

PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E HISTOLÓGICOS DE TILÁPIA DO NILO EM RESPOSTA AO DESAFIO DE DIFERENTES NÍVEIS DE SALINIDADE

Denise Soledade Peixoto PEREIRA¹; Bartira GUERRA-SANTOS¹; Eduardo Luiz Trindade MOREIRA²; Ricardo Castelo ALBINATI¹; Maria Consuelo Caribé AYRES³

RESUMO

Esta pesquisa teve por objetivo avaliar a influência de diferentes níveis de salinidade sobre o desempenho zootécnico, parâmetros hematológicos e células de cloreto de tilápia do Nilo. 144 peixes, durante 97 dias, foram submetidos a quatro tratamentos experimentais de 0‰, 10‰, 20‰ e 25‰ de salinidade. Realizaram-se biometrias para acompanhamento dos índices zootécnicos, coletas de amostras sanguíneas para determinação do número de eritrócitos, volume globular, concentração de hemoglobina, índices hematimétricos, contagem de trombócitos e de leucócitos total e diferencial, além do perfil eletroforético das proteínas séricas. As amostras branquiais foram para contagem do número de células de cloreto. Diferenças significativas foram encontradas na concentração de hemoglobina, nas proteínas plasmáticas totais e no número de eritrócitos ($p < 0,05$). Não foi observada diferença no número de leucócitos e de trombócitos. As proteínas séricas apresentaram diferenças ($p < 0,05$) nas frações pré-albumina, $\alpha 1$ -globulina, $\alpha 2$ -globulina, β -globulina e γ -globulina. Verificou-se relação direta entre o número de células de cloreto e o aumento nos níveis de salinidade ($p < 0,05$). Os constituintes do hemograma, o perfil eletroforético de proteínas, bem como a análise quantitativa de células de cloreto branquiais, podem servir como indicadores do mecanismo de adaptação e de tolerância à salinidade em tilápia do Nilo.

Palavra-chave: brânquias, células de cloreto, eletroforese, globulinas, tolerância.

HEMATOLOGICAL AND HISTOLOGICAL PARAMETERS OF NILE TILAPIA IN RESPONSE TO THE CHALLENGE OF DIFFERENT SALINITY LEVELS

ABSTRACT

This research aimed to evaluate the influence of different levels of salinity on growth performance, haematological parameters and the cells of Nile tilapia chloride. 144 fish were used during a 97 day trial period, submitted to four experimental treatments of 0 ‰, 10 ‰, 20 ‰ and 25 ‰ salinity. Sampling were collected for monitoring of performance parameters, blood samples to determine the erythrocyte count, packed cell volume, hemoglobin concentration, the erythrocyte indices, the count of thrombocytes and leukocytes and the electrophoretic profile of serum proteins. Gill samples were also collected for counting the number of cells chloride. Significant differences were found in hemoglobin concentration, the total plasma proteins and the number of erythrocytes ($p < 0.05$). There was no difference in the number of white blood cells and thrombocytes. Serum proteins showed differences ($p < 0.05$) from pre-albumin fractions, $\alpha 1$ -globulin, $\alpha 2$ -globulin, β -globulin, and γ -globulin. There was a direct relationship between the number of chloride cells and increase in salinity levels ($p < 0.05$). The CBC constituents, the electrophoretic profile of proteins as well as quantitative analysis of gill chloride cells can serve as indicators mechanism of adaptation and tolerance to salinity in Nile tilapia.

Artigo Científico: Recebido em 24/03/2015 – Aprovado em 09/03/2016

¹ Departamento de Produção Animal, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, UFBA, Av. Ademar de Barros, 500, Ondina, 40170-110, Salvador – Ba. email: deni.soledade@gmail.com (autor correspondente);

³ Departamento de Patologia e Clínicas, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, UFBA, Av. Ademar de Barros, 500, Ondina, 40170-110, Salvador – Ba. email: bteluz@terra.com.br;

⁵ Departamento de Patologia e Clínicas, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, UFBA, Av. Ademar de Barros, 500, Ondina, 40170-110, Salvador – Ba. email: ayresmcc@gmail.com;

Keyword: gills, chloride cells, electrophoresis, globulins, tolerance.

INTRODUÇÃO

A maioria das espécies de tilápias é capaz de tolerar uma ampla variedade de salinidade. São espécies eurihalinas e, portanto, possuem habilidade para sobreviver em águas estuarinas ou mesmo em água do mar (GARCÍA-ULLOA *et al.*, 2001). Essas espécies podem crescer e se reproduzir em água salgada, no entanto, os limites de tolerância variam consideravelmente, em função da espécie, da linhagem, da idade, do tempo e do método de aclimação à água salgada e dos fatores ambientais (CHERVINSKI e HERING, 1973; SURESH e LIN, 1992). A tilápia do Nilo apresenta tolerância moderada à salinidade, suportando até 36‰ quando a transferência de água doce para água salgada é feita pelo método gradual, e de 18‰ quando a transferência é direta, sendo a faixa ótima de 5 a 10‰ (EL SAYED, 2006). Segundo WATANABE *et al.* (1985), o híbrido da *O. niloticus* X *O. mossambicus* é a espécie mais tolerante, com facilidade de adaptação na faixa de 10 a 15‰.

Essa capacidade de tolerância da tilápia às águas salobras ou salinas torna o cultivo dessa espécie uma alternativa para as regiões onde há ambientes favoráveis, como por exemplo, as regiões estuarinas ou costeiras.

Contudo, flutuações nos níveis de salinidade podem gerar estresse sobre os animais expostos, podendo modificar seu estado homeostático (BALDISSEROTO, 2009). Estudos vêm sendo realizados para investigar os limites fisiológicos de tilápias à água salgada, demonstrando as melhores condições para o crescimento, reprodução e sobrevivência (AL-MOUDI, 1987; SURESH e LIN, 1992; AL-AHMED, 2001).

A necessidade fisiológica para responder às mudanças de salinidade pode ocorrer de forma rápida ou mais lenta. Tem-se observado que as mudanças nas características sanguíneas e nos níveis plasmáticos servem como um importante elo entre as mudanças ambientais e as respostas fisiológicas (McCORNICK, 2001). O uso dos parâmetros hematológicos na avaliação da fisiologia de peixes foi proposto por HESSER (1960), e desde então, a hematologia tem sido utilizada como índice de avaliação do estado de saúde desses animais, com o propósito de detectar

alterações funcionais como resposta às diversas condições de estresse.

Os peixes são conhecidos por estar em estreito relacionamento com o meio ambiente em que vivem e, por isso o sangue irá revelar a condição corporal interna antes mesmo que haja manifestação clínica visível (MUSA e OMOREGIE, 1999; OKECHUKWU *et al.* 2007; BARBIERI e BONDIOLI, 2013). Os parâmetros sanguíneos vêm sendo, cada vez mais, reconhecidos como uma ferramenta de valor para o monitoramento da saúde de peixes (SCHUTT *et al.*, 1997), com resultados bastante confiáveis (KATALOG e PARLAK, 2004).

