve exceder a 12.

### **Preparação dos textos para publicação**

Os artigos devem ser redigidos em português ou inglês, na forma impessoal. Para ortografia em inglês recomenda-se o *Webster's Third New International Dictionary*. Para ortografia em português adota-se o *Vocabulário Ortográfico da Língua Portuguesa*, da Academia Brasileira de Letras.

### **Formatação do texto**

- O texto deve ser apresentado em Microsoft Word, em formato A4, com margem 3cm (superior, inferior, direita e esquerda), em fonte Times New Roman tamanho 12 e em espaçamento entrelinhas 1,5, em todas as páginas, com linhas numeradas.
- Não usar rodapé. Referências a empresas e produtos, por exemplo, devem vir, obrigatoriamente, entre parêntesis no corpo do texto na seguinte ordem: nome do produto, substância, empresa e país.

### **Seções de um artigo**

- **Título.** Em português e em inglês. Deve contemplar a essência do artigo e não ultrapassar 150 dígitos.
- **Autores e Filiação.** Os nomes dos autores são colocados abaixo do título, com identificação da instituição a que pertencem. O autor para correspondência e seu e-mail devem ser indicados com asterisco.

### **Nota:**

1. o texto do artigo em Word deve conter o nome dos autores e filiação.
2. o texto do artigo em pdf **não** deve conter o nome dos autores e filiação.
  - **Resumo e Abstract.** Deve ser o mesmo apresentado no cadastro contendo até 2000 dígitos incluindo os espaços, em um só parágrafo. Não repetir o título e incluir os principais resultados numéricos, citando-os sem explicá-los, quando for o caso. Cada frase deve conter uma informação. Atenção especial às conclusões.
  - **Palavras-chave e Keywords.** No máximo cinco.

- **Introdução.** Explicação concisa, na qual são estabelecidos brevemente o problema, sua pertinência e relevância e os objetivos do trabalho. Deve conter poucas referências, suficientes para balizá-la.
- **Material e Métodos.** Citar o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos métodos usados ou referenciar corretamente os métodos já publicados. Não usar subtítulos. Nos trabalhos que envolvam animais e organismos geneticamente modificados deverá constar, obrigatoriamente, o número do protocolo de aprovação do Comitê de Bioética e/ou de Biossegurança, quando for o caso.
- **Resultados.** Apresentar clara e objetivamente os resultados encontrados.
- ✓ **Tabela.** Conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Usar linhas horizontais na separação dos cabeçalhos e no final da tabela. A legenda recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico e é referida no texto como Tab., mesmo quando se referir a várias tabelas. Pode ser apresentada em espaçamento simples e fonte de tamanho menor que 12 (menor tamanho aceito é 8).
- ✓ **Figura.** Qualquer ilustração que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema, etc. A legenda recebe inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico e é referida no texto como Fig., mesmo se referir a mais de uma figura. As fotografias e desenhos com alta qualidade em formato jpg, devem ser também enviadas, em um arquivo zipado, no campo próprio de submissão.

**Nota:**

- ✓ Toda tabela e/ou figura que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, informação sobre a fonte (autor, autorização de uso, data) e a correspondente referência deve figurar nas Referências.
- ✓ As tabelas e figuras devem preferencialmente, ser inseridas no texto no parágrafo seguinte à sua primeira citação.
- **Discussão.** Discutir somente os resultados obtidos no trabalho. (Obs.: As seções

Resultados e Discussão poderão ser apresentadas em conjunto a juízo do autor, sem prejudicar qualquer das partes).

- **Conclusões.** As conclusões devem apoiar-se nos resultados da pesquisa executada.
- **Agradecimentos.** Não obrigatório. Devem ser concisamente expressados.
- **Referências.** As referências devem ser relacionadas em ordem alfabética. Evitar referenciar livros e teses. Dar preferência a artigos publicados em revistas nacionais e internacionais, indexadas. São adotadas as normas ABNT/NBR-6023 de 2002, adaptadas conforme exemplos:

**Como referenciar:**

**1. Citações no texto**

- Citações no texto deverão ser feitas de acordo com ABNT/NBR 10520 de 2002. A indicação da fonte entre parênteses sucede à citação para evitar interrupção na seqüência do texto, conforme exemplos:
- ✓ autoria única: (Silva, 1971) ou Silva (1971); (Anuário..., 1987/88) ou Anuário... (1987/88)
- ✓ dois autores: (Lopes e Moreno, 1974) ou Lopes e Moreno (1974)
- ✓ mais de dois autores: (Ferguson *et al.*, 1979) ou Ferguson *et al.* (1979)
- ✓ mais de um artigo citado: Dunne (1967); Silva (1971); Ferguson *et al.* (1979) ou (Dunne, 1967; Silva, 1971; Ferguson *et al.*, 1979), sempre em ordem cronológica ascendente e alfabética de autores para artigos do mesmo ano.

✓ *Citação de citação.* Todo esforço deve ser empreendido para se consultar o documento original. Em situações excepcionais pode-se reproduzir a informação já citada por outros autores. No texto, citar o sobrenome do autor do documento não consultado com o ano de publicação, seguido da expressão **citado por** e o sobrenome do autor e ano do documento consultado. Nas Referências, deve-se incluir apenas a fonte consultada.

✓ *Comunicação pessoal.* Não fazem parte das Referências. Na citação coloca-se o sobrenome do autor, a data da comunicação, nome da Instituição à qual o autor é vinculado.

## **2. Periódicos** (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores *et al.*):

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. v.48, p.351, 1987-88.

FERGUSON, J.A.; REEVES, W.C.; HARDY, J.L. Studies on immunity to alphaviruses in foals. *Am. J. Vet. Res.*, v.40, p.5-10, 1979.

HOLENWEGER, J.A.; TAGLE, R.; WASERMAN, A. et al. Anestesia general del canino. *Not. Med. Vet.*, n.1, p.13-20, 1984.

## **3. Publicação avulsa** (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores *et al.*):

DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. 981p.

LOPES, C.A.M.; MORENO, G. Aspectos bacteriológicos de ostras, mariscos e mexilhões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 14., 1974, São Paulo. *Anais...* São Paulo: [s.n.] 1974. p.97. (Resumo).

MORRIL, C.C. Infecciones por clostridios. In: DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. p.400-415.

NUTRIENT requirements of swine. 6.ed. Washington: National Academy of Sciences, 1968. 69p.

SOUZA, C.F.A. *Produtividade, qualidade e rendimentos de carcaça e de carne em bovinos de corte.* 1999. 44f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

## **4. Documentos eletrônicos** (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores *et al.*):

QUALITY food from animals for a global market. Washington: Association of American Veterinary Medical College, 1995. Disponível em: <<http://www.org/critca16.htm>>. Acessado em: 27 abr. 2000.

JONHNSON, T. Indigenous people are now more combative, organized. Miami Herald, 1994. Disponível em: <<http://www.summit.fiu.edu/MiamiHerld-Summit-RelatedArticles/>>. Acessado em: 5 dez. 1994.

### **Nota:**

- Artigos que não estejam rigorosamente dentro das normas acima não serão aceitos para avaliação.

- O Sistema reconhece, automaticamente, como “Desistência do Autor” artigos em diligência ou “Aguardando diligência do autor”, que não tenha sido respondido no prazo dado pelo Sistema.

#### **Taxas de submissão e de publicação:**

- **Taxa de submissão.** A taxa de submissão de R\$30,00 deverá ser paga por meio de boleto bancário emitido pelo sistema eletrônico de submissão de artigos. Ao solicitar o boleto bancário, o autor informará os dados para emissão da nota fiscal. Somente artigos com taxa paga de submissão serão avaliados.

