

# Respuesta del *Piaractus mesopotamicus* a estímulos de persecución e hipoxia

## *Piaractus mesopotamicus* response to persecution stimulus and hypoxia

Wilson Gómez-Manrique<sup>\*1</sup>, Haluko Massago<sup>2</sup>, Daniel Jordan de Abreu Santos<sup>3</sup>, Elizabeth Criscuolo- Urbinati<sup>4</sup>

<sup>1</sup>\*MVZ; MSc, PhD © Universidad del Estado de São Paulo, Campus de Jaboticabal, CEP. São Paulo, Brasil

<sup>2</sup>Ingeniera de Pesca; MSc, PhD ©, Universidad del Estado de São Paulo, Jaboticabal SP, Brasil

<sup>3</sup>MV, MSc © Universidad del Estado de São Paulo, Jaboticabal, SP, Brasil

<sup>4</sup>PhD Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista (CAUNESP). Jaboticabal, SP, Brasil

Recibido: Agosto 01 de 2008. Aceptado: Junio 10 de 2009

### RESUMEN

Las respuestas al estrés agudo en el pacu (*Piaractus mesopotamicus*) fueron determinados con relación a la respuesta fisiológica de adaptación en diferentes tiempos de muestreo sanguíneo. El delineamiento experimental fué enteramente casualizado con 4 tratamientos, 6 y seis para los diferentes tiempos (T15, T30 y T120) sometidos al estrés y el grupo control (T0) sin estrés. Fueron utilizados 24 ejemplares con peso de  $250 \pm 2,0$  g distribuidos aleatoriamente en 8 acuarios de 40 L cada uno (3 peces/acuario). Se determinaron los niveles séricos de glucosa (Glu), cloruro (Clo), proteínas totales (Pro) como parámetros hematológicos. También se evaluó el conteo de células rojas (RCB), hematócrito (Hto), volumen corpuscular medio (VCM) y hemoglobina (Hb). Después de producir el estrés la glucosa plasmática aumentó significativamente de 76,4 (T0) para 151,2 mg/dL (T120), como respuesta a la distribución energética; para el cloruro hubo una reducción a los 120 min debido a la vasodilatación y pérdida de electrolitos hacia el medio externo. Los parámetros sanguíneos presentaron aumento inicial con posterior disminución, sin embargo, no hubo diferencia significativa con respecto al grupo control. El estudio mostró que para el tiempo máximo de muestreo (T120) el pacu presentó tendencia a la homeostasis.

**Palabras-clave:** estrés, glucosa, hematología, ión, pez, sangre.

### ABSTRACT

Responses to acute stress in pacu (*Piaractus mesopotamicus* - a flat-nosed fish from the Paraguay-Paraná River basin) were determined regarding physiological response to adaptation at different blood-sampling times. Experimental design was completely randomised, having 4 treatments 6 x 6 for different times (T15, T30 and T120) and 3 repetitions for control without stress (C). Twenty-one fish weighing  $250 \pm 2.0$  g each (3

fish/aquarium) were used which were randomly distributed in eight 40 L aquariums. Serum glucose (Glu), chloride (Clo) and total proteins (Pro) were evaluated as haematological parameters. Red blood cell (RBC) count, haematocrite (Hto), mean corpuscular volume (MCV) and haemoglobin (Hb) levels were also evaluated. After stress had been produced, plasma glucose significantly increased from 76.41 to 151.22 mg/dL as a response to energy distribution. Chloride response was reduced to 120 min due to the vasodilatation and electrolyte loss to the environment. Blood parameters presented an initial increase followed by later reduction; however, there were no significant difference regarding control. The study showed that pacu presented a tendency to homeostasis for maximum sampling time.

**Key words:** blood, fish, glucose, haematology, ion, stress.

## INTRODUCCIÓN

La acuicultura industrial que maneja grandes poblaciones de organismos en espacios reducidos han traído consigo la necesidad de estudiar el efecto que estas densidades provocan en los peces, ya que las tasas de crecimiento, índices de fertilidad, incidencia y frecuencia de enfermedades, están determinadas por la respuesta de los organismos al síndrome general de adaptación o estrés (Ocampo, 1999).