Outros mecanismos que permitem às tilápias tolerarem as elevadas salinidades também são investigados. A proliferação de células de cloreto em filamentos branquiais, quando os peixes são submetidos a níveis de salinidade elevados, aparentemente aumenta a sobrevivência da espécie nessas condições (AVELLA *et al.*, 1993).

Dessa forma, este estudo teve por objetivo investigar a influência de diferentes níveis de salinidade sobre os parâmetros hematológicos, o proteinograma e também as possíveis variações morfológicas nas células de cloreto de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), mantidas sob condições experimentais.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais Experimentais

Foram utilizados 144 tilápias do Nilo, com peso médio de $9,7g \pm 5,1$. Os peixes foram distribuídos, aleatoriamente, em 12 tanques com capacidade de 1000L cada, na densidade de 12 peixes por tanque, onde cada tanque representou uma unidade experimental. Os peixes permaneceram nesses tanques durante 97 dias, sendo os sete primeiros dias para adaptação às condições ambientais do sistema de cultivo e o tempo restante para desenvolvimento do experimento.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente, casualizado e, os animais foram submetidos a quatro tratamentos experimentais, com três repetições para cada tratamento, onde

T1: 0‰ de salinidade (controle); T2: 10‰ de salinidade; T3: 20‰ de salinidade e T4: 25‰ de salinidade, o valor máximo da salinidade foi obtido com base no teor de salinidade encontrado na Baía de Todos os Santos durante as coletas de água.

Para a obtenção dos níveis de salinidade dos quatro tratamentos (0, 10, 20 e 25‰) foi utilizado o regime de aclimação gradual, onde 2‰ de água salgada eram acrescido diariamente, até alcançar os respectivos tratamentos.

Durante todo o período experimental realizou-se o monitoramento dos parâmetros de qualidade de água como: temperatura (23,5 – 24,6°C), oxigênio dissolvido (5,82 – 8,55mg/L), pH (7,05 – 8,46) e salinidade (0, 10, 20 e 25‰) os quais foram mensurados com o uso de termômetro digital, oxímetro, pHmetro e refratômetro. Para acompanhar o desempenho zootécnico foram realizadas biometrias, quinzenalmente, onde todos os animais eram medidos e pesados.

Colheita das amostras de sangue

Ao final do período experimental (97^o dia), os animais foram capturados, com auxílio de um puçá e contidos, mecanicamente, com pano úmido para a colheita das amostras sanguíneas. Foi coletado uma alíquota sanguínea de 1mL de cada/animal, por venopunção caudal, com o uso de seringas estéreis de 3mL, utilizando-se agulha de 25x7. Cada seringa, continha 10µL do anticoagulante EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) 10%. Em seguida, as alíquotas eram transferidas para microtubos de polietileno de 1,5mL, mantidas sob refrigeração em isopor e, encaminhadas para o Laboratório de Pesquisa em Hematologia e Bioquímica Clínica do Hospital Veterinário da UFBA, onde foram processadas.

Determinação dos Parâmetros Hematológicos

Determinou-se a contagem de eritrócitos em câmara de Neubauer ($\times 10^6/\mu\text{L}$), após diluição 1:200 em solução Natt-Herick; o volume globular foi determinado pelo método. A concentração de hemoglobina foi determinada pelo método da cianometahemoglobina sendo as leituras feitas em espectrofotômetro. Os índices hematimétricos,

Volume Corpuscular Médio (VCM) e Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) foram calculados.

A contagem dos leucócitos total e diferencial e dos trombócitos foi realizada segundo metodologia indireta, proposta por HRUBEC e SMITH (1998) por assegurar maior grau de confiabilidade quanto à diferenciação entre os linfócitos e trombócitos. Para tanto, foram confeccionadas extensões sanguíneas coradas com May-Grunwald-Giemsa, utilizando o método sugerido por ROSENFELD (1947).

Para a realização do proteinograma inicialmente foi determinada a concentração de proteína plasmática total pela técnica da refratometria (refratômetro). As frações proteicas plasmáticas foram determinadas pela técnica de eletroforese em gel de agarose, utilizando-se kit comercial (CELMGEL - CELM[®]), segundo preconizado por NAOUM (1990). Utilizou-se 0,4 µL do plasma no filme de agarose. Os filmes foram corados com amido Black à 0,1% e depois clareados com solução de ácido acético à 5%. Após a secagem, os mesmos foram escaneados para determinação dos valores absolutos e relativos das frações de pré-albumina, albumina, alfa 1, alfa 2, beta e gamaglobulina.

Análise Quantitativa e Morfométrica das células de cloreto

Após a colheita sanguínea, os 60 animais foram anestesiados e, em seguida eutanasiados, por meio de secção medular. As brânquias, do lado direito de cada animal, foram retiradas e colocadas em recipientes contendo solução fixadora de formol neutro à 10% tamponado por um período de 48 horas e encaminhados para o laboratório de Patologia do Hospital de Medicina Veterinária da UFBA. Depois desse período as amostras foram submersas em solução de ácido fórmico à 10% por 72 horas para descalcificação (PROPHET et al., 1992).

Após todo o processamento de desidratação e descalcificação, as brânquias foram incluídas em parafina e, em seguida, com auxílio de micrótomo foram obtidos secções de 4µm de espessura e corados em azul de alcian e eosina para obtenção de contraste. Posteriormente as lâminas foram

analisadas em microscopia de luz (POWELL *et al.*, 2001).

Imagens contendo três filamentos branquiais íntegros, de cada animal, foram capturadas por meio de microfotografia. De cada campo capturado, o número de células de cloreto foi quantificado e suas respectivas áreas determinadas. Medidas em μm^2 foram demarcadas por meio do programa analisador de imagens (Bel Microimage Analyser 2.3).

Analises Estatística

Os dados obtidos foram submetidos ao programa Statistical Package for Social Sciences - SPSS. Foi feita análise de variância (ANOVA) e, em seguida, aplicou-se o teste de Mann-Whitney para análise de amostras não paramétricas. O limite de confiabilidade foi de 95%.

Parâmetros	T1 (0‰)	T2 (10‰)	T3 (20‰)	T4 (25‰)
pH	7,79 ± 0,27	7,65 ± 0,35	7,54 ± 0,37	7,53 ± 0,25
Oxigênio Dissolvido (mg/L)	6,52 ± 0,54	7,67 ± 0,85	7,15 ± 0,71	6,71 ± 0,60
Temperatura (°C)	24,2 ± 0,18	24,0 ± 0,25	24,2 ± 0,21	24,1 ± 0,21

Tabela 1: Média e desvio padrão dos parâmetros de qualidade de água dos diferentes níveis de salinidade, onde T1=controle; T2= 10‰; T3= 20‰ e T4= 25‰.

RESULTADOS

No decorrer do período experimental, os valores das variáveis dos parâmetros físicos e químicos da água utilizada nos tratamentos não diferiram significativamente ($p < 0,05$). As médias registradas de pH, oxigênio dissolvido e temperatura estão apresentados na tabela 1:

Todos os parâmetros analisados mantiveram-se dentro dos valores recomendados para o bom desempenho da espécie (KUBITZA, 2003; ARANA, 2004) e a salinidade era corrigida, diariamente, e mantida dentro dos limites

estabelecidos para cada tratamento. Os níveis de salinidade praticados nesse experimento foram semelhantes ao que é, comumente, encontrado nos ambientes estuarinos.

