



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM OCEANOGRAFIA AMBIENTAL

BRUNO DE LAQUILA OLIVEIRA

**RESPOSTA FISIOLÓGICA DO DENTÃO (*LUTJANUS JOCU*) DURANTE O
TRANSPORTE E SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO**

VITÓRIA
2020

BRUNO DE LAQUILA OLIVEIRA

**RESPOSTA FISIOLÓGICA DO DENTÃO (*LUTJANUS JOCU*) DURANTE O
TRANSPORTE E SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Oceanografia Ambiental da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Oceanografia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Loureiro Fernandes

VITORIA
2020

BRUNO DE LAQUILA OLIVEIRA

**RESPOSTA FISIOLÓGICA DO DENTÃO (*LUTJANUS JOCU*) DURANTE O
TRANSPORTE E SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Oceanografia Ambiental da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para obtenção do título de Doutor em Oceanografia Ambiental.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Fernando Loureiro Fernandes
Orientador - Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Dr. Maurício Hostim Silva – Examinador Interno
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Dr. Jean-Christophe Joyeux – Examinador Interno
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Dra. Adriana Regina Chippari-Gomes – Examinadora externa
Universidade de Vila Velha

Prof. Dr. Manuel Vazquez Vidal Júnior – Examinador externo
Universidade Estadual do Norte Fluminense

Dedico este trabalho:

Pais: Miguel A. Oliveira Junior e Solange De Laquila Oliveira (em memória)

Esposa: Kerlem de Paula Schiavo De Laquila

Filhos: José Schiavo De Laquila e João ainda na barriga da mamãe.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Oceanografia Ambiental da Universidade Federal do Espírito Santo (PPGOAm – UFES) pela oportunidade de cursar o doutorado.

Ao orientador do trabalho Prof. Dr. Luiz Fernando Loureiro Fernandes pela orientação, incentivo e amizade, e por ter acreditado em mim e incentivado a realização deste trabalho.

Ao Dr. Levy Gomes (UVV) por todo apoio, disponibilizando seu conhecimento desde a concepção até a revisão dos capítulos 1, 2 e 5.

Ao Dr. Luis André Sampaio (FURG) pela contribuição no planejamento e orientações para realização do experimento do capítulo 5.

Ao técnico do PPGOAM Jorge Silva por todo suporte e condução das análises realizadas na Base Oceanográfica.

Ao Dr. Fabiano Paschoal (Universidade Castelo Branco) pela parceria e contribuição na publicação do artigo referente ao Capítulo 4.

À Dandara e Julia (UVV) pela disponibilidade de coleta de sangue dos peixes e apoio nas análises.

Ao grupo de pesquisa do LABCOM, Ana Cecilia, Evandro, Halysson e Rodrigo por todo apoio no laboratório, realização dos experimentos e análises.

A todos aqueles que de alguma forma estiveram comigo durante mais essa etapa em minha vida. Obrigado!

RESUMO

O desenvolvimento da piscicultura marinha, através de peixes com valor econômico, torna-se uma iniciativa fundamental na preservação dos estoques pesqueiros, e vem aumentando progressivamente nos últimos anos. Existe uma carência de informações científicas quanto a geração de dados necessários para que protocolos mais específicos e cientificamente fundamentados possam ser estabelecidos com segurança. A análise de sangue pode se tornar uma ferramenta rápida, não-letal e de baixo custo para a detecção precoce de situações de desnutrição, estresse e infecção em peixes, onde a falta de valores de referência hematológica e parâmetros bioquímicos em animais saudáveis tem limitado sua aplicação. Os procedimentos de captura, manuseio e transporte em peixes podem provocar diversas alterações, trazendo efeitos supressivos sobre o crescimento, reprodução e imunidade, e até mesmo mortalidade. Objetivando preencher essa lacuna de informações, através da escolha de uma espécie de peixe marinho nativa ainda não disponível em qualquer literatura, esta tese é composta por cinco capítulos: o primeiro capítulo caracterizou e avaliou o efeito do manuseio e transporte de dentão (*Lutjanus jocu*) sob anestésico e em sua ausência, em medições de estresse previamente ao transporte, após a chegada dos organismos no laboratório e 24 h após (recuperação), através de respostas hematológicas e bioquímicas. O segundo capítulo teve como objetivo descrever o primeiro registro de *Neobenedenia melleni* em dentão (*Lutjanus jocu*) no oeste do Atlântico Sul, onde também foram sugeridos procedimentos adotados para eliminação deste parasito em peixes cultivados em laboratório. O terceiro capítulo buscou avaliar a condição e resposta imunológica através de parâmetros bioquímicos e hematológicos em dentão (*Lutjanus jocu*) cultivados em tanque-rede, posteriormente no laboratório, com a infestação por *Neobenedenia melleni* e após o tratamento com banho de água doce e aplicação injetável de levamisol. O quarto capítulo foi documentado o primeiro registro de *Caligus asperimanus* Pearse, 1951 no Atlântico Sul Ocidental parasitando *Lutjanus jocu* e *Lutjanus vivanus* capturados nas zonas costeiras do Espírito Santo e Rio de Janeiro, respectivamente. Por fim, o quinto capítulo teve como objetivo avaliar a influência da salinidade (0-30) nos parâmetros bioquímicos e hematológicos em juvenis de *Lutjanus jocu*.

Os resultados são inéditos, apresentando *L. jocu* como uma espécie promissora para o cultivo do ponto de vista da rusticidade, facilidade de manejo, resistência a infestações parasitárias (com o primeiro registro de *N. melleni* e *C. asperimanus* parasitando *L. jocu* no Atlântico Sul Ocidental) e adaptação ao cultivo em baixas salinidades, abrindo perspectiva para que o dentão possa ser cultivado desde águas continentais, estuarinas e até em grandes gaiolas offshore.

Palavras-chave: *Lutjanus jocu*, aquicultura, bioquímica, hematologia, estresse, parasitismo.

ABSTRACT

The development of marine fish farming, through fish with economic value, has become a fundamental initiative in the preservation of fish stocks, and has been increasing progressively in recent years. There is a lack of scientific information regarding the generation of necessary data, so that more specific and scientifically based protocols can be safely established. Blood analysis can become a fast, non-lethal and low-cost tool for the early detection of situations of malnutrition, stress and infection in fish, where the lack of hematological reference values and biochemical parameters in healthy animals has limited its application. The procedures for capturing, handling and transporting fish can cause several changes, bringing suppressive effects on growth, reproduction and immunity, and even mortality. Aiming to fill this information gap, by choosing a species of native marine fish not yet available in any literature, this thesis is composed of five chapters: the first chapter characterized and evaluated the effect of handling and transporting dog snapper (*Lutjanus jocu*) under anesthesia and in its absence, with measurements of stress prior to transport, after the arrival of the organisms in the laboratory and 24 hours after (recovery), through hematological and biochemical responses. The second chapter had as objective to describe the first record of *Neobenedenia melleni* in dog snapper (*Lutjanus jocu*) in the western South Atlantic, where procedures have also been suggested to eliminate this parasite in fish grown in the laboratory. The third chapter sought to evaluate the condition and immune response through biochemical and hematological parameters in dog snapper (*Lutjanus jocu*) cultivated in a fish cage, later in the laboratory, with the infestation by *Neobenedenia melleni*, and after the treatment with fresh water bath and injectable application of levamisole. The fourth chapter documented the first record of *Caligus asperimanus* Pearse, 1951 in the Western South Atlantic parasitizing *Lutjanus jocu* and *Lutjanus vivanus* captured in the coastal areas of Espírito Santo and Rio de Janeiro, respectively. Finally, the fifth chapter aimed to assess the influence of salinity (0-30) on biochemical and hematological parameters in juveniles of *Lutjanus jocu*. The results presented are unprecedented, presenting *L. jocu* as a promising species for cultivation from the point of view of rusticity, ease of handling, resistance to parasitic infestations (with the first record of *N. melleni* and *C. asperimanus* parasitizing *L. jocu* in Western South Atlantic) and adaptation to low salinity cultivation, opening up the prospect for

the dog snapper to be cultivated from continental, estuarine waters and even in large offshore cages.

Key words: *Lutjanus jocu*, aquaculture, biochemistry, hematology, stress, parasitism.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

Figura 1. Realização de biometria em um juvenil de dentão (*Lutjanus jocu*) cultivado em laboratório.....15

Capítulo 1 – Hematological and biochemical characteristics during the transport of dog snapper *Lutjanus jocu* (Perciformes: Lutjanidae)

Figura 1. Photomicrographs of a peripheral blood smear of *Lutjanus jocu* showing a corresponding sequence of images: a. Mature Erythrocyte (ME); b. Immature Erythrocyte (IE); c. Thrombocyte (T); d. Neutrophil (N); e. Lymphocyte (L); and f. Monocyte (M).....33

Capítulo 2 – First record of *Neobenedenia melleni* (Monogenea: Capsalidae) in dog snapper (*Lutjanus jocu*) in the western South Atlantic

Figura 1. Symptoms of abnormalities in *Lutjanus jocu* parasitized by *Neobenedenia melleni* arising after 40 days of culture. Exemplar showing gill erosion (a) and pectoral fin erosion (b). Eye physiognomy comparison: (c) exophthalmia; (b) opacity and exophthalmia; (c) opacity, exophthalmia and intraocular hemorrhage. Color change in fish with exophthalmia (f).....45

Figure 2. *Neobenedenia melleni* MacCallum, 1927 (Monogenea: Capsalidae) specimen measured under a microscope. The specimen was collected in *Lutjanus jocu* after 40 days of culture in the laboratory.....46

Capítulo 3 – Levamisole on the biochemical and hematological responses to parasitism by monogenoids in dog snapper

Figura 1. (a) normal eyes (healthy fish); (b) opacity and exophthalmia and; (c) opacity, exophthalmia and intraocular hemorrhage.....49

Capítulo 4 - Occurrence of *Caligus asperimanus* Pearse, 1951 (Copepoda: Caligidae) parasitic *Lutjanus* spp. (Perciformes: Lutjanidae) in the western South Atlantic

Figura 1. *Caligus asperimanus* from Brazil. Adult Female. (A) Habitus, dorsal view; (B) Antenna; (C) Postantennal process; (D) Maxillule; (E) Leg 1; (F) Sternal furca; (G) Leg 4.56

Capítulo 5 - Efeito da salinidade em parâmetros bioquímicos e hematológicos do dentão *Lutjanus jocu* (Perciformes: Lutjanidae)

Figura 1. Concentração de cortisol (a), glicose (b) e lactato (c) em juvenis de *L. jocu* cultivados sob diferentes salinidades ambientais (0, 5, 15 e 30 ppm) por 15 dias.....66