En teleósteos el síndrome general de adaptación está caracterizado por la liberación inmediata de catecolaminas y cortisol; ambas hormonas se refieren a la redistribución de la energía para las actividades anabólicas como crecimiento y reproducción para restaurar la homeostasis (Wendelaar Bonga, 1997; Barton, 2000; Fernandes-de-Castilho et al., 2008). Los efectos de la respuesta del estrés son divididos en, primarios con el aumento de cortisol, adrenalina y noradrenalina en el plasma sanguíneo (Schreck, 1981), secundarios con efectos metabólicos provocados por los primarios, como las alteraciones de la glucosa, acumulo de ácido láctico muscular, de glucógeno hepático y muscular, alteraciones en el hematócrito, relacionadas al proceso del aumento en el transporte de oxígeno causada por el estrés (Gilmour, 1997) así como el número de linfocitos, disminuyendo la actividad inmune (Fast, 2008), además de los efectos hidrominerales (Mommsen et al., 1999; Wendelaar Bonga, 1997), terciarios donde se pierde toda posibilidad de restaurar el equilibrio fisiológico. Estas respuestas generalmente son independientes del tipo de estresor, pero el aspecto cuantitativo de la respuesta depende de la

intensidad y duración del estímulo (Mazeaud et al., 1977).

Los peces que experimentan algún tipo de estrés responden a cambios fisiológicos que comienzan en el sistema neuroendocrino, eje hipotálamo-pituitaria-interrenal, con el aumento del nivel de cortisol en la sangre (Iwama et al., 2005), respuestas metabólicas (glucosa en la sangre), osmorregulatórias (iones y osmolaridad sanguínea) y hematológicas (hematócrito, número de eritrocitos y hemoglobina) (Mc Donald y Milligan, 1997; Wendelaar Bonga, 1997; Wojtaszek et al., 2002).

La adaptación al estrés es la redistribución energética de actividades de alta demanda, como crecimiento y reproducción para otras actividades para restaurar la homeostasis, tales como respiración, locomoción, balance hidromineral y reparación de tejidos. Tal dinámica puede reducir considerablemente la capacidad de desempeño del pez, tanto en la fase de restablecimiento frente a un estrés agudo como en el estrés crónico (Schreck, 1981; Schreck, 1990; Kebus et al., 1992; Pankhursk y Kraak, 1997; Mommsen et al., 1999).

El estudio de las características sanguíneas puede brindar información importante para el diagnóstico y pronóstico de las condiciones mórbidas en poblaciones de peces y contribuir a la comprensión de la fisiología comparativa, relación filogenética, condiciones alimenticias, entre otros parámetros ecológicos (Tavares et al., 2004). Varios factores generadores de estrés, tales como captura (Grutter

y Pankhurst, 2000; Barcellos et al., 2001; Fagundes y Urbinati, 2008; Abreu et al., 2009), transporte (Iversen et al., 1998; Carneiro y Urbinati, 2001; Urbinati et al. 2004; Fagundes y Urbinati, 2008; Gregory, 2008) y variación en el fotoperíodo e intensidad de luz (Boeuf y Le Bail, 1989; AlmazánRueda et al., 2005; Fagundes & Urbinati, 2008) son inevitables en la cría intensiva moderna de peces.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo fue desarrollado en el Laboratorio de Fisiología Animal de la Facultad de Ciencias Agrarias y Veterinarias de la UNESP, Laboratorio asociado al Centro de Acuicultura de la UNESP (CAUNESP), estado de Sao Paulo, Brasil.