O ganho de peso médio variou de 68,3g a 79,2g não tendo sido observado efeito significativo das diferentes salinidades sobre ele, assim como a taxa de sobrevivência não foi afetada. Os valores médios de ganho de peso e de comprimento, além da sobrevivência em cada tratamento foram apresentados na Tabela 2.

Parâmetros	T1 (0‰)	T2 (10‰)	T3 (20‰)	T4 (25‰)
PI (g)	11,8 ± 6,0	10,7 ± 5,2	7,8 ± 4,5	8,4 ± 4,9
PF (g)	80,1 ± 20,6	86,2 ± 24,8	81,8 ± 24,5	87,6 ± 24,1
GP (g)	68,3 ± 14,6	75,5 ± 19,6	74,0 ± 20,0	79,2 ± 19,2
CI (cm)	8,5 ± 1,6	8,2 ± 1,8	7,4 ± 1,6	7,6 ± 1,6
CF (cm)	16,8 ± 2,0	17,5 ± 1,7	17,0 ± 1,8	17,4 ± 1,7
GC (cm)	8,3 ± 0,4	9,3 ± 0,3	9,6 ± 0,2	9,8 ± 0,1

PS (%)	100%	100%	100%	100%
--------	------	------	------	------

Tabela 2: Média e desvio padrão do peso inicial (PI), peso final (PF), ganho de peso (GP), comprimento inicial (CI) e comprimento final (CF), ganho de comprimento (GC) e percentual de sobrevivência (%) de tilápia do Nilo submetida a diferentes níveis de salinidade, onde T1=controle; T2=10‰; T3=20‰ e T4=25‰. (n=144).

Ausência de letras = não significativo de acordo com o teste de Mann-Whitney (P<0,05).

Os valores da mediana da concentração de hemoglobina aumentaram significativamente (P<0,05) em todos os tratamentos. Quanto maior o nível de salinidade maior era a concentração de hemoglobina. De forma inversa, os valores da mediana dos números de eritrócitos reduziram conforme os níveis de salinidade aumentavam, contudo entre os tratamentos de 10‰ e 20‰ os valores não apresentaram diferença significativa. O volume globular, embora não significativo, apresentou valores de mediana elevados nos peixes mantidos nos tratamentos com níveis de 10‰ e 20‰. No entanto, os peixes mantidos no tratamento com o maior nível de salinidade, de 25‰, apresentaram valores de mediana do volume globular foram inferiores aos demais tratamentos com água salgada, porém superior ao tratamento a 0‰ (controle).

Os valores de VCM mostraram alterações nos peixes dos tratamentos 20‰ e 25‰,

apresentando aumento significativo em relação aos demais. No entanto, não houve diferença significativa entre os dois. Os valores de HCM foram semelhantes entre os peixes dos tratamentos controle (0‰) e 10‰, porém os dos tratamentos de 20‰ e 25‰ foram significativamente maiores, mas não apresentaram diferenças entre si. Já, os valores de CHCM foram maiores em todos os peixes dos tratamentos com água salgada, e não apresentaram diferença apenas dos tratamentos de 20‰ e 25‰.

As proteínas totais demonstraram aumento significativo em todos os tratamentos com água salgada, sendo que, apesar de não haver diferença entre os tratamentos com salinidade, os valores de mediana foram maiores nos peixes do tratamento de 10‰ (tabela 3).

Parâmetros	T1(0‰)	T2 (10‰)	T3 (20‰)	T4 (25‰)
	Mediana (v.max - v.min)	Mediana (v.max - v.min)	Mediana (v.max - v.min)	Mediana (v.max - v.min)
RBC ($\times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$)	1,9 (3,9 - 2,8) ^a	1,7 (5,8 - 2,2) ^b	1,5 (6,6 - 1,9) ^b	1,1 (4,6 - 3,6) ^c
VG (%)	39,0 (69,0 - 25,0) ^a	42,0 (75,0 - 34,0) ^a	42,0 (61,0 - 36,0) ^a	40,0 (57,0 - 28,0) ^a
Hb (g/dL ⁻¹)	10,2 (67,3 - 7,4) ^a	16,9 (23,5 - 9,5) ^b	18,6 (54,5 - 13,3) ^c	19,2 (60,7 - 13,1) ^d
VCM (fL/ μL^{-1})	2,1 (10,2 - 1,0) ^a	2,4 (11,9 - 1,6) ^a	2,9 (6,1 - 2,0) ^b	3,3 (8,0 - 1,0) ^b
HCM (g/dL ⁻¹)	0,5 (3,8 - 0,3) ^a	0,9 (2,7 - 0,4) ^a	1,4 (3,1 - 0,9) ^b	1,7 (5,4 - 0,5) ^b

Tabela 3: Eritrograma (Mediana, Máximos e Mínimos) de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) submetidas à diferentes níveis de salinidade, onde T1=controle; T2=10‰; T3=20‰ e T4=25‰. RBC=eritrócitos; VG = volume globular; Hb = hemoglobina; VCM = volume corpuscular médio; HCM = hemoglobina corpuscular média; CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média. (n=144).

Letras diferentes entre os tratamentos são estatisticamente diferentes de acordo com o teste de Mann-Whitney (P<0,05).

CHCM (g/dL ⁻¹)	29,9 (192,0 - 14,2) ^a	35,8 (58,9 - 14,8) ^b	46,1 (126,7 - 29,3) ^c	48,6 (175,3 - 31,5) ^c
PPT (mg/dL ⁻¹)	5,4 (7,8 - 4,3) ^a	6,5 (7,7 - 5,6) ^b	6,3 (7,1 - 5,2) ^b	6,3 (7,2 - 5,2) ^b

O número total de leucócitos não apresentou diferença entre os peixes dos tratamentos controle, 10‰ e 20‰, no entanto, nos dos tratamentos 25‰ houve redução significativa influenciada pela redução dos linfócitos neste mesmo tratamento (linfopenia). O número de neutrófilos aumentou em relação ao controle, mas não houve diferença significativa entre os tratamentos. Os monócitos

também não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos.

Os trombócitos aumentaram consideravelmente nos peixes do tratamento 10‰, reduziram no tratamento 20‰ e voltaram a aumentar no tratamento 25‰. Entretanto, pela análise estatística verificou-se que não houve diferença significativa (tabela 4).

Tabela 4: Leucograma e trombograma (Mediana, Máximos e Mínimos) de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) submetidas a diferentes níveis de salinidade, onde T1=controle; T2=10‰; T3=20‰ e T4=25‰. Trom. = trombócitos; LT = Leucócitos Totais; Lf = Linfócitos; Nt = neutrófilos; Mn = monócitos; Es= eosinófilos; Bs = basófilos (n = 144).