Caso a taxa não seja quitada em até 30 dias será considerado como desistência do autor.

- **Taxa de publicação.** A taxa de publicação de R\$70,00, por página impressa em preto e R\$220,00 por página impressa em cores será cobrada do autor indicado para correspondência, por ocasião da prova final do artigo. A taxa de publicação deverá ser paga por meio de boleto bancário emitido pelo sistema eletrônico de submissão de artigos. Ao solicitar o boleto bancário, o autor informará os dados para emissão da nota fiscal.

#### **Recursos e diligências:**

- No caso de o autor encaminhar resposta a diligências solicitadas pelo ABMVZ, ou documento de recurso, o mesmo deverá constar como a(s) primeira(s) página(s) do texto do artigo somente na versão em Word.
- No caso de artigo não aceito, se o autor julgar pertinente encaminhar recurso, o mesmo deve ser feito pelo e-mail [abmvz.artigo@abmvz.org.br](mailto:abmvz.artigo@abmvz.org.br).

**6 ARTIGO II**

**MORFOMETRIA DE ARTÉRIAS CORONÁRIAS DE BEIJUPIRÁS COM  
HIPERPLASIA DE TÚNICAS**

Manuscrito a ser submetido:

Journal of Fish Diseases

ISSN: 1365-2761

## Morfometria em artérias coronárias de beijupirá com hiperplasia de túnicas

V F Pedrosa<sup>1</sup>, L A Romano, F L dos Santos, R F Manghi, C N Barros, E S Mendes

<sup>1</sup>Doutoranda no Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária, UFRPE, PE, Brasil; e-mail: vikavet@yahoo.com.br

### RESUMO

A hiperplasia de túnicas pode ser quantificada por uma variedade de técnicas que se relacionam com as modificações da área ou espessura em cortes histológicos. A hiperplasia das túnicas de artérias coronárias foi relatada em espécies *Rachycentron canadum*. Este estudo teve como objetivo estabelecer a relação entre túnicas e obstrução luminal por morfometria. A análise morfométrica foi realizada em 158 vasos arteriais de 40 peixes. As lâminas histológicas de tecido cardíaco e vascular foram coradas com hematoxilina-eosina (HE) e, posteriormente, observadas sob um microscópio óptico. Os dados referentes à proporção da área do lúmen em relação à área da túnica média foram analisados de acordo com os modelos de regressão *Beta* para taxas e proporções. Verificou-se que a proporção do lúmen mostrou uma relação decrescente com o peso e tamanho dos animais analisados. Não observou-se uma relação linear entre a proporção do lúmen e as áreas e raio (espessura) das túnicas arteriais. Concluiu-se que o aumento no ganho de peso contribui para a redução da área do lúmen, que conduz a obstrução arterial, sem aumentar ou diminuir a relação entre a proporção do lúmen vascular com a espessura das túnicas arteriais. O conjunto de anormalidades descritas pode estar relacionado a fatores nutricionais durante o cultivo de *Rachycentron canadum*.

**Palavras-chave:** arteriopatia; histologia; nutrição; *Rachycentron canadum*

## **Morphometry in coronary arteria of beijupiras with hyperplasia of tunics**

### **ABSTRACT**

The Tunics hyperplasia of blood vessels may be quantified by a range of techniques that relate modifications of area or thick on histological cuts. We reported hyperplasia of tunics of coronary arteries in species *Rachycentron canadum*. This study aimed to establish the relationship between tunics and luminal obstruction by morphometry. The morphometric analysis was performed on 158 arterial vessels of 40 fish. The histological slides of cardiac and vascular tissue were stained using hematoxylin-eosin (HE) and subsequently observed under an optical microscope. The data relating to the proportion of the lumen area compared to the area of the tunic media were analyzed according to the Beta regression models for rates and proportions. It was found that the proportion of the lumen showed a decreasing relationship with the weight and length of the analyzed animals. There was observed a linear relationship between proportion of the lumen and areas and radius (thickness) of the arterial tunics. It was concluded that the increase in weight gain contributes to a reduction of the lumen area, leading to arterial obstruction without increasing or decreasing relationship between the proportion of the vascular lumen with the thickness of the arterial tunics. The set of abnormalities described may be related to nutritional factors during cultivation of *Rachycentron canadum*.

**Keywords:** arteriopathy; histology; nutrition; *Rachycentron canadum*

## INTRODUÇÃO

Estudos anatômicos de morfologia e morfometria nas artérias coronárias vêm sendo muito empregados na patologia humana, como o uso de raio-X e vários tipos de moldes (Zamir & Chee 1986): morfometria da microvascularização coronária (Spalteholz 1907; Nussbaum 1912), a técnica Wearn modificada e padrões de ramificações das arteríolas, capilares e vênulas de animais domésticos (Brown 1965) e, mais recentemente acerca do comprimento de capilares em humanos, estudando a estrutura microvascular por meio de reconstrução tridimensional (Kaneko et al. 2011).

A hiperplasia de túnicas de vasos sanguíneos representa o acúmulo de células musculares lisas agregadas a um conjunto de elementos teciduais que se alojam na camada vascular mais interna. Pode ser quantificada por uma série de técnicas, em sua maioria relacionando a medição de suas modificações relativas à área ou espessura de cortes histológicos (Dobin *et al.* 1988).

A hiperplasia intimal geralmente acompanha a progressão de uma doença arterial mais severa, como aterosclerose (Nakashima *et al.* 2002). A etiologia e a relação entre elas é bem elucidada em outras espécies, não sendo muito pesquisada ou mesmo notificada em peixes teleósteos não anádromos. Pesquisas envolvendo lesões vasculares em peixes se restringem a alterações coronarianas associadas à maturação sexual e desova em salmão (Robertson et al., 1961; Robertson & Wexler, 1962; Eaton et al., 1984) e em trutas (Schmidt & House, 1979; Prior et al., 1968).

A lesão aterosclerótica, anteriormente caracterizada pelo acúmulo de colesterol nos vasos, atualmente está relacionada à interação de uma série de fatores de risco como o acúmulo de lipídios modificados, macrófagos, o recrutamento de células musculares lisas (CML), de moléculas circulantes e teciduais (Subbotin 2007). Tais fatos permitiram afirmar

que o processo inflamatório está presentes em todas as fases do processo aterosclerótico (Bobryshev 2006).

Entre os fatores predisponentes para surgimento de lesão aterosclerótica, as perturbações metabólicas, obesidade visceral, hipertrigliceridemia, HDL baixo, e hiperglicemia são identificados como importantes elementos que associados ao estresse oxidativo, representam um fator relevante para o desenvolvimento de complicações cardiovasculares (Hopps *et al.* 2010).

Em beijupirá (*Rachycentron canadum*) nenhuma alteração coronariana foi pesquisada. Sendo assim, relatamos neste trabalho a hiperplasia de túnicas de artérias coronárias na espécie, objetivando-se estabelecer a relação existente entre as túnicas e a obstrução luminal por meio de morfometria.

## **MATERIAL E METODOS**

Os exemplares de beijupirás foram obtidos a partir de cultivo *offshore* situado a 5 km da costa, no estado de Pernambuco/Brasil, durante sete meses de cultivo.