Para este trabajo fueron utilizados 24 juveniles de pacu, con peso medio de  $250 \pm 2,0$  g provenientes del CAUNESP, los cuales fueron distribuidos aleatoriamente en 8 acuarios de 40 L (3 peces/acuario). Cada acuario fue provisto de aireación y calentadores de agua, siendo la temperatura controlada por termostato y mantenida para el confort térmico de esta especie ( $27,0 \pm 0,3$  °C). El pH fue de  $7,42 \pm 0,2$  (WTW® 2C10) y oxígeno disuelto de  $6,8 \pm 0,1$  mg/L (oxímetro WTW® 2A10). Los peces fueron aclimatados durante 7 días, con ayuno de 24 horas antes y durante el experimento. O delineamiento experimental fue enteramente casualizado, siendo 4 tratamientos (T0 (sin estrés), T15, T30 y T120 (estresados)) y 6 repeticiones. Cada pez fue considerando como una unidad experimental.

Los ejemplares de los tratamientos T15, T30 y T120 fueron estresados empleando la técnica de persecución con una nasa durante 1 min, seguido de captura e hipoxia por medio de exposición aérea durante 3 min y devueltos a sus respectivos acuarios, siendo muestreados en intervalos de 15 (T15), 30 (T30) y 120 (T120) min.

Para la colecta de sangre los ejemplares fueron capturados y transferidos para un recipiente con agua y benzocaína (50 mg/L) con el fin de minimizar los movimientos.

El pacu, originario de la cuenca de la Plata, posee gran interés comercial, siendo una de las especies más exploradas en la piscicultura (Oliveira et al., 2004; Urbinati y Gonçalves, 2005). Considerando su importancia, el presente trabajo tuvo como objetivo analizar la capacidad de reacción a la adaptación pos-estrés causado por la captura e hipoxia en *P. mesopotamicus*.

Se colectó aproximadamente 2,0 mL de sangre de cada ejemplar a través de punción del vaso caudal por medio del uso de jeringa. La sangre colectada fue dividida en dos *ependorfs*, el primero con 250  $\mu$ L de sangre + 15  $\mu$ L EDTA (Glistab®) con la finalidad de realizar el análisis hematológico y de glucosa (King y Garner, 1947), y el segundo con 750  $\mu$ L destinado para el análisis de proteínas totales y cloruro.

Los parámetros hematológicos analizados fueron: hematócrito (Hto %) por la técnica de micro-hematócrito (EC MB Centrifuge) a 5000 rpm x 5 min, RCB ( $106\text{mm}^3$ ), VCM ( $\mu^3$ ) y Hb (g/dL) mediante el uso del contador de células sanguíneas modelo Cel M DA 500, empleando adicionalmente la solución Celmlise para la lectura de Hb.

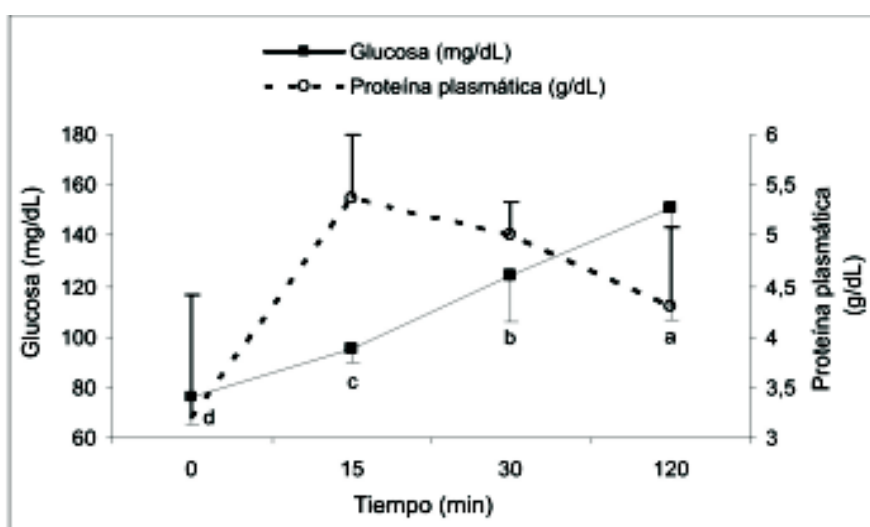
Para el análisis de glucosa, la sangre colectada fué refrigerada y posteriormente centrifugada dos veces a 4 oC y 3000 rpm durante 3 min (model. ALC - PK12R), para determinar la glucosa se empleó el kit Glucosa PAP de Labtest®, con lectura en el espectrofotómetro a 505 nm (Metrolab 1700). Para el análisis de proteínas totales y cloruro, la sangre fue mantenida a temperatura ambiente por aproximadamente dos horas, luego se centrifugó a una temperatura de 4 oC y 3000 rpm durante 3 min (modelo ALC - PK12R). Para la lectura de cloruro se empleó el kid Labtest Diagnóstica S.A, MG, Brasil, para posterior lectura en el espectrofotómetro (Metrolab 1700) a 470 y 545 nm, respectivamente.

