

Perfil proteico de tilápia nilótica chitralada (*Oreochromis niloticus*), submetida ao estresse crônico por hipóxia

[*Proteic electrophoretic profile of chitralada tilapia nilotic (Oreochromis niloticus), exposed to hypoxia chronic stress*]

D.C. Melo, D.A.A. Oliveira, M.M. Melo, D.V. Júnior, E.A. Teixeira, S.R. Guimarães

Escola de Veterinária - UFMG
Caixa Postal 567
31123-970 – Belo Horizonte, MG

RESUMO

Avaliou-se a variação da resposta secundária ao estresse causado por hipóxia durante 18 dias, em sistema de recirculação, em uma linhagem de tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*), chitralada, refletida no perfil proteico eletroforético do peixe e avaliou-se a diferença entre sexos para essa resposta. Foram utilizados 126 peixes, sendo 60 machos e 66 fêmeas, ambos com média de peso de 800g. O estresse crônico por hipóxia alterou ($P<0,05$) os valores médios relativos de albumina, $\alpha+\beta$ -globulinas e de γ -globulina, provocou alteração ($P<0,05$) nos níveis de proteína total relativo ao aumento no grupo dos machos, diminuição significativa dos valores médios absolutos de albumina devido à diminuição nas fêmeas e à diminuição de γ -globulina nos machos. As variantes proteicas, albumina e γ -globulina tiveram influência do sexo.

Palavras-chave: tilápia, perfil eletroforético, estresse, hipóxia

ABSTRACT

This study evaluated the secondary response variation to hypoxia stress in a strain of chitralada nilotic tilapia (Oreochromis niloticus) during 18 days, in a recirculation system. The effects were measured by the proteic electrophoretic profile and the difference between the genders. One hundred twenty-six fish were used, 60 males and 66 females, both averaging 800g. The chronic hypoxia stress altered ($P<0.05$) the relative values of albumin, $\alpha+\beta$ -globulins, and γ -globulin; modified ($P<0.05$) the levels of total protein due to an increase in the male group; significantly decreased of the absolute mean values of albumin due to a decrease in the female group; and decreased the γ -globulin values in males. The proteic profile, albumin, and γ -globulin were influenced by gender.

Keywords: tilapia, electrophoresis profile, stress, hypoxia

INTRODUÇÃO

As proteínas, compostos indispensáveis à vida, representam a base da estrutura de células, tecidos e órgãos. Funcionam como catalisadores enzimáticos nas reações bioquímicas, carreadores de muitos constituintes do plasma e na defesa do organismo como anticorpos. Na área de patologia de peixes, ocorrem muitas vezes dificuldades de se estabelecer um diagnóstico rápido e de baixo custo aos

produtores. O perfil proteico eletroforético não fornece informações específicas, mas é útil no diagnóstico quando seus valores são analisados e associados ao quadro clínico, sendo importantes para o diagnóstico e o prognóstico de algumas enfermidades (Kaneko et al., 1997).

Os dois principais tipos de proteínas do plasma são albumina e globulinas. A albumina é uma lipoproteína de alta densidade, e sua síntese é influenciada pela nutrição, balanço hormonal,

estado geral do fígado e estresse (Hasegawa et al., 2002). Suas funções estão relacionadas com o transporte de substâncias e com a regulação e a manutenção da pressão coloidosmótica sanguínea (Leite, 1995; Kaneko et al., 1997; Thrall, 2007). As globulinas abrangem proteínas que atuam no sistema imune, fatores de coagulação, enzimas e proteínas transportadoras. Geralmente, são classificadas em alfa, beta e gamaglobulinas (também denominadas imunoglobulinas), em função de sua mobilidade eletroforética (Gershwin, 1989; Kaneko et al., 1997; Godoy et al., 2006; Thrall, 2007). Ao contrário dos mamíferos e das aves que apresentam cinco tipos de imunoglobulinas (IgA, IgE, IgD, IgG e IgM), os peixes apresentam apenas um tipo, a IgM.

Em sistemas intensivos de criação de peixes, a ocorrência de situações estressantes é inevitável. Durante o período de criação, os animais são submetidos a inúmeros manejos e variações ambientais. As consequências são, geralmente, redução do crescimento e do ganho de peso, do desempenho reprodutivo e da resistência a patógenos. O somatório dessas mudanças é comumente referido como resposta ao estresse (Barton e Iwana, 1991). Vários estudos têm mostrado que o estresse exerce efeito depressivo sobre várias respostas imunológicas em peixes, como aumento nas proteínas totais séricas (Milligan e Wood, 1982; McDonald e Milligan, 1992) e diminuição na produção de anticorpos (IgM) e no número de células produtoras de anticorpos (Carlson et al., 1993).