Os animais foram transportados vivos, sob aeração e renovação de água constante, até o porto do Recife/PE, onde foi realizada sedação seguida da eutanásia, por imersão em cloridrato de benzocaína (éster etílico do ácido paraaminobenzóico) (Neiffer *et al.* 2009), os peixes foram submetidos ao exame externo e a necropsia foi realizada seguindo recomendações de Reimschuessel *et al.* (1988) com abertura lateral esquerda, sendo coletado o coração para exame microscópico e morfométrico.

As amostras de tecido cardíaco foram fixadas em formalina tamponada a 10% e após desidratação em séries crescentes de etanol, os tecidos foram embebidos em parafina e seccionados em micrótomo a cinco micra.

A análise morfométrica arterial foi realizada de 40 peixes da espécie *Rachycentron canadum* sendo oito alevinos e 32 juvenis, onde 158 vasos arteriais foram avaliados (Fig 1).

As lâminas histológicas de tecido cardíaco e vascular foram coradas utilizando-se hematoxilina-eosina (HE) (Barcellos 2008) e, posteriormente, observadas ao microscópio óptico.

As imagens dos cortes de tecido cardíaco foram digitalizadas para análise morfométrica com microscópio de luz Zess Primo Star com a câmera digital AxioCam ERc5s. A análise das imagens foi realizada com o software AxioVision 4.8.2.0 e a planimetria das áreas do lúmen de artérias coronárias e das camadas íntima, média e adventícia, foi realizada de forma aleatória.

Inicialmente, foi realizada uma análise descritiva das variáveis, sendo a de interesse a proporção da área do lúmen vascular (proplum), e o objetivo do estudo foi estudar a relação desta proporção com as demais variáveis.

Para a proposta de modelagem, os dados referentes à proporção da área do lúmen em relação à área da túnica média foram analisados de acordo com os modelos de regressão *Beta* para taxas e proporções (Ferrari & Cribari-Neto 2004; Zeileis & Cribari-Neto 2010). Foi investigada a influência das variáveis: área da túnica externa (túnica adventícia), área do lúmen, área da túnica média, área da túnica íntima, raio da túnica externa, raio da túnica média, raio da túnica íntima, raio do lúmen, diâmetro do vaso, diâmetro do lúmen, peso e comprimento dos exemplares de beijupirá coletados e o tempo de cultivo (em meses).

## RESULTADOS

Durante o período de coletas no cultivo, os parâmetros de temperatura, salinidade, oxigênio e transparência ao longo do cultivo variaram entre 26,1 e 29,9°C; 31,0 e 37,3; 5,2 e 8,0mg/L e 6,0 e 17,5m, respectivamente.

Nas artérias coronárias submetidas a análise morfométrica podem ser visualizados sinais de estenose luminal (Fig 2).

Na Tabela 1 são observadas as medidas descritivas das variáveis, revelando que o peso mínimo dos peixes foi de 0,078 kg e o máximo foi de 1,025 kg. Em relação ao comprimento dos peixes, o valor médio de 36,468 cm, com variação entre 24 e 49 cm. Os intervalos para as médias das variáveis foram construídos com 95% de confiança.

A partir dos gráficos da Fig 3, pode-se verificar que os valores medianos das proporções de lúmen decrescem com os meses. As maiores proporções medianas foram observadas no segundo e quarto mês, enquanto que as menores proporções medianas de lúmen foram observadas no sexto e oitavo mês. No terceiro mês existiu pouca variabilidade entre as proporções de lúmen registradas. As maiores variabilidades nas proporções foram observadas no segundo, quinto e sétimo mês.

Não foi verificada uma relação linear visível da proporção do lúmen com as áreas e raios (espessuras) das túnicas arteriais.

Considerando o peso e o comprimento, foi constatado que a proporção do lúmen apresenta uma relação decrescente com ambas as variáveis citadas, ou seja, a proporção de lúmen observada aumenta a medida que os pesos dos peixes diminui, o mesmo acontecendo em relação ao comprimento dos peixes.

Para a seleção das variáveis significativas para explicar a proporção da área do lúmen, foram utilizados testes de hipóteses do tipo Z (Casella & Berger 2002). Para avaliar a

adequabilidade do modelo, foi utilizado o gráfico de quantis com envelope simulado (bandas de confiança). O modelo final ajustado é dado por:

$$\mu = \frac{\exp\{0.06 \cdot \text{areaint} - 12.25 \cdot \text{raioext} - 24.26 \cdot \text{raioed} - 52.16 \cdot \text{raioint} + 3.14 \cdot \text{diamvaso} - 0.86 \cdot \text{peso}\}}{1 + \exp\{0.06 \cdot \text{areaint} - 12.25 \cdot \text{raioext} - 24.26 \cdot \text{raioed} - 52.16 \cdot \text{raioint} + 3.14 \cdot \text{diamvaso} - 0.86 \cdot \text{peso}\}}$$

Em que,  $\mu$  é a proporção média da área do lúmen em relação a área da túnica média.

Considerando testes do tipo Z, todos os parâmetros são significativos ao nível de significância de 5%. Pelos gráficos de quantis na Fig 4, a grande maioria dos pontos se encontram aleatoriamente dentro das bandas de confiança, indicando que a distribuição *Beta* para a proporção do lúmen está corretamente especificada.

## DISCUSSÃO

As lesões oclusivas aqui descritas em artérias coronárias, já foram evidenciadas em humanos, por serem artérias com capacidade de desenvolver manifestação clínica de doença aterosclerótica, tendo sido observado um maior grau de estenose quando comparadas a outras artérias (Vink *et al.* 2002).

O analisador de imagem faz com que seja possível a caracterização mais precisa das áreas histológicas estudadas, sendo a análise morfométrica, por qualquer método utilizado, uma fonte de uma maior objetividade na análise histológica (Romano *et al.* 1996).

Lesões arteriais similares às aqui expostas foram descritas em algumas espécies de peixes anádromos. Farrell (2002) afirmou que todos os salmonídeos quando atingem o tamanho de cerca de 10 cm, iniciam o desenvolvimento de alterações coronárias que podem ser identificadas microscopicamente como arteriosclerose. O autor relacionou a progressão da lesão ao hábito migratório na maturação sexual, envolvendo também a rápida taxa de

crescimento por induzir estresse, contribuindo para o início de uma lesão coronária. Diferentemente, os animais analisados nesta pesquisa apresentaram um ganho de peso associado a maior taxa de oclusão luminal, sendo utilizados inclusive animais imaturos na pesquisa, sem envolvimento de períodos de maturação no surgimento da lesão.

Os lipídios apresentam um papel essencial na vida reprodutora de salmonídeos, fornecendo energia para atividade reprodutora e sendo consumido durante a migração sexual (McVeigh *et al.* 2007). Os animais aqui analisados e identificados com lesão arterial eram jovens, com idade inferior ao período de maturação sexual da espécie. As lesões coronarianas relatadas em salmão (Robertson *et al.* 1961; Robertson & Wexler 1962; Eaton *et al.* 1984) e em trutas (Schmidt & House 1979; Prior *et al.* 1968), estavam relacionadas à períodos de maturação sexual e desova, levando a acreditar que a mobilização de gordura necessária para essa fase poderia surgir como um possível desencadeador no surgimento das lesões.

O elevado teor de adiposidade corporal em humanos é claramente associada a alterações no metabolismo lipídico e disfunção endotelial (Poirier *et al.* 2006), aumentando a prevalência de doenças cardiovasculares (Romero-Corral *et al.* 2010).

Níveis elevados de marcadores inflamatórios de lesão aterosclerótica como interleucinas e proteína C reativa já foram identificados em humanos com alto teor de gordura corporal, mesmo apresentando um índice de massa corporal (ICM) normal (Lorenzo *et al.* 2006).