Parâmetros (g/dL)	T1 (0‰)	T2 (10‰)	T3 (20‰)	T4 (25‰)
	Mediana (máx - min)	Mediana (máx - min)	Mediana (máx - min)	Mediana (máx - min)
Proteínas totais	5,4 (7,8 - 4,3) ^a	6,5 (7,7 - 5,6) ^b	6,3 (7,1 - 5,2) ^b	6,3 (7,2 - 5,2) ^b
pre-albumina	0,5 (0,7 - 0,4) ^a	0,9 (1,0 - 0,7) ^b	0,3 (0,9 - 0,2) ^a	0,2 (0,4 - 0,1) ^c
albumina	0,7 (0,8 - 0,5) ^a	0,6 (1,0 - 0,5) ^a	0,9 (1,0 - 0,6) ^a	0,7 (1,1 - 0,5) ^a
α1 - globulina	0,5 (0,6 - 0,4) ^a	0,6 (0,9 - 0,4) ^a	0,6 (0,7 - 0,6) ^a	0,9 (1,0 - 0,7) ^b
α2 - globulina	1,0 (1,2 - 0,6) ^a	1,1 (1,3 - 1,0) ^a	1,0 (1,7 - 1,0) ^a	1,2 (1,4 - 1,0) ^a
β- globulina	1,4 (1,6 - 1,2) ^a	1,2 (1,4 - 1,2) ^a	2,2 (2,6 - 2,1) ^b	2,1 (2,5 - 1,6) ^b
γ- globulina	1,1 (1,2 - 0,9) ^a	1,6 (2,3 - 1,6) ^b	1,0 (1,2 - 0,9) ^a	1,1 (1,2 - 0,9) ^a

Letras diferentes entre os tratamentos são estatisticamente diferentes de acordo com o teste de Mann-Whitney (P<0,05).

Quanto à análise do perfil eletroforético das proteínas das tilápias foi possível identificar seis frações, que foram enumeradas em ordem decrescente, pré-albumina, albumina, α1-globulina, α2-globulina, β-globulina e γ-globulina. As frações de pré-albumina apresentaram um aumento significativo no tratamento de 10‰, no entanto, essas frações apresentaram redução no tratamento de 25‰. A

albumina e a fração α2-globulina não apresentaram diferença entre os tratamentos. Já a fração α1-globulina apresentou aumento significativo no tratamento de 25‰. A fração beta apresentou aumento nos tratamentos de 20‰ e 25‰. E, a fração gama apresentou aumento apenas no tratamento de 10‰. Os resultados estão apresentados na tabela 5. A caracterização das bandas das frações proteicas pode ser observada na figura 3.

Tabela 5: Perfil eletroforético (Mediana, Máximos e Mínimos) das frações de pré-albumina (I), albumina (II), alfa 1 (III), alfa 2 (IV), beta (V) e gama (VI) globulinas de tilápias do Nilo tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) submetidas à diferentes níveis de salinidade, onde T1=controle; T2=10‰; T3=20‰ e T4=25‰ (n = 20).

Parâmetros (g/dL)	T1 (0‰) Mediana (máx - min)	T2 (10‰) Mediana (máx - min)	T3 (20‰) Mediana (máx - min)	T4 (25‰) Mediana (máx - min)
Proteínas totais	5,4 (7,8 - 4,3) ^a	6,5 (7,7 - 5,6) ^b	6,3 (7,1 - 5,2) ^b	6,3 (7,2 - 5,2) ^b
pre-albumina	0,5 (0,7 - 0,4) ^a	0,9 (1,0 - 0,7) ^b	0,3 (0,9 - 0,2) ^a	0,2 (0,4 - 0,1) ^c
albumina	0,7 (0,8 - 0,5) ^a	0,6 (1,0 - 0,5) ^a	0,9 (1,0 - 0,6) ^a	0,7 (1,1 - 0,5) ^a
α1 - globulina	0,5 (0,6 - 0,4) ^a	0,6 (0,9 - 0,4) ^a	0,6 (0,7 - 0,6) ^a	0,9 (1,0 - 0,7) ^b
α2 - globulina	1,0 (1,2 - 0,6) ^a	1,1 (1,3 - 1,0) ^a	1,0 (1,7 - 1,0) ^a	1,2 (1,4 - 1,0) ^a
β- globulina	1,4 (1,6 - 1,2) ^a	1,2 (1,4 - 1,2) ^a	2,2 (2,6 - 2,1) ^b	2,1 (2,5 - 1,6) ^b
γ- globulina	1,1 (1,2 - 0,9) ^a	1,6 (2,3 - 1,6) ^b	1,0 (1,2 - 0,9) ^a	1,1 (1,2 - 0,9) ^a

Letras diferentes entre os tratamentos são estatisticamente diferentes de acordo com o teste de Mann-Whitney ($P < 0,05$).

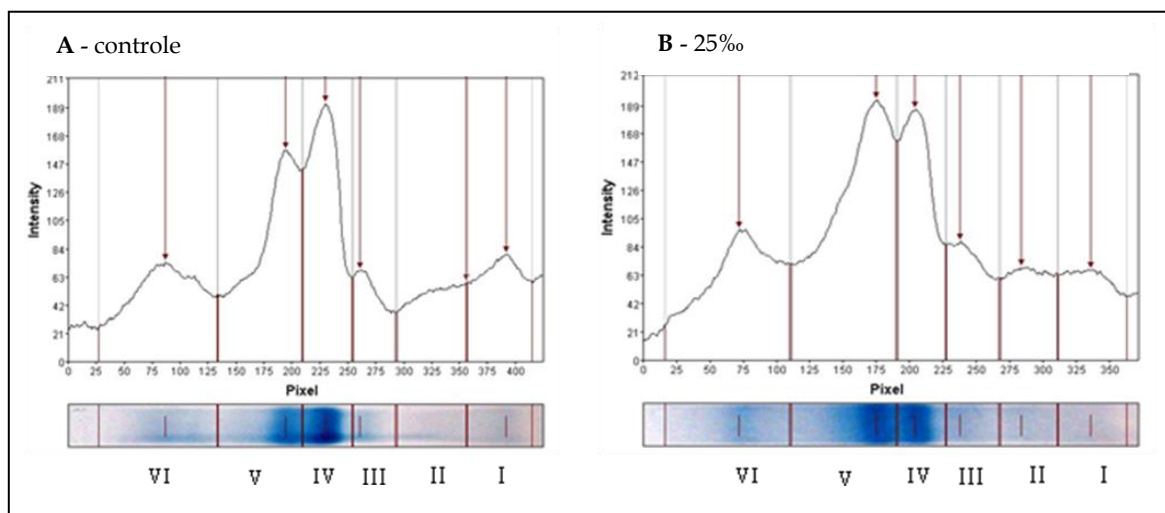
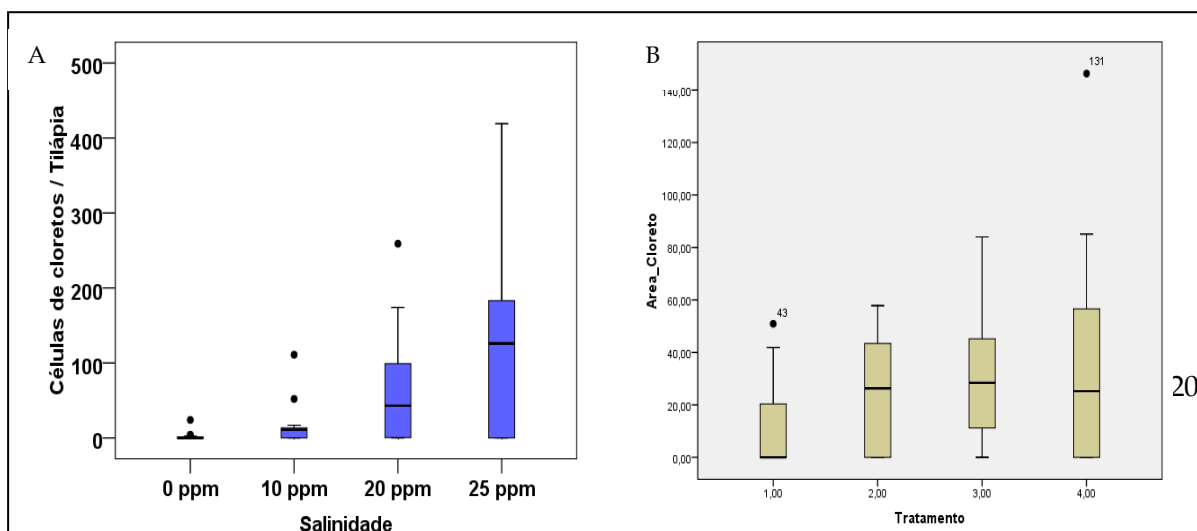


