

Nota Técnica

Respuestas hematológicas de alevines de cachama (*Colossoma macropomum*) sometidos a cambios graduales de salinidad

Hematological response of cachama fry (*Colossoma macropomum*) undergoing gradual salinity changes

Trinidad C. Urbano^{1*}, William Velásquez², Humberto Gil¹, Yanet Antón³, América Vargas⁴, Raquel Salazar-Lugo³

¹Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), Cumaná, estado Sucre. Correo electrónico: turbano@inia.gob.ve. ²Instituto Oceanográfico de Venezuela (IOV), Postgrado en Ciencias Marinas, Universidad de Oriente. ³Laboratorio de Proteínas e Inmunotoxicidad, Postgrado Biología Aplicada, Universidad de Oriente. ⁴Departamento de Enfermería, Núcleo de Sucre, Universidad de Oriente.

RESUMEN

Se evaluó la respuesta hematológica de alevines del pez *Colossoma macropomum* expuesto a cambios graduales de salinidad, con incrementos de 5 UPS (5, 10 y 15) cada 48 horas. Después de 48 horas en cada tratamiento salino, se tomaron muestras sanguíneas de los peces en la vena caudal, para realizar las determinaciones hematológicas de hemoglobina (Hb), hematocrito (HCTO), concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) y conteo diferencial de leucocitos (LEUC). Se observó una disminución significativa de los valores de Hb y HCTO en los peces a partir de la exposición de 5 UPS. Los valores de eosinófilos (EOSI) y linfocitos (LINF) mostraron un incremento significativo ($P < 0,001$), mientras que los neutrófilos (NEUT) no mostraron cambios significativos con el incremento de la salinidad. La sobrevivencia de los peces se vio afectada en 60% al ser expuestos a 15 UPS. El incremento de la salinidad altera los parámetros hematológicos en *C. macropomum* y afecta el sistema inmune reflejado por un aumento de eosinófilos y linfocitos.

Palabras clave: *Colossoma macropomum*, hematología, estrés salino.

ABSTRACT

Haematological response of *Colossoma macropomum* fry exposed to gradual salinity changes was evaluated, with increments of 5 UPS (5, 10 and 15) every 48 hours. After 48 hours in each saline treatment, blood samples were taken from the fish caudal vein to perform haematological determinations of hemoglobin (Hb), hematocrit (HCTO), mean corpuscular hemoglobin concentration (CHCM) and differential leukocyte count (LEUC). A significant decrease in Hb and HCTO values was observed in fish from the exposure of 5 UPS. The eosinophils (EOSI) and lymphocytes (LINF) values showed a significant increase ($P < 0.001$), while neutrophils (NEUT) showed no significant changes with increased salinity. The fish survival was affected by 60% when exposed to 15 UPS. Salinity increase alters hematological parameters in *C. macropomum* and affects the immune system reflected by increase of eosinophils and lymphocytes.

Key words: *Colossoma macropomum*, hematology, salt stress.

INTRODUCCIÓN

La calidad del agua en los lugares donde se cultivan los peces puede ser diferente de aquella en la que los peces fueron capturados, y la exposición a estos cambios en condiciones ambientales a menudo induce una respuesta de estrés en estos organismos (Kandeepan, 2014).

La cachama (*Colossoma macropomum*), de la familia de los carácidos, es un pez de agua dulce ampliamente distribuido en todos los ríos de la cuenca del Orinoco, siendo de gran importancia en la pesquería fluvial venezolana y la acuicultura (Poleo *et al.*, 2011). Este pez de comportamiento migratorio, es capaz de soportar un amplio rango de pH y bajas concentraciones de oxígeno (Useche, 2000).