A hiperlipidemia também é enfocada em estudos com camundongos jovens em relação ao surgimento de lesão aterosclerótica (Lieu *et al.* 2003) e, recentemente foi relatado que a reversão da hiperlipidemia após a implantação de lesão aterosclerótica, mesmo em estágios avançados, gera uma redução nos níveis de células CD68, que são derivadas de macrófagos e células espumosas presentes em placas ateroscleróticas, havendo também alterações fenotípicas com comportamento migratório *in vivo* e diminuição da expressão de genes que

codificam fatores inflamatórios e pré-trombóticos (Fieg *et al.* 2011).

Os resultados aqui encontrados sugerem que o aumento no crescimento em peso e comprimento contribui para a redução da área do lúmen, predispondo a obstrução arterial. Pesquisas anteriores ressaltam a importância de estudos acerca do real envolvimento de fatores dietéticos, especialmente ácidos graxos poli-insaturados na proliferação de células musculares lisas em artérias coronárias com conseqüente desenvolvimento de lesões arterioscleróticas no salmão (Farrel 2002), o que reforça a importância desse fator no cultivo da espécie aqui descrita, com lesões similares e provavelmente causadas pelo fator dietético.

Os animais aqui analisados foram alimentados com ração comercial com conteúdo lipídico de 7,93%, com ácidos graxos poli-insaturados, principalmente o docosahexaenóico (DHA) e o eicosapentanoico (EPA), em valores acima da exigência da espécie (Oliveira 2012). Os ácidos graxos poli-insaturados, apesar de apresentarem efeitos benéficos na função vascular (Casanova & Medeiros 2011), deve ter uso controlado na sua dieta, pela possibilidade de ganho excessivo de peso devido ao alto teor energético na dieta (Costa & Meale 2002), uma vez que é conhecido que o beijupirá tem reduzida capacidade em utilizar lipídios como fonte de energia, preferindo a proteína como principal fonte energética (Fraser & Davies 2009).

Existem relatos de que a peroxidação lipídica se inicia nos ácidos graxos poli-insaturados de fosfolipídios de superfície da LDL (lipoproteína de baixa densidade) e, a seguir, se propague aos lipídios do núcleo, contribuindo na modificação oxidativa de ácidos graxos poli-insaturados, colesterol e fosfolipídios, finalizando com a modificação e degradação da apoB, que colabora na progressão da aterosclerose (Witztum 1993; Batlouni 1997).

A obesidade em ratos é associada a elevadas concentrações plasmáticas de proteínas de fase aguda como a proteína amiloide A (serum amyloid associated protein-SAA) e proteína

C reativa (Tannock *et al.* 2005; Yang *et al.* 2006), que são consideradas preditivas na ocorrência de doenças vasculares (King *et al.* 2009).

Modelos experimentais utilizando ratos com deficiência de apolipoproteína E (ApoE), demonstram um aumento de peso corporal, estimulando o processo aterosclerótico quando alimentados com dieta com alto percentual de gordura, apresentando elevação na concentração plasmática de SAA (King *et al.* 2009). Pesquisas ainda relatam que altas concentrações de SSA representam um importante marcador tecidual de doenças inflamatórias agudas e crônicas (Malle *et al.* 2009), demonstrando associação também da proteína C reativa com o risco de alterações cardiovasculares (Ridker *et al.* 2000), contribuindo para inflamação e aumentando o dano tecidual (Pepys & Baltz 1983).

Condição hiperlipidêmica foi descrita em coelhos após dieta rica em colesterol, afetando a formação de trombos na túnica íntima, induzindo a lesão e tornando a neoíntima rica em macrófagos e placas de fibrina nos trombos (Yamashita *et al.* 2009).

Como citado, alguns animais são utilizados como modelo experimental, no objetivo de avaliar hiperplasia vascular. Os suínos muitas vezes são eleitos como modelo para acompanhamento da lesão, pela semelhança com humanos na resposta a lesões vasculares, sendo realizados estudos morfométricos para ter uma avaliação controlada de lesão arterial crônica (Pasa *et al.* 2008). Do mesmo modo, roedores são vistos como modelos desejáveis, pelo fato de serem animais com curto tempo de vida, com disponibilidade de manipulação genética, apresentando um custo relativamente baixo de manutenção laboratorial e, principalmente por similaridade com os humanos no desenvolvimento espontâneo da aterosclerose durante sua vida (King *et al.* 2009).

A discussão no que se refere ao teor adiposo corporal fica limitada nesse estudo, por não ter sido realizada análise da composição corporal das espécies coletadas, bem como na ração. Isso dificultou estabelecer a possível relação exata entre os fatores dietéticos e as lesões

descritas. As observações aqui relatadas nos conduz a necessidade de pesquisas detalhadas acerca do que foi discutido com relação a outras espécies, onde as lesões coronárias são bem definidas.

## **CONCLUSÃO**

O aumento no ganho de peso contribui para a redução da área do lúmen levando a obstrução arterial na espécie *Rachycentron canadum* e não ocorreu relação crescente ou decrescente entre a proporção do lúmen vascular e a espessura das túnicas arteriais.

## REFERÊNCIAS

- Batlouni M. (1997) Hipótese oxidativa da aterosclerose e emprego de antioxidantes na doença arterial coronária. *Arq. Bras. Cardiol.* **68**, 1.
- Barcellos L.J.G, Kreutz L.C., Rodrigues L.B., Santos L.R. dos, Motta A.C., Ritter F., Bedin A.C., Silva L.B. da. (2008) *Aeromonas hydrophila* em *Rhamdia quelen*: aspectos macro e microscópico das lesões e perfil de resistência a antimicrobianos. *B. Inst. Pesca* **34**, n.3, 355-363.
- Bobryshev Y.V. (2006) Monocyte recruitment and foam cell formation in atherosclerosis. *Micron* **37**, 208–222.
- Brown R. (1965) The pattern of the microcirculatory bed in the ventricular myocardium of domestic mammals. *Am. J. Anat.*, **116**, 355-374.
- Casanova M.A., Medeiros F. (2011) Recentes evidências sobre os ácidos graxos poli-insaturados da família ômega-3 na doença cardiovascular. *Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto* **10**, 3.
- Costa R.P., Meale M.M.S. (2002) Terapia nutricional oral em cardiologia. In: WAITZBERG, D. L. *Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica*, 3.ed., 1, p. 525-542. Atheneu, São Paulo.
- Dobin P.B., Littooy F.N., Golan J., Blackeman B., Fareed J. (1988) Mechanical and histological changes in canine vein grafts. *Journal of Surgical Research* **44**, 259-265.
- Carson F.L., Martin J.H.; Lynn J.A. (1973) Formalin fixation for electron microscopy: a reevaluation. *American Journal of Clinical Pathology* **59**, 365-373.
- Casella, G.; Berger, R. L. **Statistical inference**, Duxbury Press. 2002.
- Chou R-L., Su M-S.; Chen H-Y. (2001) Optimal dietary protein and lipid levels for juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). *Aquaculture* **193**, 81-89.
- Eaton R.P., McConnell T., Hnath J., Black W., Swartz R.E. (1984) Coronary myointimal hyperplasia in freshwater lake Michigan Salmon (Genus *Oncorhynchus*). Evidence for Lipoprotein-Related Atherosclerosis. *Am J Pathol.* **116**(2), 311-8.
- Farrel A.P. (2002) Coronary arteriosclerosis in salmon: growing old or growing fast?. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* **132**(4), 723-35.
- Feig J.E., Parathath S., Rong J.X., Mick S.L., Vengrenyuk Y., Grauer L., Young S.G., Fisher E.A. (2011) Reversal of Hyperlipidemia With a Genetic Switch Favorably Affects the Content and Inflammatory State of Macrophages in Atherosclerotic Plaques. *Circulation* **123**(9), 989-98
- Ferrari S.L.P., Cribari-Neto F. (2004) Beta regression for modeling rates and proportions. *Journal of Applied Statistics* **31**, 799-815.