Muitos estudos têm sido realizados com determinação das proteínas e seu valor no diagnóstico e no prognóstico das doenças em mamíferos e aves (Canavessi et al., 2000; Hasegawa et al., 2002; Godoy et al., 2006). Os poucos trabalhos existentes sobre perfil proteico eletroforético de peixes são referentes à administração de imunoestimulantes ou comparação entre espécies (Tinman et al., 2000; Palti et al., 2000). Porém, não existem estudos sobre a influência do estresse por hipóxia no perfil proteico eletroforético de tilápias.

Portanto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o perfil proteico eletroforético de tilápias da linhagem chitralada, submetidas ao estresse por hipóxia.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 126 peixes do gênero *Oreochromis*, linhagem chitralada, sendo 60 machos e 66 fêmeas, ambos com média de peso de 800g, oriundos da Fazenda Geneforte, localizada no município de Pedro Leopoldo, MG. Cada animal foi anestesiado com quinaldina¹ (0,5mL/10L) e identificado por um *piercing* numerado no opérculo. Os peixes, transportados para o Laboratório de Aquicultura (Laqua) da Escola de Veterinária da UFMG e mantidos em tanques de 0,4m³ em sistema de recirculação com uma troca de água por hora (400L/h), durante duas semanas para aclimação, receberam 1% do peso vivo de ração comercial, por dia para manutenção do peso.

Após o período de aclimação, fêmeas e machos foram separados - 10 e 11 animais por tanque, respectivamente, de modo que essa estocagem não provocasse estresse devido à densidade -, pesados e divididos por sorteio em: três tanques de tilápias machos submetidas ao estresse e outros três sem estresse (controle); três tanques de tilápias fêmeas submetidas ao estresse e outros três sem estresse (controle).

O estresse aplicado ao experimento foi por redução da taxa de oxigênio dissolvido na água para aproximadamente 1,5mg/L durante 18 dias. Para isso, os fluxos dos tanques contendo os animais submetidos ao estresse foram ajustados para 0,415L de água por minuto para cada quilo de peixe, e os registros de ar foram deixados ligeiramente abertos. Já os tanques contendo os animais-controle foram ajustados para 1,25L de água por minuto para cada quilo de peixe, e os registros de ar foram deixados abertos totalmente (Tab. 1). O monitoramento do oxigênio e a temperatura da água nos tanques eram feitos quatro vezes ao dia (9, 13, 17e 21h, utilizando o oxímetro modelo YSI 55. pH e nitrito foram medidos a cada dois dias por método colorimétrico.

Após 18 dias de estresse, de cada indivíduo anestesiado com quinaldina (1mL/10L) foram coletados 3mL de sangue por punção cardíaca, utilizando seringas descartáveis de 3mL e agulhas descartáveis 25x8. Desse volume de

¹Merck Brasil – São Paulo, Brasil.

sangue, 250µL foram acondicionados em microtubos contendo solução de ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) a 10%, para centrifugação e produção de plasma e posterior determinação dos valores de proteína total, por refratometria, e perfil protéico eletroforético,

segundo técnica descrita por Naoum (1990) modificada (fitas de gel de agarose, tampão TRIS e 45min de corrida) em cuba de fonte para eletroforese². As fitas foram lidas, utilizando o *software* CELM para determinação dos valores relativos e absolutos de albumina e globulinas.

Tabela 1. Fluxo das caixas regulado de acordo com o peso das tilápias, machos e fêmeas, em cada caixa (L/min/kg)

Estressado					
Macho	Peso	Fluxo (L/min)	Fêmea	Peso	Fluxo (L/min)
Caixa 12	8.2kg	3,40	Caixa 1	9.2kg	3,82
Caixa 13	5.0kg	2,07	Caixa 4	9.0kg	3,73
Caixa 5	9.5kg	3,94	Caixa 6	9.0kg	3,73
Controle					
Macho	Peso	Fluxo (L/min)	Fêmea	Peso	Fluxo (L/min)
Caixa 11	9.5kg	11,87	Caixa 2	9.0kg	11,25
Caixa 14	7.4kg	9,25	Caixa 3	8.0kg	10,0
Caixa 15	8.0kg	10,0	Caixa 19	8.6kg	10,75

*O cálculo do consumo de oxigênio (CO) foi baseado na equação: $CO = (1000/peso) \times (peso)^{0,82}$ sendo o peso em gramas, segundo Kubitzka (1998).

O ensaio foi realizado em delineamento inteiramente ao acaso, em arranjo fatorial 2x2 (duas condições de estresse e dois sexos). Foi aplicado teste de normalidade para verificar a distribuição das variáveis e, para aquelas que não tiveram distribuição normal (albumina%, γ -globulina e γ -globulina%), foi feito um ajuste de transformação utilizando $\log x+1$. Os valores médios foram comparados pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Foi calculada também a correlação das variáveis analisadas. Para tal, empregou-se o programa SAS/1994.

RESULTADOS

Durante o período do estudo, a temperatura da água dos tanques variou de 26,8 a 28,1°C, média de 27,7°C; o pH variou de 7,4 a 7,8; o nitrito manteve-se menor que 0,3, e o oxigênio dissolvido no tanque do grupo dos estressados variou de 1,05 a 2,63mg/L e nos tanques do grupo-controle de 4,15 a 4,96mg/L (Tab. 2).

A corrida de eletroforese utilizada para a análise de perfil protéico das tilápias identificou albumina, α e β -globulinas juntas e γ -globulina (Fig. 1).

Quanto aos valores absolutos e relativos de α + β -globulinas e os valores relativos de albumina e γ -globulina, não se observou interação significativa de tratamento *versus* sexo. Para os valores de proteína total e os absolutos de albumina e γ -globulina, a interação tratamento *versus* sexo foi significativa.

Após o estresse por hipóxia, os valores relativos do nível sérico de albumina e γ -globulina das tilápias diminuíram significativamente, e o valor relativo de α + β -globulinas aumentou ($P<0,05$) (Tab. 3).

Os machos estressados apresentaram valor mais alto de proteína total em relação às fêmeas e estas valores maiores de albumina e γ -globulina do que os machos (Tab. 5). No grupo-controle, as fêmeas apresentaram maiores valores ($P<0,05$) de proteína total e albumina do que os machos (Tab. 6).

²Cuba Fonte para eletroforese ARGOS 12 – Techon Instrumentos Científicos Ltda – São Paulo/Brasil; 110v

Tabela 2. Valores de oxigênio (mg/L), média de três dias de medição, de tilápias segundo a caixa e o dia

Caixa/dia	1,2,3	4,5,6	7,8,9	10,11,12	13,14,15	16,17,18
Controle						
2	4,88	4,77	4,96	4,83	4,70	4,74
3	4,68	4,83	4,89	4,89	4,89	4,83
11	4,61	4,89	4,76	4,75	4,90	4,89
14	4,95	4,65	4,88	4,95	4,89	4,71
15	4,58	4,65	4,78	4,82	4,86	4,81
19	4,68	4,79	4,90	4,88	4,74	4,86
Estressado						
1	2,11	1,63	1,64	1,83	1,77	1,72
4	2,29	1,85	1,76	1,86	1,76	1,71
5	2,31	1,84	1,62	1,89	1,69	1,64
6	2,32	1,87	1,65	1,79	1,61	1,69
12	2,15	1,86	1,73	1,82	1,72	1,74
13	2,36	1,68	1,65	1,78	1,75	1,74

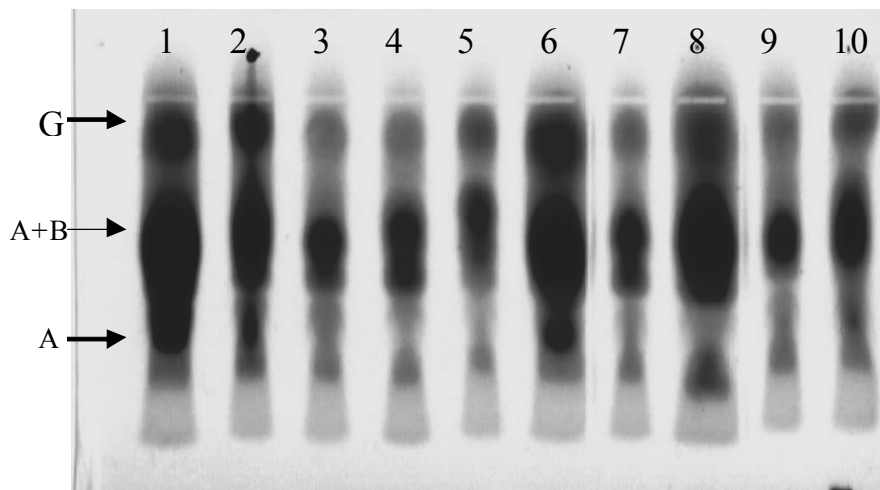


Figura 1. Fita de gel de agarose após a corrida de eletroforese da distribuição da fração de proteína do soro de tilápia. (1 a 10 = indivíduos, A = albumina, A+B = α e β -globulinas juntas, G = γ -globulina).

Tabela 3. Médias e desvio-padrão do perfil proteico eletroforético de tilápias dos grupos-controle e estressado

Variável	Controle	Estressado
Albumina (%)	15,38 \pm 0,65a	12,16 \pm 0,47b
α + β -globulina (g/dL)	3,37 \pm 0,07a	3,98 \pm 0,11a
α + β -globulina (%)	67,34 \pm 1,23b	74,10 \pm 0,52a
γ -globulina (%)	16,43 \pm 0,74a	13,74 \pm 0,38b

Médias seguidas de letras distintas na linha indicam diferença significativa pelo teste Tukey ($P < 0,05$).

Perfil proteico de tilápia nilótica...

Tabela 4. Médias e desvio-padrão das variáveis bioquímicas do sangue de tilápias fêmeas e machos

Variável	Fêmea	Macho
Albumina (%)	14,75±0,56a	12,64±0,62b
α + β-globulina (g/dL)	3,79±0,07a	3,13±0,09a
α + β-globulina (%)	71,02±0,55a	70,50±1,39a
γ-globulina (%)	14,19±0,43b	16,02±0,759a

Médias seguidas de letras distintas na linha indicam diferença significativa pelo teste Tukey (P<0,05).

Tabela 5. Médias e desvio-padrão do perfil proteico eletroforético de tilápias do grupo estressado

Variável	Fêmea	Macho
Proteína total (g/dL)	4,25±0,61b	5,56±0,55a
Albumina (g/dL)	0,679±0,033a	0,515±0,036b
γ-globulina (g/dL)	0,717±0,031a	0,619±0,023b

Médias seguidas de letras distintas na linha indicam diferença significativa pelo teste Tukey (P<0,05).

Tabela 6. Médias e desvio-padrão do perfil proteico eletroforético de tilápias do grupo controle

Variável	Fêmea	Macho
Proteína total (g/dL)	5,35±0,58a	4,50±0,47b
Albumina (g/dL)	0,890±0,050a	0,626±0,042b
γ-globulina (g/dL)	0,792±0,03a	0,824±0,05a

Médias seguidas de letras distintas na linha indicam diferença significativa pelo teste Tukey (P<0,05).

Na Fig. 2, mostra-se o desdobramento da condição de estresse/sexo ao comparar os grupos-controle e estressado, dentro de sexo, para o perfil proteico eletroforético. O estresse por hipóxia provocou diminuição significativa de

proteína total e dos valores absolutos de albumina nas fêmeas, e aumento de proteína total e diminuição de γ-globulina nos machos.

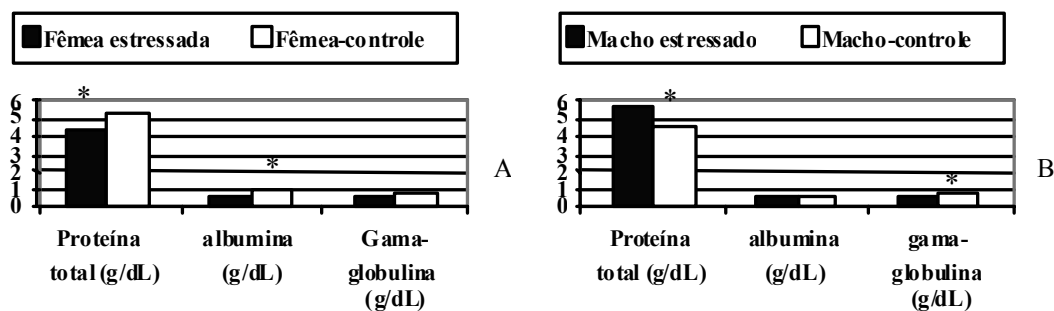


Figura 2. Valores de proteína total, albumina e gama-globulina de tilápias dos grupos-controle e estressado, fêmeas (A) e machos (B). *Diferença significativa (P<0,05) pelo teste Tukey entre os grupos.

DISCUSSÃO

O estresse devido à hipóxia reduz a taxa de crescimento e desenvolvimento, promove mudanças morfológicas, alterações comportamentais e uma variedade de ajustes metabólicos e fisiológicos em várias etapas da

vida do peixe (Adolph, 1983). Segundo Smart (1981), para salmonídeos, o mínimo de oxigênio dissolvido requerido é 5-6mg/L, ao passo que, para bagre americano (*Ictalurus punctatus*) e espécies de tilápia, o mínimo é de 3mg/L. Valores menores que estes seriam considerados estressantes. Durante o experimento, nenhum

animal morreu devido ao tratamento imposto. Isso sugere que a linhagem de tilápia utilizada é capaz de resistir bem a ambientes com baixos níveis de oxigênio dissolvido.

Neste trabalho, a concentração de proteína total aumentou no grupo dos machos estressados e diminuiu nas fêmeas. A determinação da concentração de proteína total no plasma e de suas frações é de grande importância clínica, pois sua concentração plasmática é responsável pela pressão coloidosmótica desse líquido corporal. Leamaster et al. (1990) observaram níveis séricos de proteína total maiores em fêmeas de tilápias de água doce expostas à água salgada, que em machos. Tavares-Dias et al. (2004), ao pesquisarem a influência de vários parâmetros sanguíneos na primeira maturação gonadal de carpa comum (*Cyprinus carpio*), não encontraram diferença nos níveis séricos de proteína total entre machos e fêmeas.

A proteína total é alterada principalmente por mudanças no volume plasmático. Um aumento é causado por mudança de fluido do plasma para o compartimento intracelular e uma diminuição pode ser causada por hidratação do plasma. A saída dos fluidos do plasma é causada por desequilíbrio osmótico entre os compartimentos extracelular e intracelular, e qualquer estresse que induz tal desequilíbrio pode levar a um aumento de proteína no plasma (McDonald e Milligan, 1992). Segundo Milligan e Wood (1982), o total de proteína plasmática em truta arco-íris aumentou em resposta ao exercício intenso e à exposição ao ambiente com baixo pH. Hrubec et al. (2000) e Montero et al. (2001) também observaram aumento das proteínas totais em híbridos de tilápia (*Oreochromis niloticus* x *O. Mossambicus* x *O. aureus*) e de dourada (*Sparus aurata*), respectivamente, criados em alta densidade em relação ao grupo de baixa densidade. Dobsíková et al. (2006), ao estudarem o efeito do piretroide cypermethrina em carpa comum, por 96h, observaram que esse piretroide diminuiu os níveis de proteína total, albumina e globulinas no plasma sanguíneo. Khalaf-Allah (1999) observou aumento de proteína total, globulinas e IgM em tilápias nilóticas não imunizadas com antígeno de *Staphylococcus aureus*, expostas a vários tipos de pesticida por 30 dias.

Os valores médios das $\alpha+\beta$ -globulinas aumentaram no grupo estressado. De acordo com

Thrall (2007), o aumento no teor de α -globulinas é inespecífico e de importância diagnóstica limitada, é a inflamação aguda é a causa mais comum. No presente trabalho, a γ -globulina diminuiu após o estresse por hipóxia. Essa diminuição foi devido à diminuição dessa proteína no grupo de machos. Segundo Harris e Bird (2000), a testosterona reduz o número de células produtoras de anticorpos, e isso pode explicar por que os níveis dessa proteína foram menores nos machos. De acordo com Hoeger et al. (2005), machos de truta arco-íris expostos a efluentes de esgoto e injetados com *Aeromonas salmonicida* apresentam títulos mais altos de IgM em relação às fêmeas. Dentre as proteínas do plasma, as imunoglobulinas destacam-se por suas funções na imunidade. Essas proteínas desempenham papel importante no mecanismo de defesa imune humoral por suas características em reconhecer e interagir com componentes estranhos no organismo. De acordo com Wechsler et al. (1986), a dose de 100mg/kg de triamcinolone, um glicocorticoide sintético, diminuiu os níveis de anticorpos circulantes em *striped bass* (*Morone saxatilis*) exposto ao vírus da infecção necrótico-pancreática (IPNV). Maule e Schreck (1990) observaram diminuição da atividade de células produtoras de anticorpos e do título de IgM circulante em *coho salmon* após estresse agudo por hipóxia. Chen et al. (2002) observaram supressão do nível plasmático de IgM após a exposição de tilápias à baixa temperatura (12°C), por períodos de 30 minutos e 2 horas.

No presente estudo, o estresse por hipóxia provocou alterações no nível de albumina. Segundo Hasegawa et al. (2002), sua síntese é influenciada pela nutrição, balanço hormonal, estado geral do fígado e estresse. Um fator que pode ter contribuído para a diminuição da albumina do grupo estressado foi o reduzido consumo de ração, pois nesse grupo foram observadas, poucos minutos após a alimentação, sobras de ração no tanque. Segundo Smart (1981), um dos primeiros indícios de estresse dos peixes devido à redução da concentração de oxigênio dissolvido é a rejeição de alimento. De acordo com Leite (1995), uma das funções da albumina é servir como reservatório móvel de aminoácidos do fígado para os tecidos periféricos. Nesses tecidos, a albumina pode ser quebrada intracelularmente para fornecer aminoácidos necessários à síntese de novas proteínas.

Embora a tilápia seja o segundo peixe mais criado no mundo, existem poucos relatos que mostrem diferenças no perfil eletroforético e no estresse entre os sexos. No presente trabalho, a porcentagem de albumina e o nível relativo de γ -globulina sofreram influência do sexo. Segundo Tavares-Dias et al. (2004), em teleósteos, o dimorfismo sexual que ocorre em relação às características hematológicas pode estar associado à presença de andrógenos. Leamaster et al. (1990) também observaram níveis séricos de albumina e globulinas mais altos em fêmeas de tilápias quando expostas à água salgada que em machos.

CONCLUSÕES

Conclui-se que o estresse provocado pela hipóxia provoca alterações no perfil proteico de tilápias da linhagem chitralada e que algumas das variáveis estudadas foram influenciadas pelo sexo.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Fazenda Geneforte pela doação dos exemplares de tilápia e pelo apoio, ao Laboratório de Toxicologia da Escola de Veterinária da UFMG, e ao CNPq pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADOLPH, E.F. Uptakes and uses of oxygen, from gametes to maturity. *Resp. Physiol.*, v.53, p.135-160, 1983.
- BARTON, B.A.; IWAMA, G.K. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Ann. Rev. Fish Dis.*, v.1, p.3-26, 1991.
- CANAVESSI, A.M.O.; CHIACCHIO, S.B.; CURY, P.R. Valores do perfil eletroforético das proteínas séricas de bovinos da raça nelore criados na região de Botucatu, São Paulo: Influência dos fatores etários e sexuais. *Arq. Inst. Biol.*, v.67, p.9-17, 2000.
- CARLSON, R.E.; ANDERSON, D.P.; BODAMMER, J.E. In vivo cortisol administration suppresses the in vitro primary immune response of winter flounder lymphocytes. *Fish Shellfish Immunol.*, v.3, p.299-312, 1993.
- CHEN, W.H.; SUN, L.T.; TSAI, C.L. et al. Cold-stress induced modulation of catecholamines, cortisol, immunoglobulin M, and leukocyte phagocytosis in tilapia. *Gen. Comp. Endocrinol.*, v.126, p.90-100, 2002.
- DOBSÍKOVÁ, R.; VELISEK, J.; WLASOW, T. et al. Effect of cypermethrin on some haematological, biochemical and histopathological parameters of common carp. *Neuroendocrinol. Lett.*, v.27, p.91-95, 2006.
- GERSHWIN, L.J. Clinical immunology. In: KENKO.J.J. (Ed.). *Clinical biochemistry of domestic animals*. 4.ed. London: Academic Press, 1989. p.167-184.
- GODOY, A.V.; SANTANA, A.E.; NAKAGE, A.P.M. et al. Perfil eletroforético de proteínas séricas do sangue do cordão umbilical de cães. *Cienc. Rural*, v.36, p.531-535, 2006.
- HARRIS, J.; BIRD, D.J. Modulation of the fish immune system by hormones. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.77, p.163-176, 2000.
- HASEGAWA, M.Y.; FONTEQUE, J.H.; KOHAYAGAWA, A. et al. Avaliação do perfil eletroforético das proteínas séricas em matrizes pesadas (*Gallus Gallus domesticus*) da linhagem Avian Farm. *Rev. Bras. Cienc. Avic.*, v.4, p.203-207, 2002.
- HOEGER, B.; HITZFELD, B.; KOLLNER, B. et al. Sex and low-level sampling stress modify the impacts of sewage effluent on the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immune system. *Aquat. Toxicol.*, v.73, p.79-90, 2005.
- HRUBEC, T.C.; CARDINALE, J.L.; SMITH, S.A. Hematology and chemistry reference intervals for cultured tilapia (*Oreochromis hybrid*). *Vet. Clin. Pathol.*, v.29, p.7-12, 2000.
- KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. (Eds.). *Clinical biochemistry of domestic animals*. 5.ed. New York: Academic Press, 1997. 932p.
- KHALAF-ALLAH, S.S. Effect of pesticide water pollution on some haematological, biochemical and immunological parameters in tilapia nilotica fish. *Dtsch. Tierz. Wochenschr.*, v.106, p.67-71, 1999.

- KUBITZA, F. Qualidade da água na produção de peixes – Parte III (final). *Panorama Aquicult.*, v.8, p.35-43, 1998.
- LEAMASTER, B.R.; BROCK, J.Q.; FUJIOKA, R.S. et al. Hematologic and blood chemistry values for *Sarotherodon melanotheron* and a red hybrid tilapia in freshwater and seawater. *Comp. Biochem. Physiol.*, v.97A, p.525-529, 1990.
- LEITE, J.I.A. Proteínas do plasma. In: VIEIRA, E.C.; FIGUEREDO, E.A.; LEITE, J.I.A. et al. *Química fisiológica*. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 1995. p.9-16.
- MAULE, A.G.; SCHRECK, C.B. Changes in numbers of leukocytes in immune organs of juvenile coho salmon after acute stress or cortisol treatment. *J. Aquat. Anim. Health*, v.2, p.298-304, 1990.
- MCDONALD, D.G.; MILLIGAN, C.L. Chemical properties of the blood. In: HOAR, W.S.; RANDALL, D.J.; FARREL, A.P. (Eds.). *Fish Physiology*. San Diego: Academic, 1992. v.XIIB, p.55-134.
- MILLIGAN, C.L.; WOOD, C.M. Intracellular and extracellular acid-base status and H[±] exchange with the environment after exhaustive exercise in the rainbow trout. *J. Exper. Biol.*, v.123, p.92-121, 1982.
- MONTERO, D.; TORT, L.A.L.; VERGARA, J.M. et al. Low Vitamin E in diet reduces stress resistance of gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles. *Fish Shellfish Immunol.*, v.11, p.473-490, 2001.
- NAOUM, P.C. *Eletroforese – técnicas e diagnóstico*. São Paulo: Livraria Santos, 1990.
- PALTI, Y.; TINMAN, S.; CNAANI, A. et al. Comparative study of biochemical and non-specific immunological parameters in two tilapia species (*Oreochromis aureus* and *O. Mossambicus*). In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TILAPIA AQUACULTURE, 5., 2000, Rio de Janeiro. *Proceedings...* Rio de Janeiro, 2000. p.504-511.
- SMART, G.P. Aspects of water quality producing stress in intensive fish culture. In: PICKERING, A.D. (Ed.). *Stress and fish*. New York: Academic Press, 1981. p.277-293.
- TAVARES-DIAS, M.; BOZZO, F.R.; SANDRIN, E.F.S. et al. Células sanguíneas, eletrólitos séricos, relação hepato e esplenossomática de carpa-comum, *Cyprinus carpio* na primeira maturação gonadal. *Acta Scient. Biol. Sci.*, v.26, p.73-80, 2004.
- THRALL, M.A. *Hematologia e bioquímica clínica veterinária*. São Paulo: Roca, 2007, 582p.
- TINMAN, S.; BELOTSKY, S.; AVILAR, Y. et al. Effect of long-term oral administration of peptidoglycan on growth rate and immunostimulation response of hybrid tilapia (*Oreochromis aureus* x *O. Niloticus*). In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TILAPIA AQUACULTURE, 5., 2000, *Proceedings...* Rio de Janeiro, 2000. p.504-511
- WECHSLER, S.; McALLISTER, P.; HETRICK, F. et al. Effect of exogenous corticosteroids on circulating virus and neutralizing antibodies in striped bass *Morone saxatilis* infected with infectious pancreatic necrosis virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.12, p.305-311, 1986.