Estudios recientes han demostrado que la adición de sal optimiza el crecimiento y desarrollo de algunos peces de agua dulce en cultivo (Larumbe-Moran *et al.*, 2010), sin embargo, promueve en ellos condiciones de estrés ya que debido a cambios en la salinidad del agua genera cambios en la osmorregulación y niveles metabólicos en los peces, que pueden afectar la sobrevivencia y el crecimiento de los mismos (Vargas-Chacoff *et al.*, 2011). En el caso de *C. macropomum*, la información con respecto a los efectos de la salinidad sobre la fisiología de esta especie es muy limitada (Silva *et al.*, 2007); esta información permitiría predecir la probabilidad de distribución de estos organismos en ambientes estuarinos y la posibilidad de adaptación en cultivo a rangos de salinidad distintos a los valores encontrados en su hábitat natural.

Las condiciones de estrés igualmente causan cambios en los parámetros hematológicos, los cuales se alteran considerablemente después de la captura (Martins *et al.*, 2004). En este sentido, algunos estudios previos señalan que las variaciones en hematocritos, leucocitos, recuentos celulares y concentración de hemoglobina entre otros, pueden ser utilizadas como indicadores fisiológicos de disfunción orgánica por estrés (Zbanyszczek y Smith, 1984; Hantonella, 1998; Whali, 2002).

En este contexto, el objetivo planteado fue evaluar la respuesta hematológica de alevines de *Colossoma macropomum* sometidos a cambios graduales de salinidad del agua.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se emplearon alevines de cachama (*C. macropomun*) provenientes del Laboratorio de Acuicultura del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), Cumaná, estado Sucre (10°28'19"N; 64°08'27,83"O), con peso y talla promedio de $16,91 \pm 5,13$ g y $10,05 \pm 1,0$ cm respectivamente. Los alevines se colocaron en acuarios de 70 L de capacidad, llenos hasta un volumen de 50 L con agua dulce (0 UPS) previamente envejecida. Además, se les suministró aireación a través de un soplador marca Boyu, manteniéndolos bajo estas condiciones por un lapso de siete días para su aclimatación. Durante este período se alimentaron *ad libitum*, una vez al día con alimento balanceado comercial Cachamarina (Proagro C.A. Valencia, Venezuela) con 28% de proteína cruda, realizando un recambio de agua del 80% antes de suministrar el alimento. Los peces se mantuvieron en total oscuridad durante la aclimatación, y luego durante el ensayo, cubriendo los acuarios con bolsas plásticas negras, para evitar posibles perturbaciones externas.

Para el ensayo se utilizaron 40 peces distribuidos en 4 acuarios con agua a salinidad inicial de 0 UPS, a razón de 10 peces por acuario, en un diseño completamente al azar y considerando cada pez como una réplica de cada unidad experimental o acuario. El primer día del ensayo se realizó la extracción de sangre a 6 peces del acuario número 1 (salinidad 0 UPS), para realizar las determinaciones hematológicas, mientras que a los acuarios números 2, 3 y 4 se les incrementó la salinidad a 5 UPS, mediante la adición de agua de mar. Los peces se mantuvieron en esta condición por 48 horas; transcurrido el tiempo previsto se realizó la extracción de muestras sanguíneas a 6 peces del acuario 2 (salinidad 5 UPS) y se cambió la salinidad de los acuarios número 3 y 4 a 10 UPS. A las 48 horas se procedió a la extracción de muestras sanguíneas a 6 peces del acuario 3 (salinidad 10 UPS) incrementando la salinidad del acuario número 4 a 15 UPS. Del mismo modo, luego de 48 horas se procedió a la extracción de muestras sanguíneas a 6 peces del acuario número 4 (salinidad 15 UPS) para los análisis hematológicos. El grupo control estuvo constituido por los ejemplares de *C.*

macropomun mantenidos en el acuario número 1 bajo las condiciones de 0 UPS.

Durante el ensayo los peces se alimentaron una vez al día *ad libitum* y se realizaron mediciones diarias de salinidad, pH, oxígeno y temperatura en cada acuario con un medidor de multiparámetros modelo YSI 650 MDS.