- Fraser T.W.K., Davies S.J. (2009) Nutritional requirements of cobia, *Rachycentron canadum* (Linnaeus): a review. *Aquaculture Research* **40**, 1219-1234.
- Hopps E., Noto D., Caimi G., Aversa M.R. (2010) A novel component of the metabolic syndrome: The oxidative stress. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* **20**(1), 72-77.
- Kaneko N., Matsuda R., Toda M., Shimamoto K. Three-dimensional reconstruction of the human capillary network and the intramyocardial micronecrosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **300**, 2011.
- King V.L., Hatch N.W., Chan Huei-Wei, Beer M.C. de, Beer F.C. de, Tannock L.R. (2009) A Murine Model of Obesity With Accelerated Atherosclerosis. *Obesity* **18**, 35-41.
- Lieu H.D., Withycombe S.K., Walker Q., Rong J.X., Walzem R.L., Wong J.S., Hamilton R.L., Fisher E.A., Young S.G. (2003) Eliminating atherogenesis in mice by switching off hepatic lipoprotein secretion. *Circulation* **107**, 1315-1321.
- Lorenzo A., Del Gobbo V., Premrov M.G., Bigioni M., Galvano F., Di Renzo L. (2007) Normal-weight obese syndrome: early inflammation? *Am J Clin Nutr* **85**, 40-45.
- Malle E., Sodin-Semrl S., Kovacevic A. (2009) Serum Amyloid A: An Acute-Phase Protein Involved in Tumor Pathogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences* **66**(1), 9-26.
- McVeigh B.R., Healey M.C., Wolfe F. (2007) Energy expenditures during spawning by chum salmon *Oncorhynchus keta* (Walbaum) in British Columbia. *Journal of Fish Biology* **71**(6), 1696-1713.
- Nakashima Y., Chen Y.X., Kinukawa N., Sueishi K. (2002) Distributions of diffuse intimal thickening in human arteries: preferential expression in atherosclerosis-prone arteries from an early age. *Virchows Arch.* **3**, 279-288.
- Neiffer D.L., Stamper M.A. (2009) Fish sedation, analgesia, anesthesia, and euthanasia: considerations, methods, and types of drugs. *Ilar J.* **50**(4), 343-60.
- Nussbaum A. (1912) Über das Gefass-system des Herzens. *Arch. Mikrobiol. Anat.* **80**, 450-477.
- Oliveira R.L.M. de. *Morfometria, rendimento de carcaça e composição do filé do beijupirá (Rachycentron canadum) cultivado em tanques-rede em mar aberto no litoral de Pernambuco*. 2012. 65p. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura, UFRPE, Recife.
- Pasa M.B., Pereira A.H., Castro Jr C. (2008) Morphometric analysis of intimal thickening secondary to stent placement in pig carotid arteries. *Acta Cirúrgica Brasileira* **23** (2), 165-172.
- Pepys M.B., Baltz M.L. (1983) Acute phase proteins with special reference to C-reactive protein and related proteins (pentaxins) and serum amyloid A protein. *Adv Immunol.* **34**, 141-212.

Poirier P., Giles T.D., Bray, G.A., Hong Y., Stern J.S., Pi-Sunyer F.X., Eckel R.H. (2006) Obesity and cardiovascular disease: pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss: an update of the 1997 American Heart Association Scientific Statement on Obesity and Heart Disease from the Obesity Committee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism. *Circulation* **113**, 898-918.

Prior I.A.M., Webber W.L., Alexander W.S., Barclay S de C. (1968) Calcific Heart Disease in New Zealand Brown Trout. *Nature* **220**, 261-262.

Reimschuessel R., May E.B., Bennett R.O., Lipsky M.M. (1988) Tropical fish medicine. Necropsy examination of fish. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* **18**(2), 427-33.

Ridker P.M., Hennekens C.H., Buring J.E., Rifai N. (2000) C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med.* **342**, 836-843.

Robertson O.H., Wexler B.C., Miller B.F. (1961) Degenerative changes in the cardiovascular system of the spawning pacific salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Circulation Research* **9**, 826-272.

Robertson O.H., Wexler B.C. (1962) Histological Changes in the Organs and Tissues of Senile Castrated Kokanee Salmon (*Oncorhynchus nerka kennerlyi*). *General and Comparative Endocrinology* **2**(5), 458-472.

Romano L.A., Ferder M.D., Stella I.Y., Inserra F., Ferrer L.F. (1996) High correlation in renal tissue between computed image analysis and classical morphometric analysis. *The Journal of Histotechnology* **19**, n.2, 121-123.

Romero-Corral A., Somers V.K., Sierra-Johnson J., Korenfeld Y., Boarin S., Korinek J., Jensen M.D., Parati G., Lopez-Jimenez F. (2010) Normal weight obesity: a risk factor for cardiometabolic dysregulation and cardiovascular mortality. *European Heart Journal* **31**, 737-746.

Schmidt S.P., House E.W. (1979) Time study of coronary myointimal hyperplasia in precocious male steelhead trout, *Salmo gairdneri*. *Atherosclerosis* **34**, 375-381.

Spalteholz W. (1907) Die Koronararterien des Herzens. *Verh. Anat. Ges.* **21**, 141-153.

Subbotin V.M. (2007) Analysis of arterial intimal hyperplasia: review and hypothesis. *Theoretical Biology and Medical Modelling* **4**, 41.

Tannock L.R., O'Brien K.D., Knopp R.H., Retzlaff B., Fish B., Wener M.H., Kahn S.E., Chait A. (2005) Cholesterol feeding increases C-reactive protein and serum amyloid A levels in lean insulin-sensitive subjects. *Circulation* **111**, 3058-3062.

Vink A., Schoneveld A.H., Poppen M., Kleijn D.P.V. de, Borst C., Pasterkamp G. (2002) Morphometric and immunohistochemical characterization of the intimal layer throughout the arterial system of elderly humans. *J. Anat.* **200**, 97-103.

Witztum J.L. (1993) Role of oxidised low density lipoprotein in atherogenesis. *Br Heart J.* **69**, 12-18.

Yamashita A., Matsuda S., Matsumoto T., Moriguchi-Goto S., Takahashi M., Sugita C., Sumi T., Imamura T., Shima M., Kitamura K., Asada Y. (2009) Thrombin generation by intimal tissue factor contributes to thrombus formation on macrophage-rich neointima but not normal intima of hyperlipidemic rabbits. *Atherosclerosis* **206**(2), 418-426.

Yang R.Z., Lee M.J., Hu H., Pollin T.I., Ryan A.S., Nicklas B.J., Snitker S., Horenstein R.B., Hull K., Goldberg N.H., Goldberg A.P., Shuldiner A.R., Fried S.K., Gong D.W. (2006) Acute-phase serum amyloid A: an inflammatory adipokine and potential link between obesity and its metabolic complications. *PLoS Med.* **3**, 287.

Zamir M., Chee H. (1986) Branching characteristics of human coronary arteries. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **64**, 661-668.

Zeileis A., Cribari-Neto F. (2010) Beta regression in R. *Journal of Statistical Software* **34**(2).