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1 – Hematological and biochemical characteristics during the transport of dog snapper *Lutjanus jocu* (Perciformes: Lutjanidae)

Tabela 1. Biochemical and hematological parameters of *Lutjanus jocu*.....33

Capítulo 3 – Levamisole on the biochemical and hematological responses to parasitism by monogenoids in dog snapper

Tabela 1 - Hematological and biochemical parameters of the dog snapper (*Lutjanus jocu*) in cage prior to being infected, during infestation of *N. melleni* and 14 days post levamisol treatment (5 mg/kg).....50

Capítulo 5 - Efeito da salinidade em parâmetros bioquímicos e hematológicos do dentão *Lutjanus jocu* (Perciformes: Lutjanidae)

Tabela 1 - Parâmetros hematológicos do dentão (*Lutjanus jocu*) cultivados sob diferentes salinidades ambientais por 15 dias.....67

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO GERAL	14
I.1. Lutjanídeos	14
I.2. Lutjanus jocu (Bloch & Schneider, 1801).....	15
I.3. Piscicultura Marinha	16
I.4. Avaliação de estresse no cultivo de peixes.....	18
I.5. Parasitismo em peixes cultivados	20
II. OBJETIVO GERAL.....	22
II.1. Objetivos Específicos	22
III. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	23
CAPÍTULO 1.....	29
CAPÍTULO 2.....	38
CAPÍTULO 3.....	47
CAPÍTULO 4.....	53
CAPÍTULO 5.....	59
IV. CONSIDERAÇÕES FINAIS	80

I. INTRODUÇÃO GERAL

I.1. Lutjanídeos

Lutjanidae é uma família composta de quatro subfamílias, 17 gêneros e 103 espécies, sendo em sua maioria composta de peixes marinhos habitantes de regiões recifais, e embora os representantes da família Lutjanidae estejam presentes mais comumente em regiões marinhas tropicais e subtropicais, três espécies do gênero *Lutjanus* do Indo-Pacífico habitam águas continentais, e os juvenis de diversas outras espécies são encontradas em águas salobras de estuários (FAO, 2010). A família está dividida em quatro discretas faunas geográficas: Pacífico Oriental, Indo-Pacífico Ocidental, Atlântico Ocidental e Atlântico Oriental (FAO, 2010). A maioria das espécies é encontrada em fundos rochosos e coralíneos de pouca profundidade, porém algumas se encontram a mais de 200 m. As espécies de águas rasas são em geral de hábitos tróficos noturnos, sendo que durante o dia se encontram entre as formações recifais, solitárias ou formando grupos mais ou menos numerosos (CERVIGÓN, 1993).

Internacionalmente conhecidos como *snappers*, os lutjanídeos pertencem a uma das maiores famílias de peixes teleósteos, podendo ser carnívoros, piscívoros ou planctófagos (CHOW, 1993). De acordo com Rezende et al. (2003), os lutjanídeos são considerados peixes de grande qualidade e importância no mercado, estando entre os mais importantes recursos pesqueiros distribuídos nas regiões tropicais e subtropicais. Esta família já foi reportada em diversos estudos com foco em biologia pesqueira, reprodução, idade e crescimento, sistema de cultivo, nutrição, desova e larviculturas (BENETTI et al., 2002; EMATA et al., 2003; KAMUKURU; MGAYA, 2004; DUMAS et al., 2004; CASTILLO-VARGASMACHUCA et al., 2007).

Peixes do gênero *Lutjanus* em condições de cultivo, apresentam rápido crescimento e podem ser considerados como potenciais espécies para aquicultura, em função de seu desempenho produtivo, elevada demanda e o alto preço alcançado no mercado (WATANABE, 2001). De acordo com Sanches (2007), o desenvolvimento do cultivo de lutjanídeos e a conseqüente diminuição da pressão de pesca sobre os estoques

naturais, poderá constituir um instrumento de preservação desse importante grupo de peixes recifais.

I.2. *Lutjanus jocu* (Bloch & Schneider, 1801)

O dentão *Lutjanus jocu* (Bloch & Schneider, 1801) pertence à Família Lutjanidae, onde se encontram os peixes recifais. Em sua família também são encontradas espécies como ariocó (*L. synagris*), pargo verdadeiro (*L. purpureus*), caranha (*L. griseus*), pargo-olho-de-vidro (*L. vivanus*) e o vermelho (*L. aya*) (FERREIRA, 2004).

Taxonomicamente sua classificação segue abaixo:

Classe: Osteichthyes

Subclasse: Neopterygii

Divisão: Teleostei

Superordem: Acantopterygii

Ordem: Perciformes

Família: Lutjanidae

Gênero: *Lutjanus*



Figura 1. Realização de biometria em um juvenil de dentão (*Lutjanus jocu*) cultivado em laboratório.

Descrito por Allen (1985), seu corpo é amarronzado na parte superior e na inferior avermelhada. Abaixo do olho há uma faixa triangular e uma série de pontos azulados da maxila superior até a margem do opérculo. A curvatura superior é mais acentuada que a inferior. Nadadeira caudal emarginada, levemente furcada. Nadadeiras peitorais longas, que atingem o nível do ânus. Apresentam dentes bem desenvolvidos em ambas as maxilas. Um dos pares de caninos na mandíbula superior notavelmente grandes, visíveis, mesmo quando a boca está fechada. Espinhos dorsais (total): 10; raios dorsais (total): 14-15; espinhos anais 3; Raios anais: 8. Pode atingir um comprimento total de 128 cm, mas é mais comumente encontrado com 60 cm. Sua distribuição estende-se de Massachusetts, EUA, até São Paulo, Brasil, e podem ser encontrados em águas marinhas, salobras e doce (um dos únicos lutjanídeos que pode ser encontrado em água doce). Enquanto jovens habitam águas nas zonas entre-marés, baías e estuários. Na região costeira, quando adultos, estão associados principalmente a fundos rochosos e recifes de corais, podendo chegar a profundidades de até 40m. Alimentam-se principalmente de peixes e invertebrados bentônicos, incluindo camarões, caranguejos, gastrópodes e cefalópodes. São dioicos, possuem fertilização externa e não apresentam cuidado parental, onde estudos de maturidade indicam que essa espécie fica madura sexualmente por volta dos 35 cm.

I.3. Piscicultura Marinha

O desenvolvimento da piscicultura marinha através de peixes com valor econômico, torna-se uma iniciativa fundamental na preservação dos estoques pesqueiros, e vem aumentando progressivamente nos últimos anos (FAO, 2016). O cultivo bem-sucedido depende que peixes selvagens sejam levados para o laboratório de reprodução com sucesso (STIEGLITZ et al., 2017).

No entanto, a piscicultura marinha no Brasil ainda é incipiente e experimental, podendo observar que a prática de cultivo de peixes em águas interiores é bem mais conhecida e difundida em relação ao cultivo marinho, exceto para espécies exóticas, como camarão branco do Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) e a ostra do Pacífico (*Crassostrea gigas*) que vêm dominando a aquicultura nacional. Portanto, é latente a

necessidade de promover desenvolvimento científico e tecnológico aplicado as espécies marinhas nativas.

Dentre os aspectos evidenciados por diversos autores, que caracterizam as espécies de peixes como ideais para o cultivo, destacam-se: o bom crescimento e a conversão alimentar, o alto rendimento de biomassa por unidade de volume, tolerância às condições do meio ambiente e adaptação aos sistemas de cultivo (CERQUEIRA; TSUZUKI, 2009). Atualmente as espécies de peixes marinhos autóctones do Brasil, que são alvo para cultivo, pertencem às famílias Centropomidae (robalos), Serranidae (garoupas), Lutjanidae (cioba e dentão), Mugilidae (tainhas), Rachycentridae (bijupiras), Gerreidae (carapeba).

A escolha da espécie de peixe a ser trabalhada deve levar em consideração características biológicas e zootécnicas essenciais:

- a) Hábito alimentar (incluindo adaptação à alimentação artificial);
- b) Resistência à doenças;
- c) Resistência ao manejo;
- d) Valor agregado de comercialização;
- e) Facilidade de produção de alevinos;
- f) Ganho de peso.

O cultivo comercial de lutjanídeos vem crescendo consideravelmente nos trópicos (América Central e Caribe), e várias iniciativas de pesquisa estão em andamento na América do Sul e nos Estados Unidos, mostrando sua importância e potencial para a aquicultura (CASTILLO-VARGASMACHUCA et al., 2018). No Brasil, estudos foram desenvolvidos com foco em reprodução em laboratório (FERNANDES et al., 2012; SANCHES et al., 2015) e dietas (SANCHES, 2011).

I.4. Avaliação de estresse no cultivo de peixes

As respostas fisiológicas dos peixes aos estressores ambientais, como mudanças na salinidade ambiental e doenças, foram amplamente agrupadas em primárias, secundárias e terciárias (BARTON, 2002). As respostas primárias envolvem a ativação do sistema nervoso simpático, resultando na liberação de catecolaminas do tecido cromaffínico (REID et al., 1998), culminando no aumento do cortisol plasmático (WENDELAAR BONGA, 1997). Respostas secundárias geralmente são definidas como as ações e efeitos imediatos desses hormônios no nível do tecido, e as respostas terciárias se estendem ao nível do organismo e da população e se referem a aspectos do desempenho de animais inteiros, como mudanças no crescimento (MOMMSEN et al., 1999).

Em peixes, a glicose é a fonte primária de energia, atendendo principalmente à demanda do cérebro e dos músculos. Numa situação de estresse, o aumento de seus níveis no sangue é relatado para vários teleósteos e se deve à ação das catecolaminas na quebra de glicogênio hepático (WENDELAAR BONGA, 1997). Nesta situação, o lactato também pode ser utilizado como fonte glicogênica, em circunstância de maior disponibilidade (MOMMSEN et al., 1999).

A avaliação da composição e dos elementos celulares do sangue é uma ferramenta diagnóstica capaz de indicar o estado fisiológico dos animais, ajudando a atestar sua sanidade. Ademais, pode ser parte de exames clínicos de rotina ou acompanhar animais acometidos por enfermidades (CLAUSS et al. 2008), desde que os valores de referência de cada espécie tenham sido estabelecidos (VÁZQUEZ; GUERRERO, 2007).

O monitoramento da saúde de peixes através de técnicas não letais tem sido cada vez mais necessário devido à expansão da aquicultura. O exame de sangue é uma das técnicas utilizadas para tal, sendo essencial o conhecimento da morfologia celular sanguínea de cada espécie de peixe (HRUBEC et al. 2000). Assim, será possível o estabelecimento de valores de referência pois, sem a definição dos padrões considerados normais, não é possível diferenciar os estados sadios de estados patológicos dos organismos.

Muito do conhecimento acerca da hematologia de peixes e outros vertebrados é baseado em mamíferos, e o estudo do sangue de vertebrados não-mamíferos é relativamente novo, reportando pouca literatura disponível sobre ontogenia, função e estrutura das células sanguíneas (CLAVER; QUAGLIA, 2009). A quantidade de bibliografia disponível acerca de intervalos de referência e interpretação de análises sanguíneas de peixes é relativamente limitada, o que é esperado devido ao enorme número de espécies que são criadas ou pesquisadas (GRANT, 2015). Assim sendo, a utilização da hematologia como ferramenta de análise clínica em peixes é muito restrita, principalmente pela falta de conhecimento básico dos padrões das diversas espécies, sendo espécie-específicos e frequentemente não permitindo generalizações (HRUBEC; SMITH, 2010).

A análise de avaliação hematológica pode alavancar a criação de peixes por facilitar a detecção precoce de enfermidades e ou doenças que prejudicam o desempenho dos animais (REHULKA et al. 2004). Isso contribuirá para que, no futuro, o tratamento de doenças possa ser mais específico, rápido e efetivo (TAVARES DIAS; MORAES, 2006). Além de trabalhos que descrevem os perfis hematológicos de peixes voltados para a aquicultura, muitos trabalhos em hematologia de teleósteos utilizam como base comparativa um grupo de indivíduos “controle”, e nas mesmas condições de confinamento dos animais que estão sendo submetidos a experimentos nas mais diversas áreas. Esta estratégia tem sido importante para aumentar o banco de dados hematológicos existente na literatura, apesar de ainda existirem muitas lacunas na interpretação das análises sanguíneas em peixes (GRANT, 2015).

Os teleósteos gastam energia química para efetivar a regulação iônica de seu meio interno, que se mantém diferente das concentrações iônicas do meio externo, sendo caracterizados como osmorreguladores (HWANG et al., 2011). São capazes de manter a homeostase iônica e osmótica de seus fluidos corporais através das salinidades ambientais, usando mecanismos osmorreguladores, que são processos que demandam energia, podendo o crescimento dos peixes ser maximizado a partir das salinidades selecionadas que diminuiriam o gasto energético para manter a homeostase (SAMPAIO; BIANCHINI, 2002).

Peixes marinhos apresentam uma concentração osmótica sanguínea (cerca de 300-350 mOsm/kg) de aproximadamente um terço da concentração osmótica da água do mar (cerca de 1.000 mOsm/kg), sendo hiposmóticos em relação ao meio em que vivem. Assim, apresentam dois problemas osmorregulatórios gerais: entrada de sais por difusão e perda de água por osmose (BALDISSEROTTO, 2013). Considerando o custo osmorregulador como sendo proporcional ao gradiente osmótico existente entre os fluidos corporais dos peixes e o meio externo (HANDELAND et al., 1998), é razoável esperar que o crescimento seja maximizado quando o peixe for criado em água com salinidade próxima à condição isosmótica.

I.5. Parasitismo em peixes cultivados

O parasitismo constitui o estilo de vida mais comum sobre a terra, uma vez que há representantes de inúmeros grupos zoológicos permanente ou temporariamente envolvidos nesta relação interespecífica (THOMPSON, 1994). Os estudos referentes à patologia e parasitologia de peixes são temas de crescente importância no contexto mundial. Estima-se que existam cerca de dez mil espécies de parasitas de peixes descritas, distribuídas em vários grupos zoológicos como, por exemplo, Protozoa com 1750, Monogenea com 1500, Digenea com 1750, Cestoda com 1000, Nematoda com 700, Acanthocephala com 400 e Crustacea com 2590 espécies (EIRAS, 1994).

O desenvolvimento da produção em cultivos intensivos geralmente está associado com o surgimento de doenças parasitárias (KENT, 2000). Essas doenças podem ter sérios impactos econômicos, não somente causando perdas com a mortalidade dos peixes, mas também aumentando os custos de produção, através dos gastos com tratamentos, ou com a redução na qualidade da produção (NOWAK, 2007). Com isso, após a implantação, a maior preocupação em cultivos marinhos passa a ser o controle e a prevenção das doenças (RUCKERT et al., 2009). Para que cultivos intensivos tornem-se economicamente viáveis é necessário o tratamento de parasitos, bem como um manejo sanitário adequado (SENG, 1997).

Com a ampliação dos cultivos, um grande número de enfermidades tem sido relatado em diversas espécies de peixes marinhos de importância comercial,

destacando-se àquelas causadas pelos ectoparasitos. Muitos trabalhos indicam problemas com infestações desse parasita em várias partes do mundo, em diferentes espécies de peixes. Deveney et al. (2001) relatam a existência de *Neobenedenia melleni* em um cultivo de *Lates calcarifer* (barramundi) na Austrália, que provocou a mortalidade de mais de duzentos mil peixes, o que reforça o potencial patogênico deste parasito. Ernst et al. (2002) relatam que 20% do total dos custos de produção de espécies de *Seriola* sp. em tanques-rede no Japão são destinados ao combate de *Benedenia seriolae*.

Segundo Luque e Poulin (2007), nosso conhecimento sobre a biodiversidade de parasitas de peixes na América Latina ainda é bastante limitado, a distribuição do esforço de estudo tem sido bastante heterogênea e as espécies de peixes mais conhecidas não foram examinadas quanto a parasitas.

Neobenedenia melleni (MacCallum, 1927) é um conhecido patógeno de teleósteos confinados que exhibe baixo grau de especificidade ao hospedeiro (BULLARD et al., 2003). Há registros de mais de 100 espécies de peixes teleósteos, pertencentes a mais de 30 famílias, de cinco ordens, com registro de parasitismo por *N. melleni* (WHITTINGTON, 2004).

Os copépodes são patógenos amplamente difundidos nos cultivos de teleósteos marinhos ao redor do mundo (SANCHES, 2012). O gênero *Caligus* possui o maior número de espécies em sua família, compreendendo mais de 250 espécies, e também é o gênero mais representado no Brasil, totalizando 31 espécies encontradas no ambiente marinho (LUQUE et al., 2013). Embora tenham sido encontradas em 55 espécies de peixes da costa brasileira, não há registros de espécies de Caligidae que parasitem espécies de peixes Lutjanidae na costa brasileira (LUQUE; TAVARES, 2007; LUQUE et al., 2013).

II. OBJETIVO GERAL

O presente estudo tem dois objetivos principais. O primeiro é relativo à caracterização bioquímica e hematológica e respostas de estresse de *Lutjanus jocu* sob diferentes condições: transporte, parasitismo e diferentes salinidades. O segundo visa investigar os principais parasitos em dentão cultivado, relatando sua ocorrência no Atlântico Sul.

II.1. Objetivos Específicos

Avaliar as repostas de estresse no dentão (*Lutjanus jocu*) durante o procedimento de transporte, através de repostas hematológicas e bioquímicas.

Relatar a primeira ocorrência de *Neobenedenia melleni* em dentão (*Lutjanus jocu*) no oeste do Atlântico Sul.

Avaliar a condição e resposta imunológica através de parâmetros bioquímicos e hematológicos em dentão (*Lutjanus jocu*) com a infestação por *Neobenedenia melleni* e após o tratamento com banho de água doce e aplicação injetável de levamisol.

Relatar o primeiro registro de *Caligus asperimanus* Pearse, 1951 no Atlântico Sul Ocidental parasitando *Lutjanus jocu*.

Avaliar a influência da salinidade (0-30) nos parâmetros bioquímicos e hematológicos em juvenis do dentão (*Lutjanus jocu*).

III. REFERÊNCIAS

ALLEN, Gerald R. Snappers of the world: an annotated and illustrated catalogue of lutjanid species known to date. Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1985.

BALDISSEROTTO, B. Fisiologia de peixes aplicada à aquicultura. Santa Maria. 3^a Ed. Santa Maria: Editora UFSM, 2013.

BARTON, Bruce A. Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. Integrative and comparative biology, v. 42, n. 3, p. 517-525, 2002.

BENETTI, Daniel D. et al. Growth, survival, and feed conversion rates of hatchery-reared mutton snapper *Lutjanus analis* cultured in floating net cages. Journal of the World Aquaculture Society, v. 33, n. 3, p. 349-357, 2002.

BULLARD, Stephen A. et al. A new geographic locality and three new host records for *Neobenedenia melleni* (MacCallum)(Monogenea: Capsalidae). Gulf and Caribbean Research, v. 15, n. 1, p. 1-4, 2003.

CASTILLO-VARGASMACHUCA, Sergio et al. Effect of the initial stocking body weight on growth of spotted rose snapper *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869) in marine floating cages. Revista de Biología Marina y Oceanografía, v. 42, n. 3, p. 261-267, 2007.

CASTILLO-VARGASMACHUCA, Sergio G. et al. The spotted rose snapper (*Lutjanus guttatus* Steindachner 1869) farmed in marine cages: review of growth models. Reviews in Aquaculture, v. 10, n. 2, p. 376-384, 2018.

CERVIGON, F. Los peces marinos de Venezuela Volumen II. Caracas, Venezuela: Fundación Científica Los Roques, 1993.

CERQUEIRA, V. R.; TSUZUKI, M. Y. A review of spawning induction, larviculture, and juvenile rearing of the fat snook, *Centropomus parallelus*. *Fish Physiology and Biochemistry*, v. 35, n. 1, p. 17-28, 2009.

CHOW, S. PCR-RFLP analysis on thirteen western Atlantic snappers (subfamily Lutjaninae): a simple method for species and stock identification. *Fish Bull*, v. 30, p. 207-224, 1993.

CLAUSS, Tonya M.; DOVE, Alistair DM; ARNOLD, Jill E. Hematologic disorders of fish. *Veterinary clinics of North America: Exotic animal practice*, v. 11, n. 3, p. 445-462, 2008.

CLAVER, Juan A.; QUAGLIA, Agustin IE. Comparative morphology, development, and function of blood cells in nonmammalian vertebrates. *Journal of exotic pet medicine*, v. 18, n. 2, p. 87-97, 2009.

DEVENEY, Marty R.; CHISHOLM, Leslie A.; WHITTINGTON, Ian D. First published record of the pathogenic monogenean parasite *Neobenedenia melleni* (Capsalidae) from Australia. *Diseases of Aquatic Organisms*, v. 46, n. 1, p. 79-82, 2001.

DUMAS, Silvie et al. Gonadal maturation in captivity and hormone-induced spawning of the Pacific red snapper *Lutjanus peru*. *Aquaculture*, v. 234, n. 1-4, p. 615-623, 2004.

EIRAS, J. C. Elementos de ictioparasitologia Fundação Eng. Antonio de Almeida, Porto, Portugal, v. 339, 1994.

EMATA, Arnil C. Reproductive performance in induced and spontaneous spawning of the mangrove red snapper, *Lutjanus argentimaculatus*: a potential candidate species for sustainable aquaculture. *Aquaculture Research*, v. 34, n. 10, p. 849-857, 2003.

ERNST, I. et al. Monogenean parasites in sea-cage aquaculture. *Austasia Aquaculture*, v. 16, p. 46-48, 2002.

FAO. Aquaculture Department. The state of world fisheries and aquaculture, p. 197, 2010.

FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2016: contributing to food security and nutrition for all. Rome. p.200, 2016.

FERNANDES, Cezar AF et al. Reproduction of the Brazilian snapper, *Lutjanus alexandrei* Moura & Lindeman, 2007 (Perciformes: Lutjanidae), off the northern coast of Pernambuco, Brazil. *Neotropical Ichthyology*, v. 10, n. 3, p. 587-592, 2012.

FERREIRA, B. P. et al. Dinâmica de populações e avaliação dos estoques dos recursos pesqueiros da região Nordeste. Lessa, RP; Nóbrega, MF & Bezerra Junior, JL Programa de Avaliação Sustentável dos Recursos Vivos da ZEE do Brasil, 2004.

GRANT, Krystan R. Fish hematology and associated disorders. *Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice*, v. 18, n. 1, p. 83-103, 2015.

HANDELAND, S. O. et al. Effects of temperature and salinity on osmoregulation and growth of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts in seawater. *Aquaculture*, v. 168, n. 1-4, p. 289-302, 1998.

HRUBEC, Terry C.; CARDINALE, Jenifer L.; SMITH, Stephen A. Hematology and plasma chemistry reference intervals for cultured tilapia (*Oreochromis hybrid*). *Veterinary clinical pathology*, v. 29, n. 1, p. 7-12, 2000.

HRUBEC, T.C.; SMITH, S.A. Hematology of fishes. In: WEISS, DJ & WARDROP, KJ. *Schalm's veterinary hematology*. 6 ed. Ames: Blackwell Publishing. Cap.126, p. 994-1004, 2010.

HWANG, Pung-Pung; LEE, Tsung-Han; LIN, Li-Yih. Ion regulation in fish gills: recent progress in the cellular and molecular mechanisms. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 301, n. 1, p. R28-R47, 2011.

KAMUKURU, A. T.; MGAYA, Y. D. Effects of exploitation on reproductive capacity of blackspot snapper, *Lutjanus fulviflamma* (Pisces: Lutjanidae) in Mafia Island, Tanzania. *African Journal of Ecology*, v. 42, n. 4, p. 270-280, 2004.

KENT, Michael L. Marine netpen farming leads to infections with some unusual parasites. *International Journal for Parasitology*, v. 30, n. 3, p. 321-326, 2000.

LUQUE, J. L.; POULIN, R. Metazoan parasite species richness in Neotropical fishes: hotspots and the geography of biodiversity. *Parasitology*, v. 134, n. 6, p. 865-878, 2007.

LUQUE, Jose L.; TAVARES, Luiz ER. Checklist of Copepoda associated with fishes from Brazil. *Zootaxa*, v. 1579, n. 1, p. 1-39, 2007.

LUQUE, Jose Luis et al. Checklist of Crustacea parasitizing fishes from Brazil. *Check List*, v. 9, p. 1449, 2013.

MOMMSEN, Thomas P.; VIJAYAN, Mathilakath M.; MOON, Thomas W. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, v. 9, n. 3, p. 211-268, 1999.

NOWAK, Barbara F. Parasitic diseases in marine cage culture—an example of experimental evolution of parasites?. *International Journal for Parasitology*, v. 37, n. 6, p. 581-588, 2007.

REHULKA, Jiri; MINARÍK, Bohumil; REHULKOVÁ, Eva. Red blood cell indices of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) in aquaculture. *Aquaculture Research*, v. 35, n. 6, p. 529-546, 2004.

REID, Stephen G.; BERNIER, Nicholas J.; PERRY, Steve F. The adrenergic stress response in fish: control of catecholamine storage and release. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, v. 120, n. 1, p. 1-27, 1998.

REZENDE, S. M.; FERREIRA, Beatrice Padovani; FREDOU, Thierry. A pesca de lutjanídeos no Nordeste do Brasil: histórico das pescarias, características das espécies e relevância para o manejo. *Bol. Téc. Cient. CEPENE*, v. 11, p. 257-270, 2003.

RUCKERT, Sonja; KLIMPEL, Sven; PALM, Harry Wilhelm. Parasites of cultured and wild brown-marbled grouper *Epinephelus fuscoguttatus* (Forsskål, 1775) in Lampung Bay, Indonesia. *Aquaculture Research*, v. 41, n. 8, p. 1158-1169, 2010.

SAMPAIO, Luis André; BIANCHINI, Adalto. Salinity effects on osmoregulation and growth of the euryhaline flounder *Paralichthys orbignyanus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 269, n. 2, p. 187-196, 2002.

SANCHES, E. G. Piscicultura marinha no Brasil: uma alternativa de produção e conservação. *Aquicultura e Pesca*, v. nov/dez, p. 16-22, 2007.

SANCHES, Eduardo Gomes. Criação do vermelho-cioba (*Lutjanus analis*) submetido a diferentes dietas. *Bioikos*, v. 25, n. 1, 2011.

SANCHES, Eduardo Gomes et al. First record of *Caligus mutabilis* (Copepoda: Caligidae), in sea-farmed *Mycteroperca microlepis* (Perciformes: Serranidae) in Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 21, n. 3, p. 330-333, 2012.

SANCHES, E. G. et al. Sperm cryopreservation of lane snapper *Lutjanus synagris* (Linnaeus, 1758). *Brazilian Journal of Biology*, v. 75, n. 3, p. 662-669, 2015.

SENG, Leong Tak. Control of parasites in cultured marine finfishes in Southeast Asia—an overview. *International Journal for Parasitology*, v. 27, n. 10, p. 1177-1184, 1997.

STIEGLITZ, John D. et al. Capture, transport, prophylaxis, acclimation, and continuous spawning of Mahi-mahi (*Coryphaena hippurus*) in captivity. *Aquaculture*, v. 479, p. 1-6, 2017.

TAVARES DIAS, Marcos Tavares; DE MORAES, Flávio Ruas. Hematological parameters for the *Brycon orbignyanus* Valenciennes, 1850 (Osteichthyes: Characidae) intensively bred. *Hidrobiológica*, v. 16, n. 3, p. 271-274, 2006.

THOMPSON, John N. *The coevolutionary process*. University of Chicago Press, 1994.

VÁZQUEZ, G. Rey; GUERRERO, G. A. Characterization of blood cells and hematological parameters in *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). *Tissue and cell*, v. 39, n. 3, p. 151-160, 2007.

WATANABE, Wade O. *Species profile: Mutton snapper*. Southern Regional Aquaculture Center, 2001.

WENDELAAR BONGA, Sjoerd E. The stress response in fish. *Physiological reviews*, v. 77, n. 3, p. 591-625, 1997.

WHITTINGTON, Ian D. The Capsalidae (Monogenea: Monopisthocotylea): a review of diversity, classification and phylogeny with a note about species complexes. *Folia Parasitologica*, v. 51, n. 2/3, p. 109, 2004.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM OCEANOGRAFIA AMBIENTAL**

CAPÍTULO 1

**Hematological and biochemical characteristics during the transport of
dog snapper *Lutjanus jocu* (Perciformes: Lutjanidae)**

(Artigo publicado na revista Neotropical Ichthyology – Novo Qualis A4)

**VITÓRIA
2020**

Original article

Hematological and biochemical characteristics during the transport of dog snapper *Lutjanus jocu* (Perciformes: Lutjanidae)

Bruno L. Oliveira¹, Rodrigo M. Souza², Jorge P. Silva Filho³, Levy C. Gomes⁴
and Luiz F. Loureiro Fernandes³

The objective of this study was to evaluate stress responses in dog snapper (*Lutjanus jocu*) during transport by evaluating their hematological and biochemical responses. Twenty-five wild dog snapper specimens were used in the experiment (220 ± 68 g and 24.5 ± 2.5 cm total length). Blood samples were collected prior to transport (control), and fish were placed in two transport boxes, one with anesthetic and one without anesthetic. Immediately after transport and after 24 h, blood was collected from the fish that underwent each treatment (with anesthetic and without anesthetic). Biochemical and hematological results demonstrated the inefficiency of benzocaine as a stress reliever during handling and transport. Biochemical parameters revealed the effects of stress during transport, and after 24 h, glucose levels and hematological parameters (hemoglobin, erythrocytes, leukocytes, neutrophils and MCH) showed a tendency to return to control levels. This study is the first to report stress response measurements of hematological and biochemical indicators in dog snapper, representing an important basis for the planning of future experiments involving the transport and handling of this fish species.

Keywords: Anesthetic, Benzocaine, Glucose, Lactate, Marine fish.

O objetivo deste estudo foi avaliar as repostas de estresse em dentão (*Lutjanus jocu*) durante o procedimento de transporte, através de repostas hematológicas e bioquímicas. Vinte e cinco exemplares selvagens de dentão foram utilizados no experimento (220 ± 68 g e 24.5 ± 2.5 cm de comprimento total). Foram realizadas coletas de sangue previamente ao transporte (controle), e os demais peixes foram acondicionados em duas caixas de transporte, uma com anestésico e outra sem anestésico. Imediatamente após o transporte e após 24 h, houve coleta de sangue para cada tratamento (com anestésico e sem anestésico). Os resultados bioquímicos e hematológicos apontam a ineficiência da benzocaína como mitigador do estresse durante o manuseio e transporte. Os parâmetros bioquímicos foram capazes de detectar o efeito do estresse durante o transporte, e após 24 h os níveis de glicose e alguns parâmetros hematológicos (hemoglobina, eritrócitos, leucócitos, neutrófilos e MCH) demonstraram uma tendência de retorno aos níveis do controle. Este trabalho é o primeiro a informar os níveis de resposta basal e de estresse para indicadores hematológicos e bioquímicos em dentão, representando uma base importante para o planejamento de futuras experiências com transporte e manejo dessa espécie.

Palavras-chave: Anestésico, Benzocaína, Glicose, Lactato, Peixe marinho.

Introduction

The development of marine fish farming through the use of fish with economic value is essential for the preservation of fish stocks and has increased steadily in recent years (FAO, 2016). The success of rearing depends on the successful transport of wild fish to the breeding

laboratory, including capture, transport, prophylaxis and acclimation to rearing conditions (Bar *et al.*, 2015; Sampaio, Freire, 2016; Stieglitz *et al.*, 2017).

There is little scientific information on the transport of wild-caught fish and a growing demand for data to enable the establishment of specific and scientifically grounded protocols (Harmon, 2009; Sampaio, Freire, 2016). Blood

¹Programa de Pós-Graduação em Oceanografia Ambiental, Base Oceanográfica, Universidade Federal do Espírito Santo. Rodovia ES-010 km 16, 29199-970 Aracruz, ES, Brazil. brunodlo@yahoo.com.br, <https://orcid.org/0000-0003-0108-9759> (corresponding author).

²Laboratório de Cultivo de Organismos Marinhos, Base Oceanográfica, Universidade Federal do Espírito Santo. Rodovia ES-010 km 16, 29199-970 Aracruz, ES, Brazil. rodrigoms_uca@ymail.com

³Departamento de Oceanografia e Ecologia, Universidade Federal do Espírito Santo. Av. Fernando Ferrari 514, 29075-910 Vitória, ES, Brazil. (JPSF) jpintodasilvafilho2@gmail.com, (LFLF) luiz.ufes@gmail.com

⁴Universidade Vila Velha, UVV. Comissário José Dantas de Melo, 21, 29102-770 Vila Velha, ES, Brazil. levy.gomes@uvv.br

analysis can be a rapid, non-lethal and low-cost tool for the early detection of malnutrition, stress and infection in fish, but the lack of hematological and biochemical reference values in healthy animals has limited its application (Peres *et al.*, 2014). Capture, handling and transport procedures can cause various changes in fish, with negative effects on growth, reproduction and immunity, and can even lead to death (Cnaani, McLean, 2009; Cunha *et al.*, 2010; Stieglitz *et al.*, 2012; Hohlenwerger *et al.*, 2016; Shabani *et al.*, 2016; Teixeira *et al.*, 2017).

The use of anesthetics at appropriate concentrations may be a means to reduce fish stress and mortality during transport and handling (Mamangkey *et al.*, 2009; Cunha *et al.*, 2011). Benzocaine is classified as a local anesthetic, although in fish, it acts systemically on the central nervous system (Okamura *et al.*, 2010), where its effects range from mild sedation to medullary collapse (Holloway *et al.*, 2004). However, the use of high concentrations of benzocaine is uneconomical and can cause undesirable effects such as anesthetic induction or mortality (Teixeira *et al.*, 2017).

Snappers (Lutjanidae) are considered important fishery resources worldwide (Frédou *et al.*, 2006; Ibarra-Castro, Duncan, 2007), with high commercial potential for aquaculture (Vettorazzi *et al.*, 2010; Leaw *et al.*, 2012; Souza *et al.*, 2015). Dog snapper, *Lutjanus jocu* (Bloch & Schneider, 1801), is distributed from Florida (USA) to southeastern Brazil and is one of the most important Lutjanidae in Brazilian fisheries (Frédou *et al.*, 2009; Previero *et al.*, 2011). Due to its high market value and its currently declining population (Lindeman *et al.*, 2016), dog snapper is an important species from which to obtain biochemical and hematological information. The establishment of reference blood parameters for *L. jocu* can provide a practical tool for monitoring well-being, allowing the safe evaluation of handling procedures that may induce stress (*e.g.*, transport, stocking density, water physicochemical parameters and disease). The objective of this study was to characterize and evaluate the effects of handling and transport on both anesthetized and non-anesthetized dog snapper and on stress levels prior to transport, after the arrival of specimens in the laboratory and 24 h later (recovery) by assessing hematological and biochemical responses.

Material and Methods

Experimental design and sampling. The twenty-five dog snapper (*Lutjanus jocu*) specimens used in this experiment (220 ± 68 g and 24.5 ± 2.5 cm in total length) were captured by fishermen in the Piraquimirim river estuary, Aracruz, state of Espírito Santo (ES), southeastern Brazil ($19^{\circ}56'S$ $40^{\circ}10'W$), using a gillnet with a length of 100 m, a height of 1.5 m and a mesh size of 80 mm. The fish were then placed near the capture site in a cage with a 4 m³ (2 x 2 x 1 m) working volume. The

cage was deployed in an estuarine region, approximately 6 km distance from the mouth of the river and at an average depth of 4 m. The time between the first and last capture was 30 days. The fish placed in the cage were fed daily with fresh fish provided by a local fisherman. After the last capture, 20 days elapsed before the experiment was performed, with feeding being interrupted one day before the beginning of the experiment. There was no mortality during the period of time in which the fish were kept in the cage.

After the acclimation period, 5 specimens were collected from the cage (Control; T-0) and sedated with benzocaine (50 mg L⁻¹) for immediate blood collection and biometric measurement. Afterward, the remaining fish were placed in two 80-liter transport boxes with constant aeration, 10 in a box containing 10 mg L⁻¹ benzocaine and 10 in a box without anesthetic, and transported by boat to the Marine Organisms Rearing Laboratory of the Universidade Federal do Espírito Santo, a travel time of 2 h. Immediately after transport, 5 fish from each treatment group (with anesthetic: A-1, without anesthetic: C-1) were taken for blood collection and biometric measurements. After 24 h, the remaining fish were collected for the same procedures (with anesthetic: A-24, without anesthetic: C-24).

The fish subjected to a 24 h recovery treatment were placed in two 1,000 L tanks (with and without anesthetic), with water collected from the mouth of the same river where the fish were captured and caged, filtration through 3 filters of 15, 10 and 5 microns, an ultraviolet (UV) sterilization system and constant aeration. Temperature, salinity, dissolved oxygen and pH data were collected with a portable multiparameter probe. Ammonia was measured using a commercial colorimetric kit (Alfakit®, Brazil). These parameters were collected during transport and in the laboratory. The water was not changed due to the low stocking density and short duration of captivity (24 h). All research was conducted in accordance with the policies of the Ethical Conduct Committee on Animal Use (CEUA) as administered by the Universidade Federal do Espírito Santo (Protocol 96/2015). The collection license was provided by Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio; license number SISBIO 52082-2). The specimen was vouchered at the ichthyology collection of the Universidade Federal do Espírito Santo (CIUFES 3552).

Analytical procedures. Blood was collected by caudal puncture using a 1-mL EDTA-containing syringe, a procedure lasting less than 2 min, to avoid elevation of any biochemical parameters by handling during collection. The extracted blood samples were divided among two sets of tubes, one containing EDTA (10%) as an anticoagulant for sample preservation for hematological analyses and another heparinized for the determination of plasma glucose and lactate levels.

The hematocrit (%) was measured after the blood samples were centrifuged in heparinized microcapillary tubes. To perform an erythrocyte count, 1:200 dilutions in staining solution (Na₂EDTA, formaldehyde, NaCl, NaOH, methylene blue) were performed, and cells were counted directly in a Neubauer chamber under an optical microscope (Olympus CX41).

To perform differential and total counts of leukocytes and thrombocytes, blood smears were prepared, dried at room temperature, fixed and stained with quick panoptic stain (commercial kit RENYLAB®, Brazil), and indirect counting was performed according to Hrubc, Smith (1998). From these results, mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH) and mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) were calculated according to Wintrobe (1934). Plasma glucose and hemoglobin concentrations (commercial kit Bioclin®, Brazil) and plasma lactate concentrations (commercial kit BioTecnica®, Brazil) were measured by colorimetric and spectrophotometer analysis.

Statistical analysis. Before statistical analyses were conducted, the homogeneity and normality of the raw data were assessed. Statistical analyses were performed separately for each parameter using analysis of variance (ANOVA), and comparisons between groups (treatments) were performed using Tukey's test ($p < 0.05$). The results are presented as the means and standard deviations, and all analyses were performed using software PAST v.3.15 (Hammer *et al.*, 2001).

Results

Water quality. The water quality parameters in the boxes before the fish were introduced until their arrival in the laboratory were as follows: salinity 27, temperature 27.7 ± 0.6 °C, dissolved oxygen 6.8 ± 0.8 mg L⁻¹, pH 6.3 ± 0.15 , ammonia 0.4 ± 0.2 mg L⁻¹. The water quality parameters in the laboratory were as follows: salinity 28, temperature 27.5 ± 0.3 °C, dissolved oxygen 7.3 ± 0.2 mg L⁻¹, pH 7.3 ± 0.1 , and ammonia 0.6 ± 0.2 mg L⁻¹.

Cell morphology. The mature erythrocytes of *Lutjanus jocu* are oval to ellipsoidal in shape with a central nucleus and clear and homogeneous eosinophilic cytoplasm (Fig. 1a). In the young erythrocyte, the cytoplasm presents intense basophilia and dense chromatin (Fig. 1b). The thrombocytes were predominantly elliptical, with an elongated nucleus extending along almost the entire cell; oval cells were occasionally observed. The cytoplasm was scarce, with clear eosinophilic staining (Fig. 1c).

Of the leukocytes that are responsible for immune defense, neutrophils, lymphocytes and monocytes were found, but no eosinophils, basophils and special granulocytic cells were observed. The neutrophils were spherical in shape and their nuclei were most often round or oval, with compact chromatin and no visible nucleolus.

The cytoplasm was generally abundant, occupying almost the entire cell and containing slightly basophilic fine granules (Fig. 1d). There was a significant difference in neutrophils levels between control and other treatments.

The lymphocytes were predominantly spherical, of varied size, with clear basophilic cytoplasm, presenting cytoplasmic projections and without visible granules. The nucleus had a rounded form, dense chromatin, and a high nucleus-to-cytoplasm ratio (Fig. 1e). For lymphocytes, there was a significant difference before and 1 h after transport, but did not exhibit significant differences after 24h. The observed monocytes were large, spherical and polymorphic. Eccentric nuclei predominated, with the occasional reniform nucleus, compact chromatin, intensely basophilic cytoplasm and vacuolization (Fig. 1f).

Hematological analysis. There was no mortality during the experiment. The reference intervals for dog snapper blood parameters are summarized (Tab. 1). There were no significant differences in parameters between treatments with or without anesthetic, both immediately after transport (A1 and C1) and after a recovery period of 24 h after transport (A24 and C24).

Hematological parameters were compared between fish before transport, immediately after transport and 24 h after transport (recovery). Hemoglobin values varied for the dog snapper and did not exhibit significant differences ($p < 0.05$) between control and treatments immediately after transport (A-1 and C-1), but differences were observed between A-1 and C-1 and recovery values (A-24 and C-24). For the erythrocyte count, only the C-24 treatment (without anesthetic) exhibited high values that differed significantly from the other treatments. Hematocrit differed significantly only in C-1.

For the leukocyte count, only the C-24 treatment showed a significant difference from the other groups. Lymphocytes and neutrophils were more frequent among the leukocytes, with a low frequency of neutrophils in the control treatment, whereas monocytes and thrombocytes had similar counts between the treatments. For MCV, there was a significant difference between the control and recovery (24 h) treatments; MCH showed differences only between the immediately after transport and recovery treatments and MCHC did not present differences between any of the treatments.

Biochemical analysis. Tab. 1 shows no significant differences ($p < 0.05$) in glucose and lactate levels between the treatments with and those without anesthetic. There was a significant increase in glucose levels immediately after transport, and a decrease after 24 h of transport, reaching levels close to those of the control group. Lactate concentrations did not show significant differences between the group sampled immediately after transport and the group sampled after 24 h of recovery.

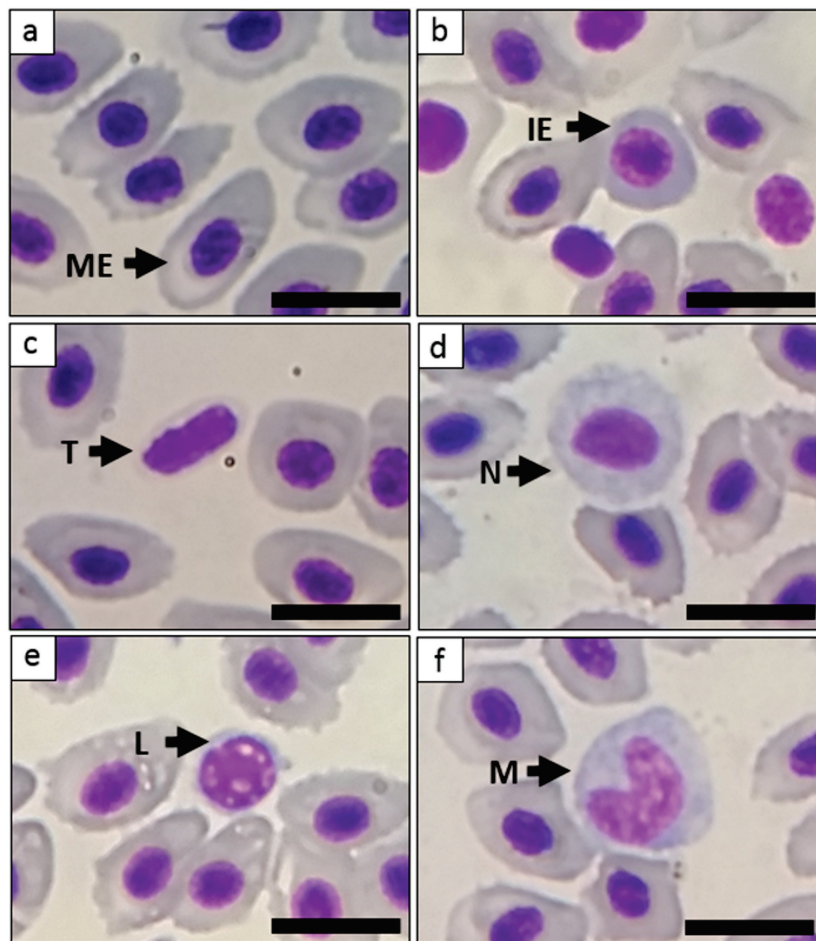


Fig. 1. Photomicrographs of a peripheral blood smear of *Lutjanus jocu* showing a corresponding sequence of images: **a.** Mature Erythrocyte (ME); **b.** Immature Erythrocyte (IE); **c.** Thrombocyte (T); **d.** Neutrophil (N); **e.** Lymphocyte (L); and **f.** Monocyte (M). Scale bars = 10 μm .

Tab. 1. Biochemical and hematological parameters of *Lutjanus jocu*. Mean values \pm SEM. Different letter (a, b or c) indicates significant differences ($p < 0.05$) between fish groups. Control: fish collected in the cage prior to transport; A1: collection 1 h after transport to the laboratory with anesthetic; C1: collection 1 h after transport to the laboratory without anesthetic; A24: collection after 24 h in the laboratory of the fish transported with anesthetic; C24: collection after 24 h in laboratory of fish transported without anesthetic.

Parameter	Before transport		After transport		24h after transport		P value
	Control	A1	C1	A24	C24		
Hematological							
Hemoglobin (g dL^{-1})	13.93 \pm 1.30 ab	15.32 \pm 1.03 a	15.89 \pm 1.26 a	12.83 \pm 0.90 b	13.02 \pm 1.17 b	0.0009	
Erythrocytes (10^6 mm^3)	2.6 \pm 0.52 b	2.6 \pm 0.58 b	2.6 \pm 0.57 b	3.5 \pm 0.46 ab	4.0 \pm 0.53 a	0.0006	
Hematocrit (%)	45.7 \pm 4.5 a	34.2 \pm 6.4 ab	34.4 \pm 9.0 b	31.9 \pm 9.2 ab	35.2 \pm 4.6 ab	0.0456	
Leukocyte ($10^3 \mu\text{L}^{-1}$)	47.07 \pm 18.86 b	44.35 \pm 12.47 b	44.21 \pm 15.33 b	73.89 \pm 7.81 ab	94.28 \pm 45.36 a	0.0101	
Neutrophils (%)	14.60 \pm 4.34 c	53.60 \pm 6.19 a	40.20 \pm 5.20 ab	31.80 \pm 7.60 b	35.20 \pm 11.86 b	< 0.0001	
Lymphocytes (%)	75.40 \pm 5.18 a	36.40 \pm 10.01 c	49.60 \pm 7.80 bc	57.60 \pm 6.69 ab	56.80 \pm 15.87 ab	0.0001	
Monocytes (%)	10.00 \pm 6.16 a	10.60 \pm 4.88 a	10.20 \pm 3.83 a	9.80 \pm 3.42 a	8.00 \pm 4.18 a	0.7726	
Thrombocytes ($10^3 \mu\text{L}^{-1}$)	29.48 \pm 10.64 a	33.01 \pm 19.48 a	30.27 \pm 27.39 a	42.89 \pm 20.12 a	40.89 \pm 22.15 a	0.7726	
MCV (μL^{-1})	182.54 \pm 47.90 a	125.59 \pm 49.57 ab	134.97 \pm 25.54 ab	91.17 \pm 23.90 b	88.38 \pm 12.65 b	0.0024	
MCH (%)	55.96 \pm 15.50 ab	62.52 \pm 14.06 a	65.04 \pm 18.95 a	37.13 \pm 4.47 b	33.08 \pm 6.08 b	0.0018	
MCHC (g dL^{-1})	30.72 \pm 4.74 a	46.36 \pm 10.57 a	48.85 \pm 13.05 a	44.11 \pm 17.11 a	37.50 \pm 5.51 a	0.1112	
Biochemical							
Glucose (mg dL^{-1})	74.36 \pm 15.52 b	106.94 \pm 8.91 a	103.57 \pm 14.65 a	64.81 \pm 10.73 b	67.22 \pm 8.89 b	< 0.0001	
Lactate (mg dL^{-1})	9.33 \pm 1.77 b	14.98 \pm 2.76 a	13.77 \pm 2.49 a	10.71 \pm 2.30 ab	11.44 \pm 1.95 ab	0.0055	

Discussion

Hematological parameters assessed during the handling and transport of dog snapper provided important information on physiological conditions and health status, and this is the first study of this kind in this species. The cells identified in *L. jocu* blood smears are morphologically similar to those described by Del Rio-Zaragoza *et al.* (2011) for rose snapper (*Lutjanus guttatus*). The same cell types (erythrocytes, neutrophils, lymphocytes, monocytes and thrombocytes) and morphological patterns were also characterized by Santos *et al.* (2009) in wild fat snook (*Centropomus parallelus*). There is an urgent need to provide reliable reference intervals for fish (Del Rio-Zaragoza *et al.*, 2011), mainly because of the economic importance of dog snapper.

Together with morphological characterizations, physiological responses were evaluated before, during and after transport and handling. The mean hemoglobin values were close to those reported by Del Rio-Zaragoza *et al.* (2011) for rose snapper juveniles reared in tanks in the laboratory, indicating similarities under different environmental conditions. There was no significant difference in hemoglobin levels before and 1 h after transport; however, Roque *et al.* (2010) found significant differences between the control group and a group exposed to hydrogen peroxide in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Hemoglobin levels in the group sampled after 24 h were significantly lower than those in the group sampled immediately after transport, demonstrating rapid recovery. Similar results were reported by Acerete *et al.* (2004) for the handling of Eurasian perch (*Perca fluviatilis*), with no significant difference between the control group and measurements taken 0.5 and 24 h after transport. For erythrocytes, two studies with *Lutjanus* fish found means close to those obtained in this study; Dotta *et al.* (2015) assessed wild red snapper (*Lutjanus analis*) transported to floating cages, and Del Rio-Zaragoza *et al.* (2011) studied rose snapper in laboratory. As with hemoglobin, the different stress responses among wild and farmed *Lutjanus* fish are indicative of good adaptive capacity.

There were no significant differences in hematocrit values between groups before transport and 24 h after transport, and only the C1 treatment exhibited differences compared to the control. No differences were found between treatments for juvenile pompano (*Trachinotus marginatus*) subjected to different salinities (Anni *et al.*, 2016) and cobia (*Rachycentron canadum*) anesthetized with 150 mg L⁻¹ benzocaine (Trushenski *et al.*, 2012). However, other authors have found significant differences in different species under acute stress (Roque *et al.*, 2010; Karakatsouli *et al.*, 2012; Rodrigues *et al.*, 2015). Because hematocrit is a secondary response to acute stress, its values may indicate inconsistent responses and should be evaluated in conjunction with other indicators.

Lymphocytes, which were the most frequently observed leukocytes, are cells involved in immunoglobulin production and defense modulation, while neutrophils are the primary phagocytic leukocytes, which proliferate in the circulation in response to infections, inflammation and stress (Davis *et al.*, 2008), demonstrating their importance in the immune defense of dog snapper. The lymphocyte values found by Del Rio-Zaragoza *et al.* (2011) in rose snapper were higher (between 81 and 92%) than those found in dog snapper (between 36 and 75%). Neutrophils before transport had a mean value of 14%, which is smaller and significantly different from the neutrophil values measured under other treatments (*e.g.*, 53% in the A1 treatment group). This leukocyte class is a first-line defense cell, the most important type of leukocyte in the peripheral blood, and is highly sensitive to environmental changes (Silva, Soriano, 2009).

The frequency of monocytes (8 to 10%) was high when compared to rose snapper (2%), as reported by Del Rio-Zaragoza *et al.* (2011), and juvenile pirarucu, *Arapaima gigas* (4.6%) (Drumond *et al.*, 2010). However, there were no significant differences between treatments, as seen for thrombocytes. There were no significant differences between treatments in MCV, MCH and MCHC, consistent with other studies reporting similar patterns (Del Rio-Zaragoza *et al.*, 2011; Michelato *et al.*, 2017).

Dotta *et al.* (2015) compared the hematological parameters of red snapper (*Lutjanus analis*) individuals who were caught in the wild and later transported to floating cages and found significant differences in hematocrit, leukocytes and monocytes, but no differences in erythrocytes, thrombocytes, lymphocytes and neutrophils. Pinho *et al.* (2016) reported that fat snook (*Centropomus parallelus*) maintained at higher stocking densities presented significantly higher ($p < 0.05$) values of erythrocytes and thrombocytes, whereas hematocrit, leukocyte, neutrophil, monocyte and lymphocyte counts did not differ significantly. These different patterns of responses show the importance of evaluating and interpreting different stressors and environmental conditions in a compartmentalized way. These quantitative differences in hematological parameters should be considered when implementing aquaculture practices for the selection of broodstock for laboratory rearing.

The occurrence of stress during transport was confirmed by an increase in plasma glucose concentration immediately after transport, with values again approaching control values after 24 h of recovery. High glucose production helps animals metabolically cope with the increased energy demands of stress-responsive tissues, and the return to control levels is a common occurrence during transport in fish (Sena *et al.*, 2016). Cnaani, McLean (2009) exposed cobia to hypoxia and found that glucose levels peaked in the first few hours, decreasing to control levels after 24 h. Pedron *et al.* (2016) studied the transport of cobia sedated with benzocaine (6 mg L⁻¹)

and found high glucose levels up to 2 h after transport but were similar to the control values after 48 h.

Lactate levels exhibited sensitivity to stress immediately after transport. This increase may be related to the intense work performed by the anaerobic metabolism, in which so much energy is demanded that the aerobic metabolism alone is not able to sustain energy requirements. A similar response was found by Shabani *et al.* (2016) in the transport of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), with high lactate levels immediately after transport, but with a significant reduction in the recovery periods (24 and 48 h). Fanouraki *et al.* (2011) found an increase in lactate concentrations at 30 min after stress (air exposure) in the species *Sparus aurata*, *Dentex dentex*, *Pagellus erythrinus*, *Diplodus puntazzo* (Sparidae), *Argyrosomus regius* (Sciaenidae) and *Dicentrarchus labrax* (Moronidae). The measurement of glucose and lactate levels is an agile and practical method for assessing stress in fish, both in the field and in the laboratory.

Since glucose and lactate levels effectively respond to acute stress levels after transport, then the hypothesis that adding anesthetic will reduce stress could not be confirmed, either immediately after stress or 24 h later. Moreira *et al.* (2015) added 15 mg L⁻¹ of eugenol to the water during the transport of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and did not observe minimized stress responses according glucose and lactate analysis.

The biochemical and hematological results demonstrate the inefficiency of benzocaine at 10 mg L⁻¹ as a stress reliever during the handling and transport of dog snapper. Other studies have also indicated that anesthetics are not able to reduce transport stress in pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Feitosa *et al.*, 2013) and fat snook, *C. parallelus* (Tondolo *et al.*, 2013). The use of benzocaine (2 and 6 mg L⁻¹) did not reduce the stress response of cobia (Pedron *et al.*, 2016). However, Carneiro *et al.* (2002) and Pramod *et al.* (2010) reported that benzocaine was able to minimize transport stress in some species, such as *Brycon amazonicus* (5 to 20 mg L⁻¹) and *Puntius filamentosus* (20 mg L⁻¹). The use of anesthetic also reduced activity and stress during transport in Atlantic salmon (*Salmo salar*) (Iversen *et al.*, 2009). Therefore, other concentrations and anesthetics should be tested to evaluate the well-being of dog snapper during transport.

This paper is the first to report stress response levels for hematological and biochemical indicators in dog snapper, representing an important basis for the planning of future experiments involving transport and handling. Changes in biochemical parameters revealed the effect of stress during transport, and after 24 h, glucose levels and some hematological parameters (hemoglobin, erythrocytes, leukocytes, neutrophils and MCH) showed a tendency to return to control levels. This physiological resistance of *L. jocu* to stress is an important characteristic for aquaculture, and thus, the use of *L. jocu* in aquaculture is promising.

Acknowledgments

To Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for supporting the first author with postgraduate fellowship. To Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) and CAPES supporting the second author (PROFIX FAPES/CAPES 09/2014, process no. 72358173). To FAPES for financial support (process no. 698/2016, FAPES/ SEAG no. 06/ 2015-PPE Agro).

References

- Acerete L, Balasch JC, Espinosa E, Josa A, Tort L. Physiological responses in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*, L.) subjected to stress by transport and handling. *Aquaculture* [serial on the internet]. 2004; 237(1-4):167-78. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.03.018>
- Anni ISA, Bianchini A, Barcarolli IF, Varela Junior AS, Robaldo RB, Tesser MB, Sampaio LA. Salinity influence on growth, osmoregulation and energy turnover in juvenile pompano *Trachinotus marginatus* Cuvier 1832. *Aquaculture* [serial on the internet]. 2016; 455:63-72. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.01.010>
- Bar I, Dutney L, Lee P, Yazawa R, Yoshizaki G, Takeuchi Y, Cummins S, Elizur A. Small-scale capture, transport and tank adaptation of live, medium-sized Scombrids using “Tuna Tubes”. *SpringerPlus* [serial on the internet]. 2015; 4(604):1-12. Available from: <https://doi.org/10.1186/s40064-015-1391-y>
- Carneiro PCF, Urbinati EC, Martins ML. Transport with different benzocaine concentrations and its consequences on hematological parameters and gill parasite population of matrinxã *Brycon cephalus* (Günther, 1869) (Osteichthyes, Characidae). *Acta Sci.* 2002; 24(2):555-60.
- Cnaani A, McLean E. Time-course response of cobia (*Rachycentron canadum*) to acute stress. *Aquaculture* [serial on the internet]. 2009; 289(1-2):140-42. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.12.016>
- Cunha MA, Barros FMC, Garcia LO, Veeck APL, Heinzmann BM, Loro VL, Emanuelli T, Baldisserotto B. Essential oil of *Lippia alba*: a new anesthetic for silver catfish, *Rhamdia quelen*. *Aquaculture* [serial on the internet]. 2010; 306(1-4):403-06. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.06.014>
- Cunha MAD, Silva BF, Delunardo FAC, Benovit SC, Gomes LC, Heinzmann BM, Baldisserotto B. Anesthetic induction and recovery of *Hippocampus reidi* exposed to the essential oil of *Lippia alba*. *Neotrop Ichthyol* [serial on the internet]. 2011; 9(3):683-88. Available from: <https://doi.org/10.1590/s1679-62252011000300022>
- Davis AK, Maney DL, Maerz JC. The use of leukocytes profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. *Funct Ecol* [serial on the internet]. 2008; 22(5):760-72. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2008.01467.x>

- Del Rio-Zaragoza OB, Fajer-Ávila EJ, Almazán-Rueda P, Abdo de la Parra M. Hematological characteristics of the spotted rose snapper *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869) healthy and naturally infected by dactylogyrid monogeneans. *Tissue Cell* [serial on the internet]. 2011; 43(3):137-42. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tice.2011.01.002>
- Dotta G, Roubbedakis K, Sanches EG, Jerônimo GT, Cerqueira VR, Martins ML. Hematological profile of the red snapper *Lutjanus analis* captured in Florianópolis, SC, Brazil, and cultured in floating net cages. *Bol Inst Pesca*. 2015; 41(1):183-89.
- Drumond GVF, Caixeiro APA, Tavares-Dias M, Marcon JL, Affonso EG. Características bioquímicas e hematológicas do pirarucu *Arapaima gigas* Schinz, 1822 (Arapaimidae) de cultivo semi-intensivo na Amazônia. *Acta Amazon*. 2010; 40(3):591-96.
- Fanouraki E, Mylonas CC, Papandroulakis N, Pavlidis M. Species specificity in the magnitude and duration of the acute stress response in Mediterranean marine fish in culture. *Gen Comp Endocrinol* [serial on the internet]. 2011; 173(2):313-22. Available: <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2011.06.004>
- Food and Agriculture Organization of United Nations (FAO). The state of world fisheries and aquaculture 2016: contributing to food security and nutrition for all. Rome; Food and Agriculture Organization of United Nations; 2016.
- Feitosa KCO, Povh JA, Abreu JS. Physiological responses of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) treated with homeopathic product and submitted to transport stress. *Homeopathy* [serial on the internet]. 2013; 102(4):268-73. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.homp.2013.07.004>
- Frédou T, Ferreira BP, Letourneur Y. A univariate and multivariate study of reef fisheries off northeastern Brazil. *ICES J Mar Sci* [serial on the internet]. 2006; 63(5):883-96. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.icesjms.2005.11.019>
- Frédou T, Ferreira BP, Letourneur Y. Assessing the stocks of the primary snappers caught in Northeastern Brazilian reef systems. 1: Traditional modelling approaches. *Fish Res* [serial on the internet]. 2009; 99(2):90-96. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2009.05.008>
- Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol Electronica* [serial on the internet]. 2001; 4(1):1-9. Available from: http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm
- Harmon TS. Methods for reducing stressors and maintaining water quality associated with live fish transport in tanks: a review of the basics. *Reviews in Aquaculture* [serial on the internet]. 2009; 1(1):58-66. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2008.01003.x>
- Hohlenwerger JC, Copatti CE, Sena AC, Couto RD, Baldisserotto B, Heinzmann BM, Caron BO, Schmidt D. Could the essential oil of *Lippia alba* provide a readily available and cost-effective anaesthetic for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)?. *Mar Freshw Behav Physiol* [serial on the internet]. 2016; 49(2):119-26. Available from: <https://doi.org/10.1080/10236244.2015.1123869>
- Holloway AC, Keene JL, Noakes DG, Moccia RD. Effects of clove oil and MS-222 on blood hormone profiles in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, Walbaum. *Aquac Res* [serial on the internet]. 2004; 35(11):1025-30. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2004.01108.x>
- Hrube TC, Smith SA. Hematology of fish. In: Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC, editors. *Schalm's Veterinary Hematology*. 5th ed. Blackburg: Wiley-Blackwell; 1998.
- Ibarra-Castro L, Duncan NJ. GnRHα-induced spawning of wild-caught spotted rose snapper *Lutjanus guttatus*. *Aquaculture* [serial on the internet]. 2007; 272(1):737-46. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.09.007>
- Iversen M, Eliassen RA, Finstad B. Potential benefit of clove oil sedation on animal welfare during salmon smolt, *Salmo salar* L. transport and transfer to sea. *Aquac Res* [serial on the internet]. 2009; 40(2):233-41. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.02091.x>
- Karakatsouli N, Katsakoulis P, Leondaritis G, Kalogiannis D, Papoutsoglou SE, Chadio S, Sakellariadis N. Acute stress response of European sea bass *Dicentrarchus labrax* under blue and white light. *Aquaculture* [serial on the internet]. 2012; 364-365:48-52. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.07.033>
- Leaw YY, Faizah S, Anil C, Kua BC. Prevalence, mean intensity and site preference of *Caligus rotundigenitalis* Yü, 1933 (Copepoda: Caligidae) on cage cultured crimson snapper (*Lutjanus erythropterus* Bloch, 1790) from Bukit Tambun, Penang, Malaysia. *Vet Parasitol* [serial on the internet]. 2012; 187(3-4):505-10. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.02.003>
- Lindeman K, Anderson W, Carpenter KE, Claro R, Cowan J, Padovani-Ferreira B, Rocha LA, Sedberry G, Zapp-Sluis M. The IUCN Red List of Threatened Species. *Lutjanus jocu*: e.T190221A1944443 [internet]; 2016 [updated 2017 Feb 23; Cited 2017 Feb 26]. Available from: <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-1.RLTS.T190221A1944443.en>
- Mamangkey NGF, Acosta-Salmon H, Southgate PC. Use of anaesthetics with the silver-lip oyster, *Pinctada maxima* (Jameson). *Aquaculture* [serial on the internet]. 2009; 288(3-4):280-84. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.12.008>
- Michelato M, Zaminhan M, Boscolo WR, Nogaroto V, Vicari M, Artoni RF, Furuya VRB, Furuya WM. Dietary histidine requirement of Nile tilapia juveniles based on growth performance, expression of muscle-growth-related genes and haematological responses. *Aquaculture* [serial on the internet]. 2017; 467:63-70. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.06.038>
- Moreira AGL, Coelho AAC, Albuquerque LFG, Moreira RT, Farias WRL. Efeito do eugenol como agente mitigador do estresse no transporte de juvenis de tilápia do Nilo. *Pesqui Vet Bras* [serial on the internet]. 2015; 35(11):893-98. Available from: <https://doi.org/10.1590/s0100-736x2015001100004>
- Okamura D, Araújo FG, Rosa PV, Freitas RTF, Murgas LDS, Cesar MP. Influência da concentração de benzocaina e do comprimento dos peixes na anestesia e na recuperação de tilápias-do-nilo. *R Bras Zootec*. 2010; 39(5):971-76.

- Pedron JS, Miron DS, Rodrigues RV, Okamoto MH, Tesser MB, Sampaio LA. Stress response in transport of juvenile cobia *Rachycentron canadum* using the anesthetic benzocaine. *Lat Am J Aquat Res*. 2016; 44(3):638-42.
- Peres H, Costas B, Perez-Jimenez A, Guerreiro I, Oliva-Teles A. Reference values for selected hematological and serum biochemical parameters of Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) juveniles under intensive aquaculture conditions. *J Appl Ichthyol* [serial on the internet]. 2014; 31(1):65-71. Available from: <https://doi.org/10.1111/jai.12641>
- Pinho SM, Brol J, Almeida EJ, Mello GL, Jerônimo GT, Emerenciano MGC. Effect of stocking density and vertical substrate addition on growth performance and health status of fat snook *Centropomus parallelus*. *Aquaculture* [serial on the internet]. 2016; 457:73-78. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.02.016>
- Pramod PK, Ramachandran A, Sajeevan TP, Thampy S, Pai SS. Comparative efficacy of MS-222 and benzocaine as anesthetics under simulated transport conditions of a tropical ornamental fish *Puntius filamentosus* (Valenciennes). *Aquac Res* [serial on the internet]. 2010; 41(2):309-14. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02333.x>
- Previero M, Minte-Vera CV, Freitas MO, Moura RL, Tos CD. Age and growth of the dog snapper *Lutjanus jocu* (Bloch & Schneider, 1801) in Abrolhos Bank, Northeastern Brazil. *Neotrop Ichthyol* [serial on the internet]. 2011; 9(2):393-401. Available from: <https://doi.org/10.1590/s1679-62252011005000024>
- Rodrigues RV, Pedron JS, Romano LA, Tesser MB, Sampaio LA. Acute responses of juvenile cobia *Rachycentron canadum* (Linnaeus 1766) to acid stress. *Aquac. Res* [serial on the internet]. 2015; 46(5):1241-47. Available from: <https://doi.org/10.1111/are.12282>
- Roque A, Yildiz HY, Carazo I, Duncan N. Physiological stress responses of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) to hydrogen peroxide (H₂O₂) exposure. *Aquaculture* [serial on the internet]. 2010; 304(1-4):104-07. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.03.024>
- Sampaio FDF, Freire CA. An overview of stress physiology of fish transport: changes in water quality as a function of transport duration. *Fish Fish* [serial on the internet]. 2016; 17(4):1055-72. Available from: <https://doi.org/10.1111/faf.12158>
- Santos AA, Egami MI, Ranzani-Paiva MJT, Juliano Y. Hematological parameters and phagocytic activity in fat snook (*Centropomus parallelus*): Seasonal variation, sex and gonadal maturation. *Aquaculture* [serial on the internet]. 2009; 296(3-4):359-66. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.08.023>
- Sena AC, Teixeira RR, Ferreira EL, Heinzmann BM, Baldisserotto B, Caron BO, Schmidt D, Couto RD, Copatti CE. Essential oil from *Lippia alba* has anaesthetic activity and is effective in reducing handling and transport stress in tambacu (*Piaractus mesopotamicus* x *Colossoma macropomum*). *Aquaculture* [serial on the internet]. 2016; 465:374-9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.09.033>
- Shabani F, Erikson U, Beli E, Rexhepi A. Live transport of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) and subsequent live storage in market: Water quality, stress and welfare considerations. *Aquaculture* [serial on the internet]. 2016; 453:110-15. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.11.040>
- Silva FP, Soriano FG. Neutrophils recruitment during sepsis: critical points and crossroads. *Front Biosci*. 2009; 14:4464-76.
- Souza RLM, Vettorazzi MB, Kobayashi RK, Furtado-Neto MAA. Eugenol como anestésico no manejo de ariacó, *Lutjanus synagris* (Linnaeus, 1758), cultivado. *Cienc Agron*. 2015; 46(3):532-38.
- Stieglitz JD, Benetti DD, Serafy JE. Optimizing transport of live juvenile cobia (*Rachycentron canadum*): effects of salinity and shipping biomass. *Aquaculture* [serial on the internet]. 2012; 364-365:293-97. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.08.038>
- Stieglitz JD, Hoenig RH, Kloeblen S, Tudela CE, Grosell M, Benetti DD. Capture, transport, prophylaxis, acclimation, and continuous spawning of Mahi-mahi (*Coryphaena hippurus*) in captivity. *Aquaculture* [serial on the internet]. 2017; 479:1-6. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.05.006>
- Teixeira RR, Souza RC, Sena AC, Baldisserotto B, Heinzmann BM, Couto RD, Copatti CE. Essential oil of *Aloysia triphylla* in Nile tilapia: anaesthesia, stress parameters and sensory evaluation of fillets. *Aquac Res* [serial on the internet]. 2017; 48(7), 3383-92. Available from: <https://doi.org/10.1111/are.13165>
- Tondolo JSM, Amaral LP, Simões LN, Garlet QI, Schindler B, Oliveira TM, Da Silva, BF, Gomes LC, Baldisserotto B, Mallmann CA, Heinzmann BM. Anesthesia and transport of fat snook *Centropomus parallelus* with the essential oil of *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. *Neotrop Ichthyol* [serial on the internet]. 2013; 11(3):667-74. Available from: <https://doi.org/10.1590/s1679-62252013000300020>
- Trushenski JT, Bowser JC, Bowker JD, Schwarz MH. Chemical and electrical approaches to sedation of cobia: induction, recovery, and physiological responses to sedation. *Mar Coast Fish* [serial on the internet]. 2012; 4(1):639-50. Available from: <https://doi.org/10.1080/19425120.2012.728182>
- Vettorazzi MB, Teixeira EG, Souza RLM, César JRO, Furtado-Neto MAA. Motilidade espermática do sêmen do ariacó, *Lutjanus synagris*. *Arquivos de Ciências do Mar*. 2010; 43(2):21-26.
- Wintrobe MM. Variations in the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. *Folia Haematologica*. 1934; 51:32-49.



Submitted November 06, 2017

Accepted February 28, 2018 by Bernardo Baldisserotto

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM OCEANOGRAFIA AMBIENTAL**

CAPÍTULO 2

**First record of *Neobenedenia melleni* (Monogenea: Capsalidae) in dog snapper
(*Lutjanus jocu*) in the western South Atlantic**

**(Artigo aceito na revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia
– Novo Qualis B1)**

**VITÓRIA
2020**

**First record of *Neobenedenia melleni* (Monogenea: Capsalidae) in dog snapper
(*Lutjanus jocu*) in the western South Atlantic**

**Primeiro registro de *Neobenedenia melleni* (Monogenea: Capsalidae) em dentão
(*Lutjanus jocu*) no oeste do Atlântico Sul**

ABSTRACT

Neobenedenia melleni (MacCallum, 1927) (Monogenea) is a widespread pathogen in marine teleost cultures all over the world. With the growth of marine fish farming in Brazil it is necessary to take greater care in relation to the identification and treatment of the main pathologies in this type of culture. This study reports the first occurrence of *Neobenedenia melleni* on dog snapper (*Lutjanus jocu*) in the western South Atlantic. It is also suggested procedures adopted to eliminate this parasite in fish cultured in the laboratory.

Keywords: aquaculture, Brasil, ectoparasites, pathology.

RESUMO

Neobenedenia melleni (MacCallum, 1927) (Monogenea) é um patógeno amplamente distribuído em cultivo de teleósteos marinhos no mundo. