

Ensayo de toxicidad aguda CL50-96h con acetato de cadmio y parámetros hematológicos en el híbrido cultivado *Colossoma macropomum* x *Piaractus brachypomus*

Rosa Vásquez¹, Asmine Bastardo^{2*} e Inés K. Mundarain¹

RESUMEN

Se determinó la concentración letal media del acetato de cadmio en el cachamote cultivado (*Colossoma macropomum* x *Piaractus brachypomus*), mediante una prueba de toxicidad aguda realizada en bioensayos estáticos a 96 horas (CL50-96h). Se evaluaron los principales efectos del contaminante sobre la estructura de estos organismos acuáticos a corto plazo y en los parámetros hematológicos. Para tal fin se utilizaron alevines de cachamote con un promedio en peso de 4 g y de longitud estándar de 9 cm. La concentración letal media del acetato de cadmio para el cachamote fue de 22,96 mg/l en 96 h y se observaron los siguientes biomarcadores externos: Nado letárgico en la superficie, exoftalmia, hipersecreción mucosa, opacidad de la córnea, cambios en la pigmentación de la piel, asfixia, hemorragia en los ojos y opérculo, deshilachamiento de las aletas y acumulación de líquido en la cavidad abdominal. Los efectos del acetato de cadmio sobre los parámetros hematológicos del pez se evidenciaron en una significativa disminución del hematocrito y de la concentración de hemoglobina en todas las concentraciones utilizadas.

¹ Departamento de Biología, Escuela de Ciencias, Universidad de Oriente Núcleo de Sucre. Cerro Colorado. Av. Gran Mariscal. Cumaná, estado Sucre. Venezuela

² Estación de Investigaciones Hidrobiológicas de Guayana. Fundación La Salle de Ciencias Naturales. Apartado Postal 51. San Félix, estado Bolívar. Venezuela. *Correo electrónico: asmine.bastardo@fundacionlasalle.org.ve

Palabras clave: toxicidad, bioensayos, cadmio, piscicultura, parámetros hematológicos.

Test of acute toxicity CL50-96h with cadmium acetate and hematological parameters in the farmed hybrid *Colossoma macropomum* x *Piaractus brachypomus*

SUMMARY

The mean lethal concentration of cadmium was determined in alevines of cachamato (*Colossoma macropomum* x *Piaractus brachypomus*) using cadmium acetate in acute toxicity tests based on static bioassays of 96 h (LC50-96h). The main short time effects of the pollutant were evaluated on the structure and on some hematological parameters of these fish. Animals had a mean weight of 4 g and standard length of 9 cm. Mean lethal concentration of cadmium acetate for cachamato was 22.96 mg/l in 96 h, and the following external biomarkers were observed: lethargic swimming in the surface, exophthalmia, mucus hypersecretion, corneal opacity, changes in skin pigmentation, asphyxia, hemorrhage in eyes and operculum, unraveling of fins, and accumulation of liquid in the abdominal cavity. Cadmium acetate effects on fish hematological parameters showed a significant reduction in hematocrit and hemoglobin concentration in all of the tested concentrations.

Key words: cadmium, toxicity, LC50-96h, hematological parameters, Caroni river.

INTRODUCCIÓN

Los metales pesados están considerados como serios contaminantes del ecosistema acuático. Muchos de estos compuestos no biodegradables son absorbidos y acumulados por los peces e incorporados en la trama trófica causando problemas latentes de salud en uno de los más importantes consumidores finales: el hombre (Figueroa, 1998). Los peces son utilizados cada vez con mayor frecuencia como modelos para trabajos experimentales pues su pequeño tamaño y la rápida reproducción los hacen particularmente idóneos para las más variadas pruebas, especialmente como animales de prueba en investigaciones de toxicología y el monitoreo de la contaminación.

del medio acuático. Además, los costos en términos económicos y biológicos pueden ser reducidos mediante el uso de pequeños peces de acuario en estudios de toxicidad (Domitrovic, 1997), los cuales presentan diferentes patrones de acumulación, dependiendo del metal, de la concentración en el medio y del tiempo de exposición (Eisler *et al.*, 1972).

Los bioensayos han sido el método tradicional para documentar la presencia o ausencia de efectos aparentes de los contaminantes sobre los sistemas vivos. Las pruebas letales o toxicidad aguda (CL50) permiten evaluar los principales efectos de los contaminantes sobre la estructura de los organismos o de las poblaciones acuáticas a corto plazo (Calabrese *et al.*, 1977). Los métodos más utilizados en estudios de contaminación son los de carácter fisicoquímico e hidrobiológico; un enfoque intermedio lo brindan los bioensayos en laboratorio que establecen un puente entre estos procesos (Vargas-Boldrini, 1994) y documentan la presencia o ausencia de efectos aparentes de los contaminantes sobre los sistemas vivos (Davis, 1977). Uno de los efectos biológicos más comunes se presenta en los parámetros hematológicos (Zelikoff *et al.*, 1995), los cuales son de gran utilidad debido a que indican, con relativa rapidez, cualquier perturbación fisiológica que afecte la salud de la población piscícola.

El híbrido cultivado *Colossoma macropomum* x *Piaractus brachipomus*, (Cachamote) tiene una importancia relevante en el ámbito económico ya que es uno de los peces más cultivados en Venezuela. Esta especie se cultiva de manera intensiva en el río Caroní, cuerpo de agua que recibe un aporte importante de las aguas servidas de Ciudad Guayana, estado Bolívar, las cuales contienen cadmio. Wedemeyer y Wood (1974) propusieron que el agua destinada a contener peces debe reunir entre otras características valores de cadmio no mayor de 0,003 mg/l. Las normas para la clasificación y control de la calidad de los cuerpos de agua y vertidos o efluentes líquidos de Venezuela (Decreto 883, Gaceta Oficial Nº 5.021, 1995) clasifica las aguas como las del río Caroní en tipo 4, en las cuales los metales deben estar en concentraciones no detectables, según los métodos aprobados por el Ministerio de Ambiente. La EPA (Environmental Protection Agency) de EEUU establece que el contenido de cadmio en aguas naturales no debe sobrepasar 0,01mg/l. Aún cuando las aguas naturales no superan las concentraciones empleadas normalmente en los ensayos agudos de toxicidad, es bien sabido que la bioacumulación del cadmio en los peces produce malformación de la estructura ósea y desórdenes en el sistema nervioso (Roberts, 1989). De aquí la importancia del estudio de las respuestas de la

ictiofauna expuesta a la toxicidad de metales pesados, como el acetato de cadmio, que permita obtener una información de referencia aplicable a los estudios de toxicidad en peces cultivados en esta aguas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron alevines del híbrido cultivado *C. macropomum* x *P. brachypomus*, denominado cachamoto, con un peso aproximado de 3-5 g y una longitud estándar de 8-10 cm. Los alevines fueron seleccionados uniformemente en relación a la edad, talla y peso, sin discriminación de sexo. Se recolectaron ejemplares aparentemente sanos de cachamoto de las jaulas de engorde de la piscifactoría flotante de Macagua (Fundación La Salle de Ciencias Naturales), ubicada en la margen izquierda del embalse de Macagua, río Caroní, estado Bolívar. Los alevines fueron capturados individualmente mediante anzuelo y nylon para disminuir el estrés. Inmediatamente fueron transportados en bolsas plásticas con 6 l de agua saturada de oxígeno y selladas con bandas de caucho a la Estación de Investigaciones Hidrobiológicas de Guayana, perteneciente a la Fundación La Salle de Ciencias Naturales, ubicada en San Félix, estado Bolívar. Los peces fueron sometidos a un período de aclimatación de una semana, en condiciones de laboratorio y se alimentaron dos veces al día con puricachama (Ralston Purina®) con un contenido proteico de 25%. La ración suministrada fue calculada basándose en la biomasa (Pillay, 1997). Un día antes de iniciar la prueba, se suspendió la alimentación con el fin de evitar interferencia de esta en los resultados (APHA, 1976).

Preparación de la solución madre

Previo al inicio del experimento se preparó una solución madre con acetato de cadmio, $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Cd} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, con una concentración de 1.000 mg/l, la cual fue diluida en los acuarios hasta alcanzar la concentración deseada (Prieto *et al.*, 1998).

Prueba de biodegradabilidad

Se realizó una prueba de biodegradabilidad con el fin de verificar si las condiciones físicas y químicas con las que se efectuó el bioensayo modificaban el estado del contaminante y garantizar si el tipo de agua a

utilizar no presentaba interferencia en la determinación del contenido del metal (APHA, 1992).

Se prepararon dos acuarios para el acetato de cadmio, en las mismas condiciones de temperatura, aireación y volumen de agua filtrada que el bioensayo, con una concentración y dos réplicas que se monitorearon a 0 y 96 horas, analizadas por espectrofotometría de absorción atómica (APHA, 1992).

Bioensayo

Después del período de aclimatación de los ejemplares, se procedió a la determinación de la concentración letal media (CL₅₀) para el acetato de cadmio. Este último fue obtenido mediante la estimación de la mortalidad en función del tiempo (Prieto *et al.*, 1998), utilizándose un sistema estático con aireación continua, en acuarios de vidrio de 70 l y empleándose un total de 20 ejemplares en el bioensayo y divididos en las concentraciones 20, 22 y 24 mg/l de acetato de cadmio y un control (Figuroa, 1998; Domitrovic, 1997). Se simuló un fotoperíodo de 12 h luz y 12 h oscuridad durante el experimento. Cada seis horas se monitorearon en cada acuario los parámetros fisicoquímicos de temperatura, pH y oxígeno disuelto. Mediante observaciones del comportamiento y del aspecto de los peces se registraron las modificaciones en los siguientes biomarcadores externos: cambios en la pigmentación, natación errática, hemorragias, asfixia y deterioro de las aletas.

Análisis hematológico

El muestreo hematológico se realizó al inicio del ensayo y en cada pez moribundo, se realizó la extracción sanguínea de la vena caudal, utilizando una jeringa desechable previamente heparinizada. Se determinó el porcentaje de hematocrito, la concentración de hemoglobina y se realizó una evaluación citomorfológica de la sangre en frotis sanguíneos, según Conroy (1998).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al realizar la prueba de biodegradabilidad del acetato de cadmio en este estudio se encontró que la evaporación del agua produjo un aumento no

significativo ($P>0,05$) en la concentración final de cadmio, pudiéndose determinar que el cadmio tiene una permanencia constante en las condiciones de agua utilizada, por lo cual no se consideró necesario realizar recambios para el bioensayo con esta sustancia. Los parámetros fisicoquímicos se mantuvieron constantes a lo largo de las 96 horas de la prueba y las condiciones fueron las mismas que se utilizaron para el bioensayo.

Los resultados promedios obtenidos en los parámetros fisicoquímicos durante el bioensayo CL50-96h de acetato de cadmio se encuentran dentro de los rangos aceptables reportados por Balarin (1979) para organismos acuáticos (Cuadro.1). Estos resultados permiten suponer que los cambios fisiológicos y patológicos en los peces están asociados a la presencia del acetato de cadmio en el agua, ya que los peces tienen un necesario e íntimo contacto con ella, lo que los hace vulnerables a esta sustancia, por lo que las alteraciones en su fisiología o comportamiento pueden ser considerados como indicadores de contaminación. Se sabe que a mayor temperatura las tasas de reacción química y bioquímica aumentan, mientras que el umbral de la respuesta biológica disminuye (Eisler y Wapner, 1975). Esto significa que los contaminantes en aguas cálidas son a menudo más solubles y absorbidos con mayor rapidez por plantas y animales en una concentración dada y pueden producir disfunciones fisiológicas y de comportamiento en concentraciones más bajas que en zonas templadas (Escobar, 1978).

Cuadro 1. Niveles de temperatura, pH y oxígeno disuelto del agua medidos a lo largo de la prueba de toxicidad aguda CL50-96h con acetato de cadmio a diferentes concentraciones de acetato de cadmio

Parámetros	Dosis (mg/l)	Tiempo (h)				
		0	24	48	72	96
Temperatura (°C)	0	26,2	26,2	26,2	26,2	26,2
	20	25,9	26,3	26,0	25,9	23,6
	22	26,2	23,2	26,1	23,9	25,7
	24	26,2	26,2	26,1	26,0	26,5
pH	0	6,7	6,7	6,8	6,7	6,7
	20	6,6	6,6	6,6	6,5	6,3
	22	6,6	6,7	6,6	6,5	6,4
	24	6,6	6,6	6,6	6,4	6,3
Oxígeno disuelto (mg/l)	0	4,93	4,98	4,96	4,91	4,86
	20	5,45	4,06	4,37	4,12	4,08
	22	5,70	4,81	5,55	4,17	4,26
	24	5,72	4,81	4,50	4,31	4,04

No se observaron modificaciones en los biomarcadores externos del grupo control a lo largo de la prueba como tampoco en las primeras 24 h del ensayo en la concentración más baja 20 mg/l con acetato de cadmio. Sin embargo, en las concentraciones de 22 y 24 mg/l de acetato de cadmio, las modificaciones en los biomarcadores externos consistieron en nado superficial y errático, pérdida del equilibrio, señales de anoxia e hipersecreción mucosa. Se pudo observar claramente que los peces sometidos a la concentración media de 22 mg/l de acetato de cadmio presentaron mayores signos de daños, como opacidad de ojos y piel, exoftalmia, hemorragia al nivel de los ojos y el opérculo, acumulación de líquido en el abdomen, deshilachamiento de las aletas e hipersecreción mucosa (Cuadro 2).

Al usar una concentración alta de contaminante se causa la muerte de los peces rápidamente sin la evidencia oportuna de síntomas asociados al proceso (Domitrovic, 1997). En el bioensayo realizado con el híbrido cultivado *C. macropomum* x *P. brachypomus* se observó una tasa de mortalidad del 57,4%. En la prueba no se hallaron mayores efectos letales en la concentración más baja de acetato de cadmio (20 mg/l); sin embargo, se registró un número elevado de muertes en las concentraciones de 22 y 24 mg/l. La CL50-96h de acetato de cadmio para el híbrido cultivado *C. macropomum* x *P. brachypomus* fue de 22,96 mg/l, pudiéndose determinar que la concentración de cadmio contenida en esta es de 9,62 mg/l (Cuadro 3). Estos valores son mayores que los reportados para otras especies dulceacuícolas, como el bagre, *Mystus vittatus*, que presentó una CL50-96h de 17,94 mg/l al acetato de cadmio (Rao y Manjula, 1997).

La piel del pez es una envoltura del cuerpo y le brinda protección constituyendo la primera barrera defensiva del organismo contra enfermedades y situaciones ambientales adversas, cumpliendo también funciones respiratorias, excretoras y osmoreguladoras (Voto, 2002). El híbrido cachamote es omnívoro y presenta escamas imbricadas, con el margen libre orientado hacia la cola, encontrándose en la parte lateral y a lo largo de todo el cuerpo una hilera de escamas perforadas constituyendo la línea lateral (Voto, 2002). Es posible que estas características morfofisiológicas estén asociadas a los efectos del contaminante sobre el organismo. Sin embargo, la CL50-96h con acetato de cadmio del cachamote es comparable con otras especies reportadas, como la tilapia, *Oreochromis mossambicus*, con una CL50-96h de 11,99 mg/l de cadmio (James, 2000) y la carpa, *Ciprinus carpio*, con una CL50-96h de 10,72 mg/l de cadmio (Alam y

Maughan, 1995). Estas especies comparten condiciones de vida y características morfofisiológicas similares al cachamotó.

Cuadro 2. Biomarcadores que se observaron en los peces en la prueba de toxicidad CL50-96h con acetato de cadmio en las diferentes concentraciones usadas.

Tiempo, h	Dosis (mg/l)			
	0	20	22	24
24	Nado en el fondo de la pecera de un extremo al otro y agrupados en las esquinas. Movimiento constante de las aletas (dorsal, caudal y anal)	Normal	Nado letárgico y presencia de mucus en poca cantidad	Se encuentran en la parte superior del acuario presencia de mucus en abundancia
48	Movimiento de aletas. Reflejo de huida. Reflejo del ojo. Pupilas en forma horizontal.	Nado letárgico en el fondo	Natación aletargada en la superficie de la pecera con presencia de mucus excesivo y opacidad de ojos	Se encuentran en la parte superior del acuario presencia de mucus excesivo, exoftalmia y opacidad de los ojos
72	Nado constante a ambos extremos del acuario. Movimientos rápidos de las aletas. Color de la piel brillante.	Nado letárgico en la superficie y opacidad de ojos	Presencia de hemorragia a nivel del ojo y opérculo	Se encuentran en la parte superior del acuario presencia de mucus excesivo, exoftalmia y opacidad de los ojos y piel. Asfixia.
96	Nado en el fondo de la pecera de un extremo al otro y agrupados en las esquinas. Color de la piel brillante. Movimiento constante de las aletas.	Nado letárgico en la superficie. Exoftalmia. Opacidad de ojos y piel presencia de mucus excesivo.	Natación aletargada en la superficie de la pecera con presencia de mucus excesivo. Exoftalmia. Opacidad de ojos y piel. Hemorragia a nivel del ojo y opérculo. Acumulación de líquido a nivel del abdomen	Se encuentran en la parte superior del acuario presencia de mucus excesivo. Exoftalmia y opacidad de los ojos y piel. Deshilachamiento de aletas (caudal, anal y dorsal). Asfixia