## 7 ANEXOS

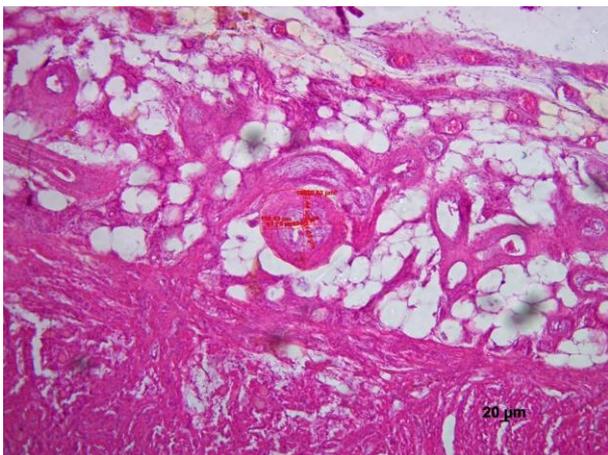


Figura 1: Análise morfométrica em artérias coronárias. H&E-staining, Bar = 20 51x37mm (600 x 600 DPI).

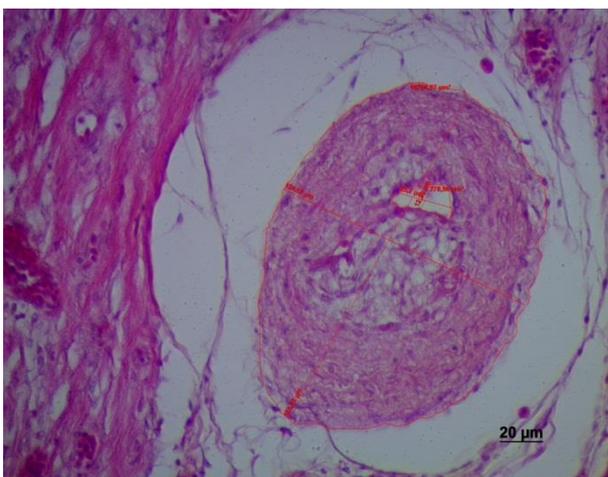


Figura 2: Análise morfométrica em artérias coronárias com obstrução luminal. H&E-staining, Bar = 20 51x37mm (600 x 600 DPI).

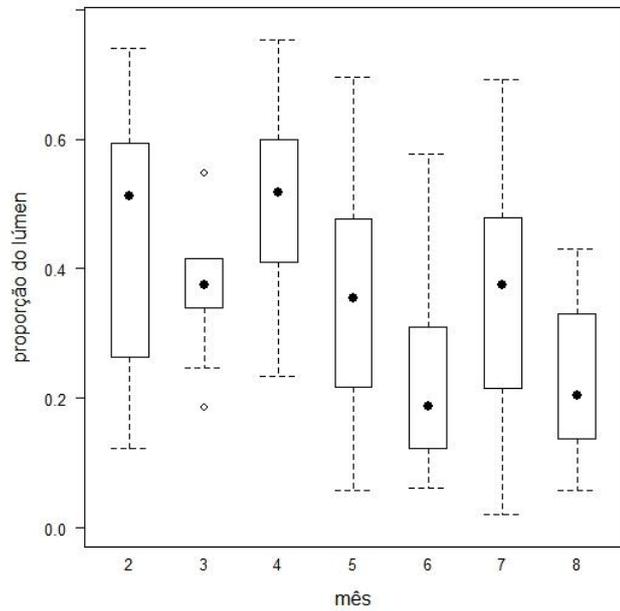


Figura 3: Proporção do lúmen de artérias coronárias em relação aos meses de cultivo

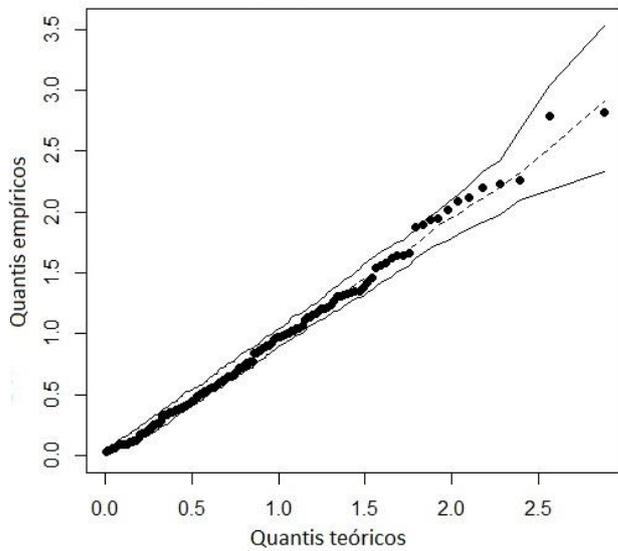


Figura 4: Quantis com envelope simulado para os resíduos do modelo *Beta* ajustado para as proporções do lúmen.

Tabela 1 - Correlações entre as variáveis do estudo: *proplum*: proporção entre a área do lumen e a área da túnica média; *areaext*: área da túnica externa; *areamed*: área da túnica média; *areaint*: área da túnica íntima; *arealum*: área do lúmen; *raioext*: raio da túnica externa; *raioint*: raio da túnica íntima; *raiolum*: raio do lúmen; *diamvaso*: diâmetro do vaso; *areamed*: área da túnica média; *diamlum*: diâmetro do lúmen; *peso*: peso do peixe; *comp*: comprimento do peixe

	proplum	areaext	areamed	areaint	arealum	raioext	raioint	raiolum	diamvaso	diamlum	peso	comprimento
proplum	1	0,198	0,313	0,430	0,458	-0,089	0,023	0,601	0,206	0,601	-0,276	-0,185
areaext	0,198	1	0,932	0,842	0,816	0,785	0,576	0,805	0,953	0,805	0,110	0,057
areamed	0,313	0,932	1	0,956	0,931	0,59	0,700	0,899	0,901	0,899	0,027	-0,005
areaint	0,430	0,842	0,956	1	0,994	0,445	0,688	0,907	0,800	0,907	-0,008	-0,018
arealum	0,458	0,816	0,931	0,994	1	0,421	0,636	0,899	0,767	0,899	-0,007	-0,011
raioext	-0,089	0,785	0,590	0,445	0,421	1	0,676	0,470	0,814	0,470	0,193	0,106
radiomed	-0,243	0,628	0,577	0,379	0,327	0,676	1	0,437	0,685	0,380	0,140	0,042
raioint	0,023	0,576	0,700	0,688	0,636	0,228	0,437	1	0,514	0,492	0,033	0,035
raiolum	0,601	0,805	0,899	0,907	0,899	0,47	0,380	0,492	0,826	1	-0,087	-0,098
diamvaso	0,206	0,953	0,901	0,800	0,767	0,814	0,685	0,826	1	0,826	0,114	0,060
diamlum	0,601	0,805	0,899	0,907	0,899	0,470	0,380	1	0,826	1	-0,087	-0,098
peso	-0,276	0,110	0,027	-0,008	-0,007	0,193	0,033	-0,087	0,114	-0,087	1	0,858
comprimento	-0,185	0,057	-0,005	-0,018	-0,011	0,106	0,035	-0,098	0,060	-0,098	0,858	1

# Journal of Fish Diseases

---

© 2014 John Wiley & Sons Ltd



Edited By: R.J. Roberts

Impact Factor: 1.591

ISI Journal Citation Reports © Ranking: 2012: 19/50 (Fisheries); 30/143 (Veterinary Sciences); 46/100 (Marine & Freshwater Biology)

Online ISSN: 1365-2761

## Author Guidelines

*Journal of Fish Diseases* accepts manuscripts electronically via an online submission site, ScholarOne Manuscripts (formerly known as Manuscript Central). Authors should submit manuscripts online at <http://mc.manuscriptcentral.com/jfd>. Complete instructions for submitting manuscripts online are provided at the submission site. The review process is entirely electronically-based.

### CONTACTS AND QUICK LINKS

[Contact the Editorial Office](#)

[Contact the Production Editor](#)

[Submit your manuscript now to the Journal of Fish Diseases](#)

[Click here](#) to download the Colour Work Agreement Form

[Guidelines for Electronic Graphics](#)

### EDITORIAL POLICY

To ensure responsible publication practices, this Journal adheres to Wiley Blackwell's [publication ethics policies](#), which include guidelines on handling suspected publication misconduct and complaints about the Journal. This Journal is a member of, and subscribes to the principles of, the [Committee on Publication Ethics](#).

### Authorship

Qualification for authorship should comprise:

- substantial contribution to conception and design or the acquisition and analysis of data;
- drafting or critically revising the manuscript; and
- approval of the final submitted version.

All authors must satisfy all three criteria. By submission of a manuscript to the Journal, all authors warrant that they have the authority to publish the material and that the paper, or one substantially the same, has neither been published previously, nor is being considered for publication elsewhere. Submissions may be subject to testing for textual similarity to other published works via the CrossCheck™ software employed by the Journal.

### **Funding**

Authors must disclose all sources of funding for their research and its publication. This information should be included in the cover letter. Any involvement of the funder in study design, data collection, data analysis, manuscript preparation and publication decision should be clearly stated in the cover letter.

### **Conflict of interest disclosure**

*Journal of Fish Diseases* requires that all authors disclose any potential sources of conflict of interest. Any interest or relationship, financial or otherwise, that might be perceived as influencing an author's objectivity is considered a potential source of conflict of interest. These must be disclosed when directly relevant or indirectly related to the work that the authors describe in their manuscript. Potential sources of conflict of interest include but are not limited to patent or stock ownership, membership of a company board of directors, membership of an advisory board or committee for a company, and consultancy for or receipt of speaker's fees from a company. The existence of a conflict of interest does not preclude publication in this journal. If the authors have no conflict of interest to declare, they must also state this at submission. It is the responsibility of the corresponding author to review this policy with all authors and to collectively list in the cover letter to the Editors, in the manuscript (in the Acknowledgments section), and in the online submission system ALL pertinent commercial and other relationships.

## **MANUSCRIPT SUBMISSION & PRESENTATION**

### **Article Types**

#### **Original Manuscripts**

Manuscripts should be structured in the following format: Title Page; Abstract; Introduction; Materials and Methods; Results; Discussion; References; Tables and Figures.

All Original Manuscripts will be fully peer reviewed prior to publication.

### **Reviews**

The *Journal of Fish Diseases* welcomes Review papers. Such Reviews can cover any subject within the journal's remit. Review papers will be fully peer reviewed prior to publication. Prospective authors are encouraged to review their ideas and raise any questions with a member of the Editorial Team should they wish.

Reviews should define the present level of understanding of their subject and suggest new insights or possible avenues for future investigation. The text should be produced on the same editorial basis as Original Manuscripts in the *Journal of Fish Diseases*.

Colour illustrations in Review Articles will be reproduced free of charge, both online and in print.

### **Short Communications**

These should differ from full papers on the basis of scope or completeness, rather than quality of research. They may report significant new data and new findings arising from problems with narrow, well-defined limits, or important findings that warrant rapid publication before broader studies are complete. Their text should neither

exceed 1500 words (approximately 6 pages of typescript) nor be divided up into conventional sections. When submitting Short Communications, authors should make it clear that their work is to be treated as such.

Short Communications will be editorially reviewed within the Editorial Team and/or Editorial Board in order to facilitate rapid publication.

### **Clinical Reports**

We also welcome the submission of Clinical Reports on new conditions improvements in clinical diagnosis and new treatments. Clinical Reports will be editorially reviewed within the Editorial Team and/or Editorial Board in order to facilitate rapid publication.

### **Comments**

The Editor will consider Comments on a particular topic arising from the publication of a paper in the Journal. Authors of the paper will have the right the reply to the Comment. The Comment and the reply will be published in the Journal. Comments, and any replies, will be editorially reviewed within the Editorial Team and/or Editorial Board in order to facilitate rapid publication.

### **Manuscript Format**

The manuscript should be uploaded as a Word (.doc) or Rich Text Format (.rtf) file and should be typed with double spacing on one side of the paper on A4, or similar, paper (297 x 210 mm), with generous margins. Pages should be numbered consecutively in Arabic numerals, including those of acknowledgements, references, tables and figure legends.

### **Title Page**

A title page should contain the full title, author's name(s) and place of work, address for correspondence (including email) and short running title.

### **Abstract**

The text must be preceded by a short abstract not exceeding 200 words, followed by no more than six keywords.

### **Figures and Tables**

Tables, figure legends (including magnifications) and acknowledgements should be submitted on separate sheets, and appear at the end of the manuscript, after the references. Tables and figures should be referred to in the text together with an indication of their appropriate position recorded in the text margin.

### **Latin Names, Authority, and Disposition**

The full Latin specific name, including the authority with correct taxonomic disposition, should appear at least once for each species when first mentioned in the text or elsewhere, thus: Atlantic salmon, *Salmo salar* L., turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), snakehead, *Channa punctatus* (Bloch), rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), i.e. authorities bracketed depending on first description (for further information see American Fisheries Society Special Publication No 12, *A List of Common and Scientific Names of Fishes from the United States and Canada* or [www.fishbase.com](http://www.fishbase.com)).

### **References and Citations**

The reference list should be in alphabetical order and include the full title thus:

Chapman D.W. (1971) Production. In: *Methods for the Assessment of Fish Production in Freshwater* (ed. by W. E. Ricker), pp. 199-214. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

Wickens J.F. (1972) The food value of brine shrimp, *Artemia salina* L., to larvae of the prawn, *Palaemon serratus* Pennant. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **10**, 151-170.

References in the text should use the Harvard System and be in full on first mention, e.g. (Brown, Smith & Williams 1975), subsequently abbreviated to (Brown *et al.* 1975). Authors are responsible for the accuracy of their references. References should only be cited as 'in press' if they have been accepted for publication. Manuscripts in preparation, unpublished reports and reports not readily available should not be cited. Personal communications should be cited as such in the text.

We recommend the use of a tool such as EndNote or Reference Manager for reference management and formatting.

EndNote reference styles can be searched for here:

<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>

Reference Manager reference styles can be searched for here:

<http://www.refman.com/support/rmstyles.asp>

### **Units and spelling**

Spelling should conform to *The Concise Oxford Dictionary of Current English*. Units of measurement, symbols and abbreviations must be given in metric units but British or other equivalents may be included in parentheses. Where any doubt arises as to the correct abbreviations, reference should be made to *Quantities, Units and Symbols*, 2nd edition, 1975, published by the Royal Society, London (ISBN: 0 85403 071 9). Full stops are not used with abbreviations. The following are suggested as internationally accepted units: %, °C, mm, cm, cc, mL, L, m, km, mg, g, kg, s, min, h, ha.

For sample issue please click [here](#).

Systeme International (SI) units should be used. The salinity of sea water should be given as gL<sup>-1</sup>. Use the form gmL<sup>-1</sup> not g/ml. Avoid use of g per 100 g, for example in food composition, use g kg<sup>-1</sup>. If other units are used, these should be defined on first appearance in terms of SI units, e.g. mmHg. Abbreviations of chemical and other names should be defined when first mentioned in the text unless they are commonly used and internationally known and accepted.

Scientific Names and Statistics: Complete scientific names, including the authority with correct taxonomic disposition, should be given when organisms are first mentioned in the text. Complete scientific names, but without the authority, should also be given when organisms are first mentioned in tables, figures and keywords.

### **Illustrations**

Guidelines to submitting illustrations will be found at the submission site. We would like to receive your artwork in electronic form. Please save vector graphics (e.g. line artwork) in Encapsulated Postscript Format (EPS), and bitmap files (e.g. half-tones) in Tagged Image File Format (TIFF). Ideally, vector graphics that have been saved in metafile (.WMF) or pict (.PCT) format should be embedded within the body of the text file. Detailed information on our digital illustration standards is available [here](#). Avoid using tints if possible; if they are essential to the understanding of the figure, try to make them coarse. Tables are part of the text and should be included, one per page, after the References.

All graphs, drawings, and photographs are considered figures and should be sequentially numbered with Arabic numerals. All figures should clarify the text and their number should be kept to a minimum. Details must be large enough to retain their clarity after reduction. Submit high resolution files of each illustration. Line drawings should be professionally drafted and photographed; halftones should exhibit high contrast. Incorporate linear size scale when relevant.

**Supporting Information** (if applicable)

Authors wishing to submit supporting information (such as multimedia adjuncts, large data sets, extra colour illustrations, bibliographies or any other material for which there is insufficient space in the print edition of the Journal) must do so at the time of first submission. This supporting information is an integral part of the article and will be reviewed accordingly. The availability of supporting information should be indicated in the main manuscript by a section headed 'Supporting Information', under which should be appropriate legends for the material.

**Language**

The language of publication is English. Authors for whom English is a second language must have their manuscript professionally edited by an English speaking person before submission to make sure the English is of high quality. It is preferred that manuscripts are professionally edited. A list of independent suppliers of editing services can be found at [http://authorservices.wiley.com/bauthor/english\\_language.asp](http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp). Japanese authors can also find a list of local English improvement services at <http://www.wiley.co.jp/journals/editcontribute.html>. All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication. Manuscripts in which poor English makes it difficult or impossible to review will be returned to authors without review.

**Electronic Submission**

Authors must submit their manuscripts electronically to <http://mc.manuscriptcentral.com/jfd> via their Author Centre. Complete instructions for preparing and submitting manuscripts online are provided at the submission site. Authors are notified promptly by e-mail that their manuscripts have been received. If this acknowledgement is not received within a week or so then authors should enquire at the Editorial Office: [JFDeditorialoffice@wiley.com](mailto:JFDeditorialoffice@wiley.com). The main author is responsible for entering details of any co-authors into the system when prompted. Authors should retain one copy of text, tables and illustrations as the Editors cannot accept responsibility for damage or loss of manuscripts. Overseas authors may wish to consult an appropriate member of the Editorial Board prior to submission of material.

**Cover letter**

The cover letter should disclose any potential sources of conflict of interest that Editors may consider relevant to their manuscript.

**Suggesting reviewers**

Authors are invited to suggest at least two reviewers. It is not appropriate for reviewers to be members or former members of the authors' organization(s), or to have been associated with them.

**AFTER ACCEPTANCE**

**Copyright and Licencing**

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

### **For authors signing the copyright transfer agreement**

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below:

CTA Terms and Conditions [http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs\\_copyright.asp](http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp).

### **For authors choosing OnlineOpen**

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

Creative Commons Attribution License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services [http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs\\_copyright.asp](http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp) and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

#### **OnlineOpen**

OnlineOpen is available to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. With OnlineOpen, the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in the funding agency's preferred archive. For the full list of terms and conditions, see [here](#).

Any authors wishing to send their paper OnlineOpen will be required to complete the payment form available from our website [here](#).

Prior to acceptance there is no requirement to inform an Editorial Office that you intend to publish your paper

OnlineOpen if you do not wish to. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article. They go through the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

### **Colour Work Agreement**

The author must pay for colour illustrations at a rate quoted by the publisher. In the event that the author is not able to cover the costs of reproducing colour figures in colour in the printed version of the journal, *Journal of Fish Diseases* offers authors the opportunity to reproduce colour figures in colour for free in the online version of the article (but they still appear in black and white in the print version). If an author wishes to take advantage of this free colour-on-web service, they should liaise with the [Editorial Office](#) to ensure that the appropriate documentation is completed for the Publisher. To download a Colour Work Agreement Form, click [here](#).

The form must only be returned by mail or courier, to the following address;

Production Editor  
Global Research  
Wiley  
1 Fusionopolis Walk #07-01 Solaris South Tower

Singapore 138628

Note: Any colour illustrations used in Review Articles will be free of charge.

Any article (other than Reviews) received by Wiley Blackwell with coloured images will not be published until the form has been returned.

### **Proofs**

The corresponding author will receive an email alert containing a link to a web site. A working e-mail address must therefore be provided for the corresponding author. The proof can be downloaded as a PDF (portable document format) file from this site. Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software can be downloaded (free of charge) from the following web site: <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>.

This will enable the file to be opened, read on screen and printed out in order for any corrections to be added. Further instructions will be sent with the proof. Hard copy proofs will be posted if no e-mail address is available. Excessive changes made by the author in the proofs, excluding typesetting errors, will be charged separately.

### **Early View**

*Journal of Fish Diseases* is covered by Wiley Blackwell's Early View service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Articles are therefore available as soon as they are ready, rather than having to wait for the next scheduled print issue. Early View articles are complete and final. They have been reviewed in accordance with the author guidelines, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of Early View articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so Early View articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article.

### **Offprints**

Authors will be provided with electronic offprints of their paper. Additional paper offprints may be ordered online. Please click on the following [link](#), fill in the necessary details and ensure that you type information in all of the required fields. If you have queries about offprints, please email: [offprint@cosprinters.com](mailto:offprint@cosprinters.com)

The cost is more if the order form arrives too late for the main print run. Offprints are normally dispatched within 3 weeks of publication of the issue in which the paper appears. Please contact the publishers if offprints do not arrive: however, please note that offprints are sent by surface mail, so overseas orders may take up to 6 weeks to arrive. Electronic offprints are sent to the first author at his or her first email address on the title page of the paper, unless advised otherwise; therefore please ensure that the name, address and email of the receiving author are clearly indicated on the manuscript title page if he or she is not the first author of the paper.

#### **Author Services**

Author Services enables authors to track their article – once it has been accepted – through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The author will receive an e-mail with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript. Visit [here](#) for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.

#### **Author material archive policy**

Please note that unless specifically requested, Wiley Blackwell will dispose of all hardcopy or electronic material 2 months after publication. If you require the return of any material submitted, please inform the Editorial Office or Production Editor as soon as possible if you have not already done so.

#### **Acknowledgment to our Referees**

No academic journal can operate without the generous support of its referees. We wish to thank all of you who have helped us with the peer review process over the years. Without this support, all scientific standards are placed in jeopardy. We also hope that our enhanced journal will encourage you to continue to offer your quality papers to us for review. With your help, we will be striving to ensure that as it moves into its second quarter century, the *Journal of Fish Diseases* will continue to be the automatic choice for quality papers in fish and shellfish pathology.