Los resultados fueron sometidos a análisis de varianza (ANOVA); cuando se observó diferencia significativa entre tratamientos ( $p < 0,05$ ) se sometió al Test de Tukey.

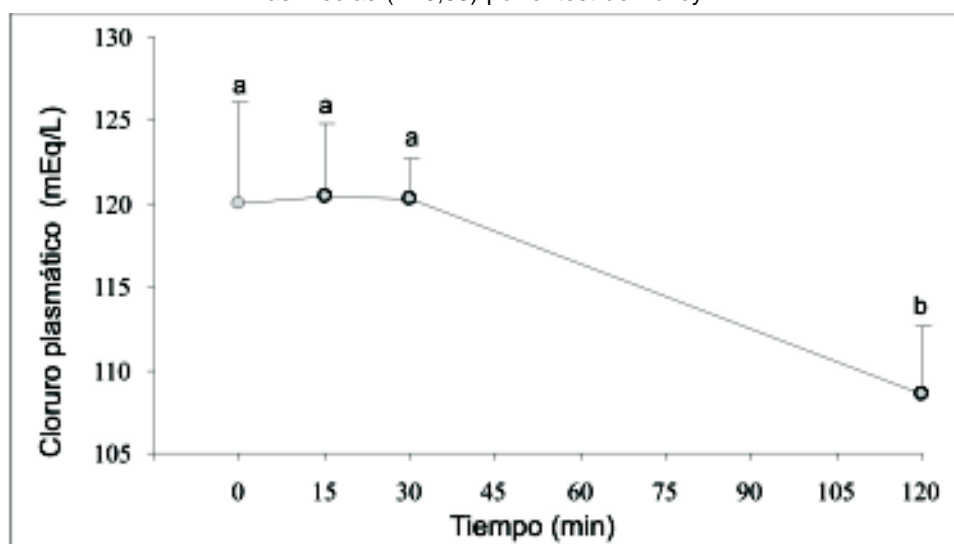
## RESULTADOS

En el presente estudio los peces sin estrés (T0) presentaron niveles de glucosa plasmática de 76,41 mg/dL, indicando que estaban en condiciones adecuadas para la especie (40,6 a 89,2 mg/dL) según Tavares-Dias y Mataqueiro (2004). Se observó aumento significativo en los niveles de glucosa plasmática en todos los muestreos pos-estrés

(15, 30 y 120 min), los niveles de proteína plasmática no presentaron alteraciones significativas (C=3,2; T15=4,1; T30=5,0; T120= 4,3 g/dL) conforme se observa en la (Figura 1). El cloruro plasmático presentó disminución significativa 60 min al manejo realizado (Figura 2).