Toma de muestras de sangre y análisis hematológicos

Previo a la extracción de sangre, cada organismo fue pesado en una balanza analítica marca Ohaus (+/- 0,001 g) y medida su longitud estándar con un ictiómetro de fabricación propia. Seguidamente se realizó un corte a nivel del pedúnculo caudal, para tomar la muestra sanguínea de la vena caudal, empleando jeringas desechables de 3 mL impregnadas con heparina sódica como anticoagulante. Estas muestras fueron depositadas en tubos de microcentrifuga con el mismo anticoagulante para las determinaciones hematológicas.

La concentración de hemoglobina (Hb) fue obtenida de acuerdo al método de la cianometahemoglobina (Drabkin y Austin, 1932), siendo la concentración de la misma expresada en g.dL⁻¹, mientras que el hematocrito (HCTO) fue determinado por el método de microhematocrito estándar y expresado en porcentaje, según los procedimientos descritos por Blaxhall y Daisley (1973). La concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) es el índice que indica el porcentaje que ocupa la hemoglobina en un eritrocito promedio y fue calculado como el cociente de la Hb y HCTO expresada en g.dL⁻¹ de acuerdo con la metodología establecida por Wintrobe (1934).

Para la determinación de la distribución diferencial de los leucocitos (LEUC) se realizaron frotis sanguíneos por duplicado, los cuales fueron secados al aire y coloreados usando solución de Giemsa (ICSH, 1984). Una vez teñidos los frotis se realizó el recuento diferencial en microscopio óptico marca Nikon, recorriendo la preparación en sentido longitudinal, desde el extremo más grueso hasta el más fino de la lámina, contando las células observadas consecutivamente hasta un total de cien células. Los leucocitos observados fueron clasificados en linfocitos (LINF), monocitos (MONO), neutrófilos (NEU)

y eosinófilos (EOSI; Blaxhall y Daisley, 1973). Los resultados se expresaron en porcentajes de células según cada población leucocitaria (Henry, 2007).

Análisis estadístico.

Para establecer las posibles diferencias significativas en los valores hematológicos obtenidos en los ejemplares de *C. macropomun* sometidos a cambios graduales de salinidad, se aplicó el análisis estadístico ANOVA simple (Sokal y Rohlf, 1980), previa comprobación de normalidad de los datos por medio de una prueba de Kolmogorov – Smirnov, y homogeneidad de varianzas por el test de Levene. Los resultados fueron expresados en medias con sus respectivas desviaciones estándar, se aplicó una prueba a posteriori de rangos múltiples en aquellos casos en los que se detectaron diferencias significativas ($P \leq 0,05$). Para los análisis se empleó el programa Statgrafics Plus 5.1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los peces expuestos a salinidad 0 UPS, 5 UPS y 10 UPS no presentaron signos anormales de comportamiento; sin embargo, al ser expuestos a 15 UPS se registró una marcada disminución en la velocidad de respuesta al estímulo a las 24 horas de exposición, presentando nado errático, disminución en la alimentación, ojos opacos y decoloración en el cuerpo. A las 48 horas se registró una mortalidad del 50% en 15 UPS por lo cual se suspendieron los incrementos de salinidad. Estas observaciones concuerdan con lo reportado por Siqueira-Fiuza *et al.* (2013) en *C. macropomum*, destacando que esta especie tiene un límite de tolerancia a la salinidad de 15 UPS, después de la cual se ve afectada su sobrevivencia. Al respecto Martínez-Alvarez *et al.* (2002), señalaron que cuando las alteraciones ambientales sobrepasan los mecanismos fisiológicos del animal para responder y adaptarse a las nuevas condiciones, el resultado es la perturbación interna del pez lo cual puede conllevar su muerte.