Figura 3 - Perfil eletroforético das frações de pré-albumina (I), albumina (II), alfa 1 (III), alfa 2 (IV), beta (V) e gama (VI) globulinas de tilápias do Nilo em diferentes níveis de salinidade: T1 = controle (0‰), T2 (10‰), T3 (20‰) e T4 (25‰) n=60

Em relação às análises quantitativas das células de cloreto verificou-se relação direta entre o número de células e o aumento nos níveis de salinidade ($p < 0,05$), visto que o número delas era maior nos peixes dos tratamentos com salinidade

alta, de 20‰ e 25‰. No entanto, o mesmo resultado não foi observado quanto ao aumento na área dessas células, conforme apresentado na figura 4.



Figuras 4 A, B - Número de células de cloreto e a área das células em brânquias de tilápias do Nilo em diferentes níveis de salinidade: T1 = controle (0‰), T2 (10‰), T3 (20‰) e T4 (25‰) n=60

Os locais onde as células de cloretos foram encontradas referem-se, principalmente, à superfície dos filamentos e à posição intralamelar. No tratamento controle não houve registro de células de cloreto. No tratamento de 10‰, foram

encontradas 61 células de cloreto, no tratamento de 20‰ esse número foi significativamente maior, sendo encontradas 183 células e, no tratamento de 25‰, também houve aumento significativo contabilizando-se 484 células (figura 5).

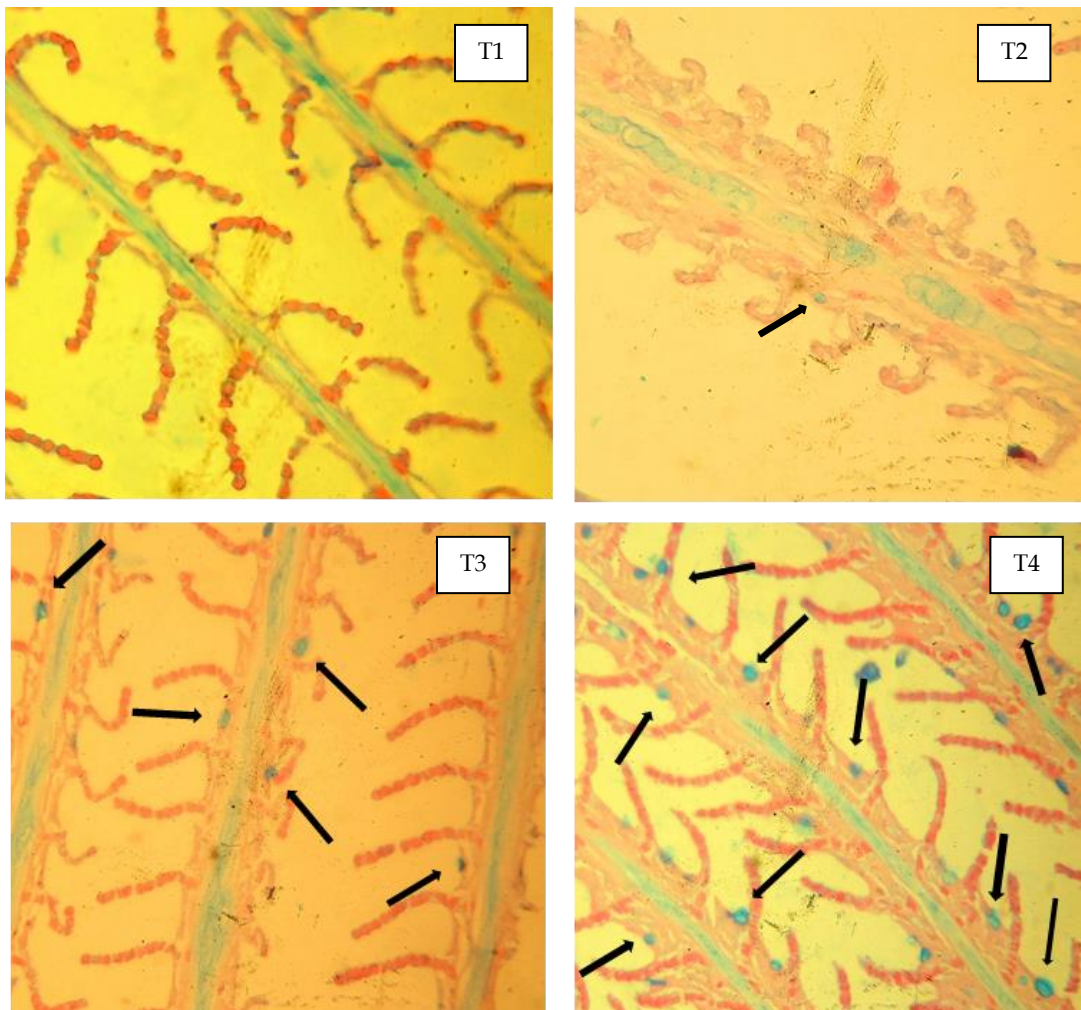


Figura 5 - Células de cloreto (setas) em brânquias de tilápias do Nilo em diferentes níveis de salinidade: T1 = controle (0‰), T2 (10‰), T3 (20‰) e T4 (25‰) n=60. Aumento de 40X.

DISCUSSÃO

Os resultados de desempenho do presente estudo demonstraram que o aumento da salinidade até 25‰ não interfere no crescimento e na sobrevivência dessa espécie, reforçando a característica de rusticidade da espécie. STICKNEY (1986) ao comparar o desempenho de tilápia do Nilo criada em água doce com as criadas em água salgada também não verificou diferença significativa entre elas. Resultado semelhante foi observado por JAMIL *et al.* (2004) ao avaliarem a resposta de crescimento de juvenis de tilápia, da espécie *O. mossambicus* criadas em diferentes níveis de salinidade, 0, 5, 10,15 e 20‰. Pode-se atribuir esses resultados à habilidade dessas espécies em adaptar-se as diferentes, conferindo-lhe a possibilidade de produção em ambientes salobro ou marinho.

Há ainda relatos que demonstram que algumas espécies de tilápia apresentam melhor desempenho de crescimento em ambiente salino do que em água doce (ALTUN e SARIHAN, 2008; IQBAL *et al.*, 2012). A habilidade das diferentes espécies de tilápias em sobreviver e crescer em águas salinas é bastante variada e diversos fatores podem ter influência, dentre eles destaca-se: a carga genética, idade, sexo, temperatura, oxigênio e pH.

A redução observada no número de eritrócitos no presente estudo também foi relatada por AKINROTIMI *et al.* (2010) após aclimatarem *T. guineensis* em salinidade de 17‰. Contudo, contrariamente a este trabalho, a taxa de hemoglobina e o volume globular também sofreram redução em razão da salinidade. Resultados semelhantes também foram observados após, juvenis e adultos de *T. guineensis*, serem aclimatados de à salinidade de 15‰ (AKINROTIMI *et al.*, 2012). Por outro lado, LEAMASTER *et al.* (1990) relataram um aumento significativo do número de eritrócitos e da concentração da hemoglobina após submeter duas espécies de tilápias, *S. melanotheron* e o híbrido tilápia vermelha, à salinidade de 32‰ pelo método gradual de aclimação.

As mudanças nas características hematológicas consideradas padrão dos peixes teleósteos pode ser resultado do estresse causado pelos altos níveis de salinidade aos quais os animais foram submetidos. O aumento de salinidade tem sido relatado por alterarem os padrões hematológicos de teleósteos (BARTON e IWAMA, 1991; YADA e NAKANISHI, 2002), seja reduzindo os níveis de alguns parâmetros sanguíneos, a exemplo do número de eritrócitos (MARTINS *et al.*, 2002) ou aumentando os valores dos componentes (MARTINS *et al.*, 2004).

A redução do número de eritrócitos pode estar relacionada com a fragilidade celular resultante do processo de osmolaridade, em que a célula perde água para o meio e, em contrapartida, ganha uma quantidade excessiva de sais (EMELIKE *et al.*, 2008). Em *Colossoma macropomum* aclimatado em água com 2000mg/L⁻¹ de NaCl ocorreu redução da concentração de hemoglobina e do número de eritrócitos, sugerindo que a diminuição desses dois parâmetros ocorre quando a osmolaridade plasmática aumenta (MARUYAMAL e VAL, 1998).

Já o aumento na concentração de hemoglobina pode estar relacionado com a maior demanda do consumo de oxigênio. O aumento da salinidade diminui a solubilidade do oxigênio na água, provocando uma resposta compensatória dos animais, no intuito de minimizar os impactos sobre o transporte de oxigênio (BRAUNER *et al.*, 2002; JERSEN *et al.*, 2002). FARGHALY *et al.* (1973) também observaram aumento nos níveis de hemoglobina de *Tilapia zilli* submetidas às variações de salinidade entre 20 a 25‰.

As alterações de salinidade não tiveram influência sobre o volume globular e resultado semelhante foi relatado em outros estudos (VERDEGEM *et al.*, 1997; KARSİ e YILDIZ, 2005) em híbrido de tilápia vermelha e de tilápia do Nilo, respectivamente.

Sabe-se que quando peixes são submetidos ao estresse crônico, como por exemplo, agentes

infecciosos, contaminantes ou variações de pH e de salinidade manifestam linfopenia (DAVIS et al., 2008; CAZENAVE et al., 2009). Segundo FAZIO et al. (2013) a resposta hematológica de *Mugil cephalus* foi afetada no número de leucócitos totais, que apresentou redução significativa após serem mantidos em ambiente salino. Esse mesmo resultado foi encontrado neste trabalho.

FARGHALY et al. (1973) após submeterem a *Tilapia zilli* à diferentes salinidades, perceberam um decréscimo nos valores dos leucócitos totais à medida que a salinidade aumentava. Já AKINROTIMI et al. (2012) obtiveram respostas contrárias da *Tilapia guineensis*, com os valores dos monócitos e neutrófilos aumentados significativamente após exposição à salinidade de 10‰ e 15‰.

De acordo com RANZANI-PAIVA et al. (2004) o estresse, em peixes, é capaz de causar aumento nos níveis séricos de proteínas, uma vez que esta sofre alteração, principalmente, por mudanças no volume plasmático que por sua vez, ocorre em consequência do desequilíbrio osmótico. O aumento das proteínas totais em razão da salinidade ocorre para manter a função de osmorregulação do sangue (FARGHALY et al., 1973). Semelhante ao presente trabalho LEAMASTER et al. (1990) observaram níveis séricos de proteína total maiores tilápias expostas à água salgada, do que nas criadas em água doce. Essas modificações podem ser vistas como fatores de adaptação ao aumento gradativo da salinidade (FARGHALY et al., 1973).

Os resultados da presente pesquisa sugerem que o aumento da salinidade pode ter, inicialmente, provocado desidratação em consequência da perda de água para o meio ambiente, levando a maior concentração dos níveis de proteína totais dos animais expostos à salinidade. No entanto, observou-se que os tratamentos de salinidade entre 10 e 25‰ não apresentaram diferença, demonstrando aparente estabilidade nos níveis proteicos. Tal fato pode estar relacionado à resposta adaptativa da tilápia à salinidade, que foi realizada de forma gradual.

As proteínas séricas podem refletir o nível metabólico do organismo e sua adaptação às flutuações ambientais (ZOWAIL et al., 1994).

Contudo, a interpretação do teor de proteínas totais deve ser associada à avaliação das proteínas fracionadas, visto que anormalidades na concentração de albumina ou globulinas podem alterar o valor total de proteínas (THRALL, 2006).

A pré-albumina é uma macro fração proteica, cujos níveis séricos são deprimidos em resposta a um processo inflamatório ou uma infecção (MORGADO et al., 2007). A fração α 1-globulina teve seus valores aumentados nos peixes do tratamento com salinidade de 25‰. Segundo THRALL (2006) o aumento no teor de α -globulinas é inespecífico e de importância diagnóstica limitada, a inflamação aguda é a causa mais comum. Esta fração, em geral, tem seus valores aumentados nos processos inflamatórios, infecciosos e imunes (LASON, 1974).

As frações β e γ estão associadas à doença crônica (GICKING et al., 2004) e relacionados a quadros inflamatórios (THRALL et al., 2006). Segundo LABARRERE (2011) a concentração das gamaglobulinas pode aumentar em respostas imunológicas, porém o quadro de estresse pode ser caracterizado pela sua diminuição. O conhecimento das características hematológicas é ferramenta fundamental para a discussão sobre a resposta ao estresse e a reação inflamatória (MARTINS et al., 2004). Entretanto, outros parâmetros fisiológicos também podem ser utilizados para avaliar essa resposta. GUNER et al. (2004) observaram redução do número das células de cloreto de tilápia do Nilo e aumento da sua área em relação ao aumento da salinidade. Porém, esse aumento só foi observado até 20‰ no presente estudo. A partir desse valor o tamanho dessas células começou a decrescer. CIONI et al. (1991) observaram que o número de células de cloreto de *Oreochromis niloticus* e *O. mossambicus* não aumentou em número por causa da aclimação em água salgada, mas aumentou em área.

Estudos revelam que a densidade das células de cloreto aumenta, em determinadas espécies de teleosteos, após exposição à altas salinidades (FOSKETT et al., 1981).

Segundo BALDISSEROTO (2009), durante a adaptação de peixes eurihalinos à água do mar, é

possível observar aumento no número e no tamanho das células de cloreto.

Uma resposta adaptativa está relacionada com a mudança no epitélio branquial, incluindo a proliferação e a hipertrofia de células de cloreto quando os peixes são estimulados em ambiente salino (UTIDA *et al.*, 1971; AVELLA *et al.*, 1993).

CONCLUSÕES

Os resultados encontrados no presente trabalho demonstram que os constituintes do hemograma, o perfil eletroforético de proteínas, bem como a análise quantitativa de células de cloreto branquiais podem ser utilizados como parâmetros indicadores de mecanismo de adaptação e tolerância à salinidade (ou água salgada) em tilápia do Nilo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKINROTIMI, O.A.; AGOKEI, E.O.; ARANYO, A.A. 2012 Changes in blood parameters of *Tilapia guineensis* exposed to different salinity levels. *Journal of Environmental Engineering and Technology*, 1: 4-12.
- AKINROTIMI, O.A.; UEDEME-NAA, B.; AGOKEI, E.O. 2010 Effects of acclimation on haematological parameters of *Tilapia guineensis* (Bleeker, 1862). *Science World Journal*, 5: 1-4.
- AL-AHMED, A.A. 2001 A review of tilapia culture in Kuwait. *World Aquaculture*, 32: 47-48.
- AL-AMOUNDI, M.M. 1987 Acclimation of commercially cultured *Oreochromis* species to seawater: an experimental study. *Aquaculture*, 65: 333-342.
- ALTUN, T.; SARIHAN, E. 2008 Effects of freshwater and seawater on growth, total testosterone levels and testis development of tilapias. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 5: 657-662.
- ARANA, L. V. 2004 *Princípios químicos de qualidade de água em aquicultura: uma revisão para peixes e camarões*. 2ª ed. Florianópolis. UFSC, 331p.
- AVELLA, M.; BERHAUT, J.; BORNANCIN, M. 1993 Salinity tolerance of two tropical fishes, *Oreochromis aureus* and *O. niloticus*. I. Biochemical and morphological changes in the gill epithelium. *Journal of Fish Biology*, 42: 243-254.
- BALDISSEROTO, B. 2009 *Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura*. 2ª ed. Santa Maria. UFSM, p. 349.
- BARBIERI, E.; BONDIOLI, A. C. V. 2013 Acute toxicity of ammonia in Pacu fish (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) at different temperatures levels. *Aquaculture Research*, 46(3):565-571.
- BARTON, B.A.; IWAMA, G.K. 1991 Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Review of Fish Diseases*, 1: 3-26.
- BRAUNER, C.J.; WANG, T.; JENSEN, F.B. 2002 Influence of hyperosmotic shrinkage and β -adrenergic stimulation on red blood cell volume regulation and oxygen binding properties in rainbow trout and carp. *Journal of Comparative Physiology*, 172: 251-262.
- CAZENAVE, J.; BACCHETTA, C.; PARMA, M.J.; SCARABOTTI, P.A.; WUNDERLIN, D.A. 2009 Multiple biomarkers responses in *Prochilodus lineatus* allowed assessing changes in the water quality of Salado River basin (Santa Fe, Argentina). *Environmental Pollution*, 157: 3025-3033.
- CHEESBROUGH, M. 2005 *Distinct Laboratory Practice in Tropical Countries*. 2ª ed. United Kingdom, Cambridge University Press. 434p.
- CHERVINSKI, J.; HERING, E. 1973 *Tilapia zillii* (Gervais) (Pices, Cichlidae) and its adaptability to various saline conditions. *Aquaculture*, 2: 23-29.
- CIONI, C.; MERCH, C.; CATALDI, E.; CATAUDELLA, S. 1991 Fine structure of chloride cells in freshwater and seawater adapted *Oreochromis mossambicus* (Peters). *Journal of Fish Biology*, 39: 197-209.
- DAVIS, A.K.; MANEY, D.L.; MAERZ, J.C. 2008 The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. *Functional Ecology*, 22: 760-772.
- EMELIKE, F.O.; ODEYENUMA, C.; JEREMIAH, Z.A.; OBIGWE, B.U. 2008 The use of anti-

- coagulated and defibrinated blood samples for the evaluation of red cell osmotic fragility. *International Journal of Natural and Applied Sciences*, 4: 204-208.
- FAGHALY, A.M.; EZZAT, A. A.; SHABANA, M. B. 1973 Effects of temperature and salinity changes on the blood characteristics of *Tilapia zilli* G. in Egyptian littoral lakes. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 46: 183-193.
- FAZIO, F.; MARAFIOTI, S.; TORRE, A.; SANFILIPPO, M.; PANZERA, M.; FAGGIO, C. 2013 Haematological and serum protein profiles of *Mugil cephalus*: effect of two different habitats. *Ichthyological Research*, 60: 36-42.
- FOSKETT, J.K.; LOSGDON, C.D.; TURNER, T.; MACHEN, T.E.; BERN, H.A. 1981 Differentiation of chloride extrusion mechanism during seawater adaptation of a teleost fish, the cichlid *Sarotherodon mossambicus*. *The Journal of Experimental Biology*, 93: 209-224.
- GARCÍA-ULLOA, M.; VILLA, R.L.; MARTÍNEZ, T.M. 2001 Growth and feed utilization of the tilapia hybrid *Oreochromis mossambicus* x *O. niloticus* cultured at different salinities under controlled laboratory conditions. *Journal of the World Aquaculture Society*, 32: 117-121.
- GICKING, J.C.; FOLEY, A.M.; HARR, K.E.; RASKIN, R.E.; JACOBSON, E. 2004 Plasma protein electrophoresis of the atlantic loggerhead sea turtle, *Caretta caretta*. *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*, 14: 13-18.
- GUNER, Y.; OZDEN, O.; CAGIRGAN, H.; ALTUNOK, M.; KIZAK, V. 2004 Effects of salinity on the osmoregulatory functions of the gills in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 29: 1259-1266.
- HESSE, E. F. 1960 Methods for routine on fish haematology. *The Progressive Fish Culturist*, 22: 164-171.
- HRUBEC, T.C.; SMITH, S.A. 1998 Hematology of fishes. In: WEISS, D.J.; WARDROP, K.J. *Schalm's Veterinary Hematology*. 5^a ed. Blackburg, Wiley-Blackwell. p. 1120-1125.
- IQBAL, K. J.; QURESHI, N. A.; ASHRAF, M.; REHMAN, M. H. U.; KHAN, N.; JAVID, A.; ABBAS, F.; MUSHTAQ, M. M. H.; RASOOL, F.; MAJEED, H. 2012 Effect of different salinity levels on growth and survival of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *The Journal of Animal and Plant Sciences*, 22: 919-922.
- JAMIL, K.; SHOAI, M.; AMEER, F.; HONG, L. 2004 Salinity tolerance and growth response of juvenile *Oreochromis mossambicus*. *Journal of Ocean University of China*, 3: 53-55.
- JENSEN, F.B.; LECKLIN, T.; BUSK, M.; BURY, N.R.; WILSON, R.W.; WOOD, C.M.; GROSELL, M. 2002 Physiological impact of salinity increase at organism and red blood cell levels in the European flounder (*Platichthys flesus*). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 274: 159-174.
- KARSI, A.; YILDIZ, H.Y. 2005 Secondary stress response of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, after direct transfer to different salinities. *Tarim Bilimleri Dergisi*, 11: 39-141.
- KATALOG, S.; PARLAK, H. 2004 The effects of pollution on haematological parameters of Black goby in foca and aliaga boys. *E.U. Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 21: 113-117.
- KUBITZA, F. 2003 Qualidade da água no cultivo de peixes e camarões. 1^a ed. Jundiaí: Acqua Supre. 229p.
- LABARRERE, C.R. 2011 Perfil sanguíneo de híbridos de surubim (*Pseudoplatystoma reticulatum* X *P. coruscans*) criados em diferentes densidades de estocagem. Belo Horizonte. 62p. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais). <<http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/handle/1843/106>> Acesso em 04 jun. 2013.
- LARSON, P.H. 1974 Serum proteins diagnostic significance of electrophoretic patterns. *Human Pathology*, 5: 629-640.
- LEAMASTER, B.R.; BROCK, J.A.; FUJIOKA, R.S.; NAKAMURA, R.M. 1990 Hematologic and blood chemistry values for *Sarotherodon melanotheron* and a red hybrid tilapia in freshwater and seawater. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 97: 525-529.
- MARTINS, M.L.; MORAES, F.R.; FUJIMOTO, R.Y.; NOMURA, D.T.; FENERICK, J. 2002 Respostas do híbrido tambacu (*Piaractus mesopotamicus*

- Holmberg, 1887 macho x *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818 fêmea) a estímulos simples ou consecutivos de captura. *Boletim Instituto de Pesca*, 28: 195-204.
- MARTINS, M.L.; PILARSKY, F.; ONAKA, E.M.; NOMURA, D.T.; FENERICK, JR. J.; RIBEIRO, K.; YIAZAKI, D.M.Y.; CASTRO, M.P.; MALHEIROS, E.B. 2004 Hematologia e resposta inflamatória aguda em *Oreochromis niloticus* (Osteichthyes: Cichlidae) submetida aos estímulos único e consecutivo de estresse de captura. *Boletim Instituto de Pesca*, 30: 71-80.
- MARUYAMAL, K.R.; VAL, A.L. 1998 Efeito da salinidade sobre a homeostase iônica e parâmetros hematológicos de *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOLOGIA, 22., CBZ 1998, Recife. *Anais...* Recife: SBZ.
- MCCORNICK, S.D. Endocrine control of osmoregulation in teleost fish. 2001 *American Zoologist*, 41: 781-794.
- MORGADO, I.; SANTOS, C.R.A.; JACINTO, R.; POWER, D.M. 2007 Regulation of transthyretin by thyroid hormones in fish. *General and Comparative Endocrinology*, 152: 189-197.
- MUSA, S. O.; OMOREGIE, E. 1999 Haematological changes in the mud fish *Clarias gariepinus* exposed to malachite green. *Journal of Aquatic Sciences*, 14: 37 - 47.
- NAOUM, P.C. 1990 Eletroforese - técnicas e diagnóstico. 2ª ed. São Paulo. Santos. 154p.
- OKECHUKWU, E. O.; ANSA, J.; BALOGUN, J. K. 2007 Effects of acute nominal doses of chlorpyrifos-ethyl on some haematological indices of African catfish *Clarias gariepinus* *Journal of Fisheries International*, 2: 190 - 194.
- PITOMBEIRA, M.S.; MARTINS, J.M. 1966 A direct method for while blood cell count in fishes. *Arquivos da Estação de Biologia Marinha da Universidade Federal do Ceará*, 6: 605.
- POWELL, M.D.; PARSONS, H.J.; NOWAY, B.F. 2001 Physiological effects of freshwater bathing of Atlantic salmon (*Salmo salar*) as a treatment for amoebic gill disease. *Aquaculture*, 199: 259-266.
- PROPHET, E.B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J.B.; SOBIN, L.H. 1992 *Laboratory Methods in Histotechnology*. 3ª ed. Washington, DC. Armed Force Registry of Pathology, 279p.
- RAZANI-PAIVA, M.J.T.; ISHIKAWA, C.M.; EIRAS, A.C.; SILVEIRA, V.R. 2004 Effects of an experimental challenge with *Mycobacterium marinum* on the blood parameters of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1757). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 47: 945-953.
- ROSENFELD, G. 1947 Método rápido de coloração de esfregaços de sangue. Noções práticas sobre corantes pancreáticos e estudos de diversos fatores. *Memórias de Instituto Butantã*, 20: 315-328.
- SCHUTT, D.A.; LEHMANN, J.; GUERLICH, R.; HAMERS, R. 1997 Haematology of swondtail xiphophorus helleri 1: Blood parameters and light microscopy of blood cells. *Journal Applied Ichthyology*, 13: 83-89.
- STICKNEY, R.R. Tilapia tolerance of saline waters: a review. 1986 *Progressive Fish Culturist*, 48: 161-167.
- SURESH, A.V.; LIN, C.K. 1992 Tilapia culture in saline waters: a review. *Aquaculture*, 106: 201-226.
- THRALL, M.A. 2006. Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária. 1ª ed. São Paulo. Roca, 582p.
- UTIDA, S.; KAMIYA, M.; SHIRAI, N. 1971 Relationship between the activity of Na/K activated adenosinetriphosphatase and the number of chloride cells in eel gills with special reference to seawater adaptation. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 38: 443-448.
- VERDEGEM, M.C.J.; HILBRANDS, A.D.; BOON, J.H. 1997 Influence of salinity and dietary composition on blood parameter values of hybrid red tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus) x *O. mossambicus* (Peters). *Aquaculture Research*, 28: 453-459.
- WATANABE, W.O.; KUO, C.; HUANG, M. 1985 Salinity tolerance of Nile tilapia fry

(*Oreochromis niloticus*), spawned and hatched at various salinities. *Aquaculture*, 48: 159-176.

YADA, T.; NAKANISHI, T. 2002 Interaction between endocrine and immune system in fish. *International Journal of Review in Cytology*, 220: 35-92.

ZOWAIL, M.E.M.; EL - DEEB, S.I.; EL - SERAFY, S.S.; RIZKALLA, E.H.; EL-SAIED, H. 1994 Biochemical genetic studies of serum properties of family Mugillidae in two different habitats of Egyptian water. *Bulletin National Institute Oceanography Fish Egypt*, 20: 175-190.