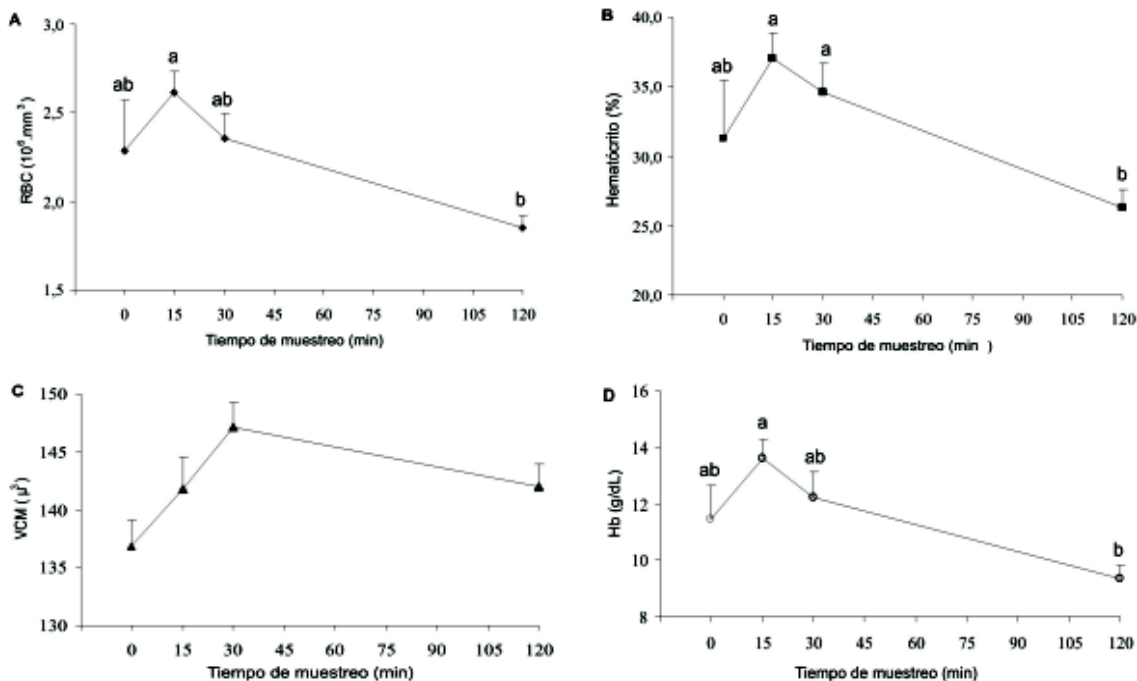
**Figura 1.** Niveles de glucosa plasmática (mg/dL) y proteína plasmática (g/dL) de los ejemplares sometidos a la persecución con nasa (1 min) y posterior exposición aérea (3 min), en diferentes tiempos (0; 15; 30 y 120 min). Las barras verticales indican la desviación estándar y letras diferentes diferencias significativas entre las medias ( $P < 0,05$ ) por el test de Tukey



**Figura 2.** Niveles de cloruro plasmático (mEq/L) de pacu sometidos a persecución con nasa (1 min) y posterior exposición aérea (3 min), en diferentes tiempos de muestreo (0; 15; 30 y 120 min). Las barras verticales indican la desviación estándar y letras diferentes diferencias significativas entre las medias ( $P < 0,05$ ) por el test de Tukey

Las células rojas, hematócrito y la hemoglobina presentaron aumento y posterior reducción durante el periodo de muestreo, sin diferir del control. El

volumen corpuscular medio permaneció semejante durante el tiempo de muestreo (Figura 3).



**Figura 3.** A) Recuento de células sanguíneas rojas (RCB), B) hematócrito (Hto); C) volumen corpuscular medio VCM y D) hemoglobina (Hb), de pacu sometidos a persecución con nasa (1 min) y posterior exposición aérea (3 min), en diferentes tiempos pos-estrés. Las barras verticales indican la desviación estándar y letras diferentes diferencias significativas entre las medias ( $P < 0,05$ ) por el test de Tukey