Los parámetros fisicoquímicos registrados durante el ensayo en los acuarios arrojaron

valores promedio de temperatura de $26,41 \pm 0,42$ °C, oxígeno disuelto $8,59 \pm 2,77$ mg.L⁻¹ y pH $7,53 \pm 0,54$, sin diferencias significativas ($P > 0,05$) entre los acuarios. Estos valores se encuentran dentro de los rangos de referencia para *C. macropomun* en cultivo (González y Heredia, 1998), por lo que se puede deducir que estos parámetros no influyeron en los resultados de sobrevivencia observados.

Las concentraciones de Hb y HCTO (Figura 1) arrojaron diferencias significativas entre los grupos experimentales ($P < 0,001$), encontrándose los valores promedio más altos de Hb en los peces sometidos a 0 UPS ($13,8 \pm 0,77$ g.dL⁻¹) y los más bajos en los peces expuestos a 10 UPS de salinidad ($11,4 \pm 0,78$ g.dL⁻¹). Así mismo, el HCTO mostró el mayor valor en el grupo de 0

UPS ($14 \pm 4,66$) y el más bajo en el grupo de 10 UPS ($7 \pm 0,18$). Similarmente, Tavares-Dias *et al.* (2000), encontraron una correlación positiva entre el porcentaje de HCTO y la concentración de Hb en *C. macropomun*, por lo que es lógico observar que al haber una disminución del HCTO, ocurrirá una subsecuente disminución de la concentración de Hb. La reducción del porcentaje de HCTO por el incremento de salinidad, ha sido reportada con anterioridad en otros peces de agua dulce como *Ciprinus carpio* (Hafez y Oryan, 2002).

Se ha comprobado que los cambios de salinidad ocasionan estrés y alteran las características hematológicas básicas de los peces teleósteos reduciendo los niveles de algunos parámetros sanguíneos (Martins *et al.*, 2004). Estas

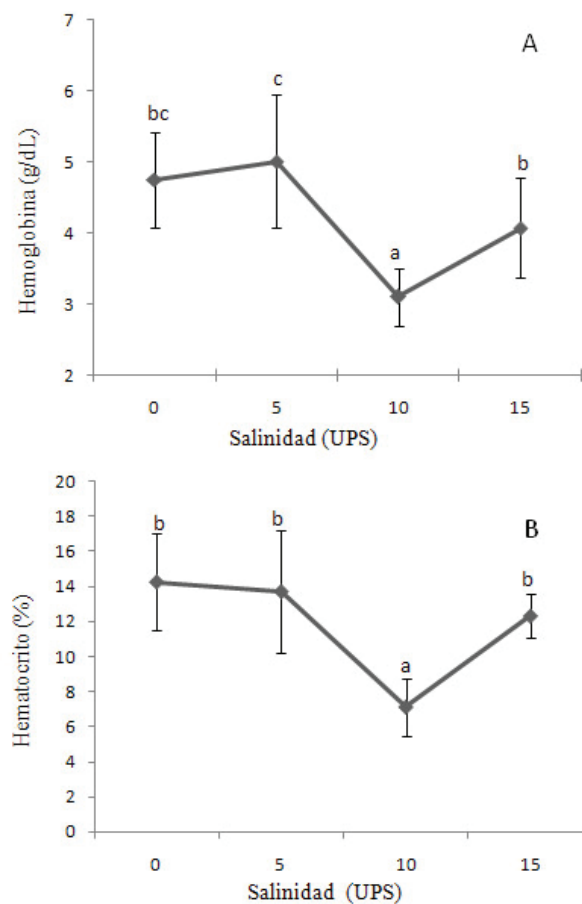


Figura 1. Valores de hemoglobina (A) y hematocrito (B) en alevines de *Colossoma macropomun* expuestos a cambios graduales de salinidad.

alteraciones pudieran ocasionarse por las variaciones en el contenido de agua de la sangre causada por los cambios de salinidad, lo que a su vez produce una disminución del número de glóbulos rojos circulantes. Este tipo de cambio puede indudablemente alterar, tanto el transporte de oxígeno en la sangre como la transferencia de oxígeno a través de las branquias, lo cual va a depender no solo del tipo o naturaleza del estrés, sino también de la edad, sexo o especie (Akinrotimi *et al.*, 2007).

Los peces empleados en este ensayo presentaron una recuperación de los valores de HCTO y Hb en 15 UPS. Según Martínez-Alvarez *et al.* (2002), al comienzo de una exposición en un ambiente hiperosmótico los peces deberían perder agua pasivamente y por consecuencia, aumentar las concentraciones de los elementos en las células sanguíneas. Luego de esto, el incremento compensatorio en la ingestión de agua proporciona una dilución transitoria de los parámetros sanguíneos. Finalmente, estos deberían retornar a los valores iniciales como resultado de la intervención de los mecanismos

osmoregulatorios, los cuales actúan para reestablecer el volumen extracelular. Nuestros resultados muestran que los mecanismos osmorregulatorios de *C. macropomun* se activaron con los incrementos de salinidad. Sin embargo, estos mecanismos no fueron suficientes para mantener la integridad del pez por encima de 15 UPS.

Los valores de Hb registrados en los peces mantenidos en condiciones de aclimatación (0 UPS) se encuentran por debajo de los reportados por Centeno *et al.* (2007) en alevines de *C. macropomun* de 15,07 g de peso promedio mantenidos en confinamiento en lagunas de cultivo, los cuales arrojaron valores de 9,94 g/dL de Hb y 29,87 % de HCTO. Aunque, se asemejan a los obtenidos por Salazar *et al.* (2011), en juveniles de la misma especie, pero de 40 g de peso promedio.

El CHCM no mostró diferencias significativas entre los grupos (Figura 2), arrojando valores similares a los reportados por Affonso *et al.* (2002) en *C. macropomun* expuesto a hipoxia y

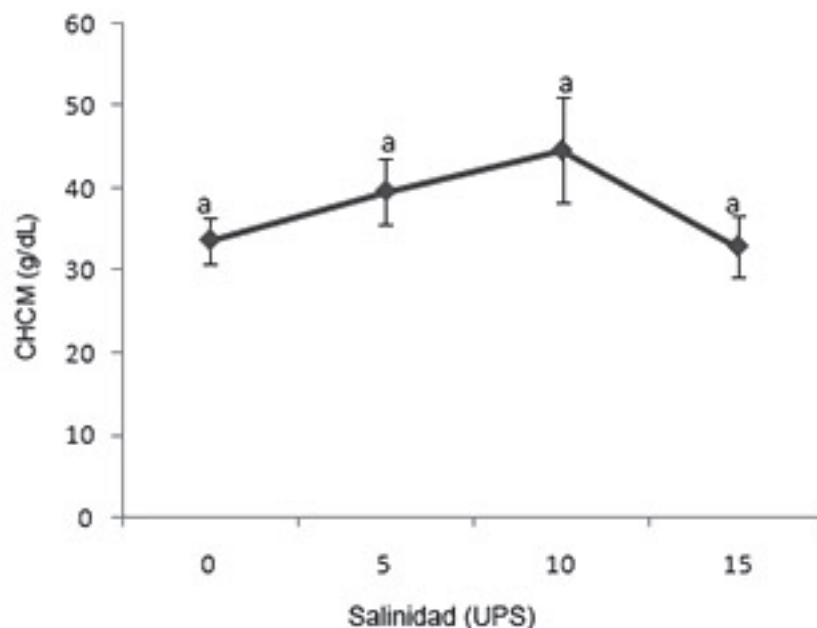


Figura 2. Valores CHCM en alevines de *Colossoma macropomun* expuestos a cambios graduales de salinidad.

por Centeno *et al.* (2007) en juveniles del mismo pez, en condiciones normales de cultivo.

El Cuadro, muestra los resultados del conteo diferencial de LEUC encontrados en alevines de *C. macropomun* sometidos a cambios graduales de salinidad, observando que las células más frecuentes en las extensiones sanguíneas fueron los neutrófilos (NEUT), eosinófilos (EOSI) y linfocitos (LINF), con valores muy bajos de monocitos y ausencia de basófilos en todas las lecturas.

No se encontraron diferencias significativas en los valores promedios de NEUT observados en las diferentes salinidades probadas. El conteo de LINF ($F_s = 12,73^{***}$; $P < 0,001$) mostró incrementos en los peces a la salinidad 15 UPS, en comparación con los peces en la condición de 0 UPS. Similares resultados fueron obtenidos por Tavares-Dias *et al.* (2001) en *C. macropomun* sometidos al estrés por captura y manejo. Los LINF son un grupo importante de células que pueden afectar la respuesta inmunológica de los peces; un aumento de este grupo celular puede indicar un incremento en las defensas del organismo, debido a las condiciones adversas en las cuales se encuentra (Clauss *et al.*, 2008). Sin embargo, estos cambios en la cantidad de células pueden ser diferentes entre especies dependiendo de la composición genética, el estado nutricional, el ambiente y la historia de vida de los organismos (Jalali *et al.*, 2009).

Al comparar estos resultados con otros trabajos, se puede observar que la proporción de los distintos tipos de células es muy variable entre especies, ya que se encuentran resultados de 3,20% de linfocitos para *Piaractus mesopotamicus* (Tavares-Dias *et al.*, 2002); así como registros de 63,64% de linfocitos en juveniles de *Oreochromis niloticus* en salinidades de 0 UPS (Gabriel *et al.*, 2011).

Los valores de EOSI presentaron incrementos a medida que fue aumentando la salinidad, para luego disminuir en 15 UPS, alcanzando valores menores que los encontrados en la salinidad inicial. Un incremento en los EOSI está altamente relacionado con enfermedades en los peces y la ocurrencia parasitaria (Martins *et al.* 2004), puesto que en condiciones normales (peces sanos) son escasas y en algunos casos ausentes. En particular, se cree que estas células actúan mayoritariamente como centinelas primarios contra la infección por helmintos y contra las alergias (Rosenberg, 2010). Esto permite la reflexión de que los peces empleados para el ensayo presentaban algún tipo de proceso patológico, probablemente por las condiciones de cautiverio en que se encontraban antes de ser aclimatados, condición que se vio agravada al ser sometidos al estrés salino. Aspecto que pudiera ser considerado, ya que en los frotis sanguíneos realizados a los organismos de esta investigación, se observaron trofozoitos

Cuadro. Resultados del conteo diferencial de leucocitos en alevines de *C. macropomun* (n=6) expuestos a cambios graduales de salinidad, expresados en medias con sus respectivas desviaciones estándar.

Salinidad (UPS)	N	Neutrófilos (%)	Eosinófilos (%)	Linfocitos (%)	Monocitos (%)	Basófilos (%)
0	6	26,86 ± 12,63	31,0 ± 10,9 ^a	29,57 ± 11,1 ^a	3,75 ± 0,5	0
5	6	39,71 ± 14,6	40,71 ± 10,08 ^b	28,71 ± 10,75 ^a	5,0 ± 1,41	0
10	6	30,0 ± 10,71	49,57 ± 6,48 ^b	17,57 ± 6,92 ^b	3,5 ± 1,29	0
15	6	30,86 ± 4,45	24,57 ± 8,56 ^a	49,00 ± 9,33 ^c	0	0
		ns	*** F=10,03	*** F=12,73	ns	ns

Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas entre los valores obtenidos en cada salinidad ($P < 0,001$).

de *Mixobulos* sp (datos no reportados), lo cual pudiera explicar la elevada proporción de células eosinofílicas en estos peces.

CONCLUSIONES

La exposición de alevines de *Colossoma macropomum*, a cambios graduales de salinidad origina alteraciones de los parámetros hematológicos, hemoglobina, hematocrito y CHCM. Estas alteraciones pueden influir en la capacidad del organismo para adaptarse a las nuevas condiciones de salinidad, siendo probablemente la causa del deterioro de la salud del pez al someterse a salinidades de 15 UPS.

LITERATURA CITADA

- Affonso, E., V. Polez, C. Correa, A. Mazon, M. Araujo, G. Moraes and F. Ratin. 2002. Blood parameters and metabolites in the teleosts fish *Colossoma macropomum* exposed to sulfide or hypoxia. *Comp. Biochem. Physiol.* 133:375-382.
- Akinrotimi, O., U. Gabriel, P. Anyanwu and A. Anyanwu. 2007. Influence of sex, acclimation methods and period on haematology of *Sarotherodon melanotheron* (*Cichlidae*) *Res. J. Biol. Sci.* 2(3):348-352.
- Blaxhall, P. and W. Daisley. 1973. Routine haematological methods for use with fish blood. *J. Fish. Biol.* 5 (6):771-781.
- Centeno, L., A. Silva-Acuña, R. Barrios, R. Salazar-Lugo, C. Matute y J. Pérez. 2007. Características hematológicas de la cachama (*Colossoma macropomum*) en tres etapas de crecimiento cultivadas en el estado Delta Amacuro, Venezuela. *Zootecnia Trop.* 25(4):237-243.
- Clauss, T., A. Dove and J. Arnold. 2008. Hematologic Disorders of Fish. *Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice*, 11(3):445-462.
- Drabkin, D. L. and J. M. Austin. 1932. Spectrophotometric constants for common haemoglobin derivatives, in human, dog and rabbit blood. *J. Biol. Chem.* 98(2):719-733.
- Gabriel, U., O. Akinrotimi and F. Esemokumo. 2011. Haematological responses of wild Nile Tilapia *Oreochromis niloticus* after Acclimation to Captivity. *Jordan J. of Biol. Sci.* 4(4):225-230.
- González, J. y B. Heredia. 1998. Calidad del agua. **En:** Cultivo de la cachama (*Colossoma macropomun*). Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias Centro de Investigaciones Agropecuarias del estado Guárico, Venezuela, 134 p.
- Hafez, P. and S. Oryan. 2002. Effect of NaCl stress on Hematocrit and haemoglobin common carp (*Cyprinus carpio*). *Iran. Fish. J.* 3:13-22.
- Hantonella, A. 1998. Interrenal dysfunction in fish from contaminated sites: in vivo and in vitro assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 17(1):44-48.
- Henry, J. 2007. El laboratorio en el diagnóstico clínico. Marbaán Librod, S. L. Madrid, España.
- ICSH International Committee for Standardization in Haematology. 1984. Reference method for staining of blood and bone marrow films by azure B and eosin Y (Romanowsky stain). *Brit. J. Haematol;* 57(4):707-10.
- Jalali, M., E. Ahmadifar, M. Sudagar and G. Azari Takami. 2009. Growth efficiency, body composition, survival and haematological changes in great sturgeon (*Huso huso* Linnaeus, 1758) juveniles fed diets supplemented with different levels of Ergosan. *Aquac. Res.* 40:804-809.
- Kandeepan, C. 2014. Effect of Stress on Haematological parameters of air breathing loach *Lepidocephalus thermalis* (Cuv & Val). *Int. J. Curr. Res. Aca. Rev.* 2(8):309-322.
- Larumbe-Moran E., M. Hernández-Vergara, M. Olvera-Novoa y C. Rostro. 2010. Protein requirements of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fry cultured at different salinities. *Aquac. Res.* 41, 1150-1157.
- Martinez-Alvarez, R., M. Hidalgo, A. Domezain, A. Morales, M. Garcia-Gallego and A. Sanz. 2002. Physiological changes of sturgeon,

- Acipenser naccarii*, caused by increasing environmental salinity. J. Experim. Biol. 205:3699-3706.
- Martins, M., M. Tavares-Dias, R. Fujimoto, E. Onaka and D. Nomura. 2004. Haematological alterations of *Leporinus macrocephalus* (Osteichthyes: Anostomidae) naturally infected by *Goezia leporini* (Nematoda: Anisakidae) in fish pond. Rev. SciELO Br. 56(5):640-646.
- Poleo, G., J. V. Aranbarrio, L. Mendoza y O. Romero. 2011. Cultivo de cachama blanca en altas densidades y en dos sistemas cerrados. Pesq. Agropec. Bras. 46(4):429-437.
- Rosenberg, H. 2010. Eosinophils are in the swim! Blood. 116(19):3692-3693.
- Salazar, R., Y. Blanco, L. Centeno y M. Lemus. 2011. Variaciones en los parámetros hematológicos y en la respuesta inmune inespecífica de la cachama negra *Colossoma macropomum* expuesta a cadmio. Saber, Universidad de Oriente, Venezuela, 23(1):28-35.
- Silva, C. R., L. C. Gomes and F. R. Brandao. 2007. Effect of feeding rate and frequency on tambaqui (*Colossoma macropomum*) growth, production and feeding costs during the first growth phase in cages. Aquaculture 264:135-139.
- Siqueira- Fiúza, L., N. Moraes Aragão, H. Pinto Ribeiro, M. Gazzineo De Moraes, I. Régis Castelo Branco Rocha, A. Lustosa Neto, R. Rocha De Sousa, R. Malvino Madrid, E. Gonçalves De Oliveira and F. Farias Costa. 2013. Effects of salinity on the growth, survival, haematological parameters and osmoregulation of tambaqui *Colossoma macropomum* juveniles. Aquac Res, 1-9.
- Sokal, R. and F. Rohlf. 1980. Biometry. W. H. Freeman and Company. San Francisco. U.S.A., 776 p.
- Tavares-Dias, M., M. Martins, S. Schalch, E. Onaka, J. Moraes, C. Quintana e F. Moraes. 2002. Alterações hematológicas e histopatológica em pacus *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae) tratados com sulfato de cobre (CuSO₄). Acta Sci. Anim. Sci. 24(2):547-554.
- Tavares-Dias M., E. Sandrim, F. Moraes and P. Carneiro. 2001. Physiological responses of "tambaqui" *Colossoma macropomum* (Characidae) to acute stress. Bol. Inst. Pesca 27(1):43-48.
- Tavares-Dias, M., S. Schalch, M. Martins, E. Onaka and F. Moraes. 2000. Haematological characteristics of Brazilian teleosts. III. Parameters of the hybrid tambacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 x *Colossoma macropomum* Cuvier 1818) (Osteichthyes, Characidae). Rev. Bras. Zool. 17:899-906.
- Vargas-Chacoff, L., A. Calvo, I. Ruiz-Jarabo, F. Villarroel, J. Muñoz, A. Tinoco, S. Cardenas and J. Mancera. 2011. Growth performance, osmoregulatory and metabolic modifications in red porgy fry, *Pagrus pagrus*, under different environmental salinities and stocking densities. Aquac. Res. 42:1269-1278.
- Useche, M. 2000. El cultivo de la cachama, manejo y producción. Primer taller piscícola 2000. Universidad Experimental del Táchira. Decanato de Investigaciones San Cristóbal. Venezuela. Disponible en línea: www.unet.edu.ve/~frey/varios/dinv/piscicultura/cachama/ [Ago. 27, 2012].
- Wahli, T. 2002. Approaches to investigate environmental impacts on fish health. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 22(2):126-132.
- Wintrobe, M. 1934. Variations in the size and haemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. Folia Haematol. 51:32-49.
- Zbanyszczek, R. and L. S. Smith. 1984. The effect of water-soluble aromatic hydrocarbons on some haematological parameters of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, during acute exposure. J. Fish Biol. 24, 545-552.