Cuadro 3. Toxicidad de cadmio (como CL50-96h) en comparación con otras especies piscícolas

piscícolas			
Especie	Cadmio	Acetato de cadmio	Referencia
	----- mg/l -----		
<i>Myxus vittatus</i>	-	17,94	Rao y Manjula (1997)
<i>Oreochromis mossambicus</i>	11,99	-	James (2000)
<i>Ciprinus carpio</i>	10,72	-	Alam y Maughan (1995)
<i>C. macropomum</i> x <i>P. brachypomus</i>	9,72	22,96	Este estudio

Los parámetros hematológicos considerados en este estudio mostraron una marcada variación en los niveles de hematocrito y hemoglobina (Cuadro.4), pudiéndose determinar una disminución significativa de estos parámetros en relación a los valores normales para todas las concentraciones ensayadas. Los efectos del cadmio sobre los parámetros hematológicos reportados en la tilapia revelan que la hemoglobina descendió desde un valor inicial de 6,30 g/dl a 3,1 g/dl después de 45 h. El hematocrito descendió desde un valor inicial de 25,84 a 8,02% después de 45 h (James, 2000). Estos resultados son similares a los obtenidos en el cachamote, lo cual puede estar asociado fisiológicamente a que la absorción de metales pesados por los organismos causa una inhibición de la eritropoyesis, junto a un aumento proporcional en la destrucción de eritrocitos y tejido hematopoyético (James, 2000). Citomorfológicamente se observó una abundante poiquilocitosis, la cual es una de las características más comunes encontrada en los eritrocitos de animales expuestos a intoxicación. También se pudo observar monocitos vacuolados en la sangre periférica, lo que refuerza el hecho de que la presencia de metales pesados en los animales provocaría anemia hemolítica, deformación de las células rojas, aumento del número de eritoblastos y neutrofilia (Silveira *et al.*, 1996). De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio, la hematología puede ser una herramienta complementaria para el diagnóstico de las patologías causadas por la intoxicación con el acetato de cadmio. La importancia de establecer la relación entre los tóxicos y sus efectos en los peces está asociada con dos problemas particulares, como son las descargas accidentales que pueden determinar concentraciones iniciales altas con efectos agudos y las concentraciones derivadas por acumulación continua, con adaptaciones de los peces y efectos subletales.

Cuadro 4. Variaciones en el patrón hematológico del Cachamote comparando los valores iniciales hemoglobina y hematocrito con los arrojados en las tres diferentes concentraciones utilizadas en el CL50-96h de acetato de cadmio

Parámetro	Valor Inicial, mg/l	Dosis (mg/l)		
		20†	22	24
Hematocrito (%)	21,00	16,25a	14,00a	15,50a
Hemoglobina (g/dl)	5,40	4,26b	2,72a	3,77b

† Letras distintas en la misma fila indican diferencias significativas entre medias ($P < 0,05$).

CONCLUSIONES

La concentración letal media del acetato de cadmio para alevines del híbrido cultivado *C. macropomum* x *P. brachypomus* fue de 22,96 mg/l con un contenido de cadmio de 9,62 mg/l.

La observación de natación aletargada, mucus excesivo, exoftalmia, opacidad de ojos y piel, hemorragia a nivel del ojo y opérculo, deshilachamiento de las aletas (caudal, anal y dorsal), asfixia y acumulación de líquido a nivel del abdomen son señales indicativas de toxicidad al cadmio en el cachamote.

La intoxicación con acetato de cadmio causa en el cachamote disminución de la concentración de hemoglobina, porcentaje de hematocrito y deformación de los eritrocitos.

BIBLIOGRAFÍA

- Alam M. y M. Maughan. 1995. Acute toxicity of heavy metals to common carp (*Ciprinus carpio*). J. Environ. Sci. Health., 30: 1807-1816.
- APHA (American Public Health Association). 1976. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association. Washington.
- Balarin J. 1979. Tilapia. A guide to their biology and culture in Africa. University of Stirling, Scotland, 76 pp.
- Blaxhall P. y K. Daisley. 1973. Routine haemathological methods for use with fish blood. J. Fish. Biol., 5: 771 - 781.

- Calabrese A., F. Thurberg y E. Gould. 1977. Effects of cadmium, mercury and silver on marine animals. *Mar. Fish. Rev.*, 39 (4): 5-11.
- Conroy D. 1998. Manual de métodos y técnicas de laboratorio de uso común en la hematología pisciana. N° 1. Pharma-Fish. Maracay, Venezuela. 25 p.
- Davis J. 1977. Standardization and protocols of bioassays, their role and significance for monitoring, research and regulatory usage. *Aquatic Toxicity Workshop*. Halifax, Nova Scotia pp.1-14.
- Domitrovic H. 1997. El empleo de peces autóctonos para la realización de ensayos de toxicidad: Evaluación de la especie *Aequidens portalegrensis* (Hensel, 1870). VI Jornadas de Ciencias Naturales del Litoral. Argentina. Resumen.
- Escobar J. 1978. Study concerning mercury pollution in Cartagena. FAO Doc. Tec. N° 185. 25 p.
- Escobar J. y S. Vergara. 1975. Evaluación de aspectos contaminantes por residuos de hidrocarburos procesados. Ciénaga de San Silvestre – El Llanito. Inderena. Región Oriental. Proyecto Pesca. Universidad Industrial de Santander. Colombia. 33p.
- Eisler R. y R. Wapner. 1975. Second annotated bibliography on biological effects of metals in aquatic environments. U.S. Environmental Protection Agency. Report 6003-75-008. Springfield, USA.
- Eisler R., G. Zarogian y R. Kennekey. 1972. Cadmium uptake by organism. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 29: 1367-1369.
- Figuerola L. 1998. Acumulación y depuración de cobre y cadmio en *Oreochromis mossambicus* (Peters, 1952), (Pisces: Cichlidae). Efectos subletales sobre el crecimiento en función de ARN/ADN. Trabajo Especial de Grado. Departamento de Biología, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela. 37p.
- James R. 2000. Effect of zeolite on reduction of cadmium level in water and improvement of haematological parameters in *Oreochromis mossambicus* (Peters). *Indian J. Fish.*, 47(1): 29-35.
- Pillay T. 1997. Acuicultura. Principios y Prácticas. Limusa. México, D.F. 699p.

- Prieto A., A. Quesada y R. Silveira. 1998. Manual de procedimientos operativos de trabajo. Laboratorio de Diagnostico Sanidad Acuicola. Centro de Investigaciones Pesqueras. La Habana, Cuba. 345p.
- Rao L. y R. Manjula. 1997. Acute toxicity of Zn, Pb and Cd in the freshwater catfish *Mystus vittatus* (Bloch). Indian. J. Fish., 44(4): 405-408.
- Roberts R. J. 1989. The pathophysiology and systematic pathology of teleosts. En R.J. Roberts (Ed) Fish Pathology. 2^{da} Ed. Bailliere Tindall, Londres. pp. 56-133.
- Silveira R., Y. Venjoy y A. Prieto. 1996. Los análisis hematológicos como sistemas de diagnóstico en *Oreochromis aureus* de cultivos en Cuba. Rev. Latin. Acuicultura, 36:4-6.
- Vargas-Boldrini C. 1994. Ictiofauna. Características gerais e metodologías. Avaliação de impacto. Curso "Caracterização de ecossistemas aquáticos e transição". Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental de São Paulo. São Paulo, Brasil.
- Voto J. 2002. Piscicultura Amazonica con especies nativas. Tratado de Cooperación Amazonica. Secretaria Pro-tempore. São Paulo, Brasil. 350 p.
- Wedemeyer G. y J. Wood. 1974. Stress as a predisposing factor in fish diseases. US Dept. Interior, FDL-38. Washington, USA.
- Zelikoff J.T., D. Bowser, K.S. Squibb y K. Frenkel. 1995. Immunotoxicity of low level cadmium exposure in fish: an alternative animal model for immunotoxicological studies. J. Toxicol. Environ. Health, 45: 235-248.