## DISCUSIÓN

En el presente trabajo los ejemplares sometidos a estrés presentaron aumento significativo de glucosa a partir de los 15 min (Fig. 1), pudiendo ser resultado de mayor estrés y/o respuesta de adaptación de esta especie. Esto está de acuerdo con estudios realizados por Abreu et al. (2009) que observaron los efectos de la captura y exposición aérea por 3 y 5 min en el pacu, en el cual se observó aumento de valores de glucosa sanguínea con posterior retorno al nivel basal después de 24 horas. Estudios en tambacu (*P. mesopotamicus* macho x *Colossoma macropomum* hembra) demostraron que el estrés generado por captura e hipoxia, no alteró el nivel de glucosa plasmática durante las tres primeras horas de experimento, sin embargo realizando un estrés más prolongado y consecutivo presentó aumento significativo a partir de dos horas y media (Martins et al., 2002).

La glucosa interviene en los procesos metabólicos como respuesta inmediata al agente estresor, como fue observado por Henrique et al. (1998); Martins et al. (2004); Olsen et al. (2005), Fagundes y Urbinati (2008), para *Sparus aurata*, *Oreochromys niloticus*, *Oncorhynchus mykiss* y *Pseudoplastystoma corruscans*, respectivamente, con aumento de la glucosa plasmática pos-estrés agudo, respuesta semejante a la observada en el pacu.

Para la proteína plasmática no hubo diferencia significativa, esta respuesta puede estar relacionada a la presencia de cortisol en la sangre que no fue determinado en este estudio.

En el cloruro plasmático hubo diferencia en el muestreo de 120 min cuando presentó un valor más bajo (108,5

mEq/L) (Fig. 2), sugiriendo pérdida iónica de la sangre para el medio externo hipotónico, posiblemente por efecto del aumento de la perfusión en las branquias ocasionada por acción adrenérgica en la circulación sanguínea (Eddy, 1981; McDonald y Milligan, 1997). La reducción de los niveles de cloruro plasmático también fueron observados por otros autores Abreu et al. (2009) observaron reducción en las concentraciones de cloruro plasmático para el pacu después del estrés generado por captura. En *P. corruscans*, Fagundes y Urbinati (2008) observaron que hubo reducción en los niveles de cloruro 48 horas después de ser sometidos a estrés agudo por captura e hipoxia. En juveniles y adultos matrinxã también se observó la reducción de la concentración de cloruro plasmático después de ser transportados (Carneiro e Urbinati, 2001; Urbinati et al., 2004).

Entre los parámetros hematológicos, el RBC presentó aumento en los primeros 15 min con posterior reducción hasta 120 min, con diferencia significativa entre el T15 y T120 (Fig. 3A), presentando el mismo perfil en los niveles de Hto y Hb, disminución observada también por Morgan y Iwama (1997). El Hto tuvo aumento inmediato debido a la contracción esplénica, liberando así eritrocitos en la corriente sanguínea (Wendelaar Bonga, 1997) observando también aumento en el RCB. Este aumento fue corroborado por el aumento en la concentración de hemoglobina (Fig. 3D). El VCM aumentó hasta T30, con posterior

reducción sin retornar al nivel que presentó el grupo control. Este resultado puede ser inicialmente por la respuesta inmediata de adaptación, con posterior hemodilución causada por la pérdida electrolítica y reducción de la osmolaridad, pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas confirmando que el aumento del Hto fue causado por el aumento del número de células rojas sanguíneas y no por alteración en el volumen, respuesta necesaria para transportar más oxígeno a los tejidos en condición de estrés agudo. Esta respuesta no fue observada en estudios anteriores con pacu (Abreu et al., 2009) y con pintado (Fagundes y Urbinati, 2008) en el cual hubo reducción en el hematocrito acompañado de reducción en el número de células rojas y hemoglobina, pero ocurrió con matrinxã después ser puestos en bolsas para transporte (Urbinati et al., 2004), confirmando los resultados del presente trabajo.

Las respuestas hematológicas observadas en este estudio, así como los cambios iónicos y metabólicos, muestran que hay una respuesta secundaria al estrés en el pacu después al procedimiento de captura e hipoxia en los diferentes tiempos de muestreo. Sin embargo, dos horas después (tratamiento T120) no fueron suficientes para la recuperación de la homeostasis de los peces estresados que es dependiente de la respuesta fisiológica de adaptación al estrés agudo, respuesta similar a la mayoría de especies de peces.

## REFERENCIAS

Abreu JS, Takahashi LS, Hoshiya MA, Urbinati EC. Biological indicators of stress in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) after capture. *Braz J Biol.* 2009; 69 (2).

Almazán Rueda P, Van Helmond ATM, Verreth JAJ, Schrama JW. Photoperiod affects growth, behavior and stress variables in *Clarias gariepinus*. *J Fish Biol.* 2005; 67: 1029-1039.

Barcellos LJG, Woehl VM, Wassermann GF, Quevedo RM, Itzès I, Krieger MH. Plasma levels of cortisol and glucose in response to capture and tank transference in *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard), a South American catfish. *Aquac Res.* 2001; 32: 121-123.

Barton BA. 2000. Stress. In: Stickney, R.R. (Ed.), *Encyclopedia of Aquaculture*. A Wiley - Interscience Publication, John Wiley & Sons, INC., New York, p.892-898.

Boeuf G., Le Bail PY. Does light have an influence on fish growth? *Aquaculture.* 1989; 177: 129-152.

Carneiro PCF, Urbinati EC. Salt as a stress response mitigator of matrinxã *Brycon cephalus* (Teleostei: Characidae) during transport. *Aquac Res.* 2001; 32: 297-304.

Fagundes M, Urbinati EC. Stress in pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) during farming procedures. *Aquaculture.* 2008; 276: 112-119.

- Fast MD, Hosoya S, Johnson SC, Afonso Lob. Cortisol response and immune-related effects of Atlantic salmon (*Salmo salar* Linnaeus) subjected to short and long-term stress. *Fish Shellfish Immunol.* 2008; 24: 194 - 204.
- Fernandes-De-Castilho M, Pottinger TG, Volpato GL. Chronic social stress in rainbow trout: Does it promote physiological habituation? *Gen Comp Endocr.* 2008;155: 141-147.
- Gregory NG. Animal welfare at markets and during transport and slaughter. *Meat Sci.* 2008; 80: 3-12.
- Grutter AS, Pankhurst NW. The effects of capture, handling, confinement and ectoparasite load on plasma levels of cortisol, glucose and lactate in the coral reef fish *Hemigymnus melapterus*. *J Fish Biol.* 2000; 57: 391-401.
- Henrique MMF, Gomes EF, Gouillou-Coustans MF, Oliva-Teles A, Davies SJ. Influence of supplementation of practical diets with vitamin C on growth and response to hypoxic stress of seabream, *Sparus aurata*. *Aquaculture.* 1998; 161: 415-426.
- Iversen M, Finstad B, Nilssen K. Recovery from loading and transport stress in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts. *Aquaculture.* 1998; 168: 387-394.
- Iwama GK, Afonso Lob, Vijayan MM. 2005. Stress in fishes. In: Evans DH, Claiborne JB, editors. *The physiology of fishes*. Boca Ratón: CRC Press, p.320-42.
- Kebus MJ, Collins MT, Brownfield MS, Kayes TB, Malison JA. Effects of rearing density on the stress response and growth of rainbow trout. *J Aquatic Anim Hlth.* 1992; 4: 1-6.
- King EJ, Garner RJ. Colorimetric determination of glucose. *J Clin Pathol.* 1947; 1:30-33.
- Martins ML, Moraes FR, Fujimoto RY, Nomura DT, Fenerick Jr J. Respostas do híbrido tambacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 macho x *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818 fêmea) a estímulos simples ou consecutivos de captura. *Boletim do Instituto de Pesca.* 2002; 28 (2): 195-204.
- Martins ML, Nomura DT, Myiazaki DMY, Pilarsky F, Ribeiro K, Castro MP, Campos CFM. Physiological and haematological response of *Oreochromis niloticus* (Osteichthyes: Cichlidae) exposed to single and consecutive stress of capture. *Acta Sci Anim Sci.* 2004; 26 (4): 449-456.
- Mazeaud MM, Mazeaud F, Donaldson EM. Primary and secondary effects of stress in fish: some new data with a general review. *Trans Am Fish Soc.* 1977;106: 201-212.
- Mcdonald G, Milligan CL. 1997. Ionic, osmotic and acid-base regulation in stress. In: Iwama, GW., Pickering AD, Sumpter JP, Schreck CB. (Eds.), *Fish stress and health in aquaculture*. University Press, Cambridge, p.119-144.
- Mommsen TP, Vijayan MM, Moon TW. Cortisol in teleost: dynamics, mechanism of action, and metabolic regulation. *Rev Fish Biol.* 1999; 9:211 - 68.
- Morgan JD, Iwama GK. 1997. Measurements of stressed states in the field. In: Iwama GK, Pickering AD, Sumpter JP, Schreck CB. (Eds.), *Fish Stress and Health in Aquaculture*. Society for Experimental Biology Seminar Series 62. Cambridge Univ. Press, Cambridge, England, p. 247-268.
- Moron SE, Polez VLP, Artoni RF, Riba JLC, Takahashi HK. Estudo de alterações na concentração dos íons plasmáticos e da indução de micronúcleos em *Piaractus mesopotamicus* exposto ao herbicida atrazina. *J Braz Soc Ecotoxicol.* 2006; 1(1): 27-30.
- Ocampo AA, Camberos LO. Diagnóstico del Estrés en Peces. *Vet. Méx.* 1999; 30(4): 337-344.
- Oliveira AMBMS, Conte L, Cyrino JEP. 2004. Produção de Characiformes autóctones. In: Cyrino JEP., Urbinati EC., Fracalossi DM., Castagnolli N. (Ed.). 2004 *Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva*. Editado por José Eurico P. Cyrino et al. - São Paulo: Tec Art., p.217-238.

- Olsen RE, Sundell TK, Mayhew TM, Myklebust R, Ring E. Acute stress alters intestinal function of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture*. 2005; 250: 480-495.
- Pankhursts N, Kraak G. 1997. Effects of stress on reproduction and growth of fish. In: Iwama G, Pickering A, Sumpter C, Schreck C (Ed.). *Fish stress and health in aquaculture*. Cambridge: Cambridge University Press, 278p. (Society for Experimental Biology Seminar Series; 62).
- Schreck CB. Physiological, behavioural, and performance indicators of stress. *Am Fish Soc Symp*. 1990; 8: 29-37.
- Schreck CB. 1981. Stress and compensation in teleostean fishes: response to social and physical factors. In: Pickering AD, editor. *Stress and fish*. London: Academic Press, p.295-321.
- Tavares-Dias M, Mataqueiro MI. Características hematológicas, bioquímicas e biométricas de *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae) oriundos de cultivo intensivo. *Acta Sci Biol Sci*. 2004; 26 (2): 157-162.
- Urbinati EC, Gonçalves FD. 2005. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In: Baldisserotto, B., e LC. Gomes (eds). *Espécies Nativas para Piscicultura no Brasil*. UFMS. Santa Maria. Brasil. p. 225-246.
- Urbinati EC, Abreu JS, Camargo ACS, Landines MA. Loading and transport stress of juvenile matrinxã (*Brycon cephalus*, Characidae) at various densities. *Aquaculture*. 2004; 229: 389-400.
- Wendelaar Bonga SE. The stress response in fish. *Physiol Rev*. 1997; 77: 591-625.
- Wojtaszek J, Dziewulska-Szwajkowska D, Lozinska-Gabska M, Adamowicz A, Dzugaj A. Hematological effects of high dose of cortisol on the carp (*Cyprinus carpio* L.): cortisol effect on the carp blood. *Gen Comp Endocrinol* 2002; 125: 176-183.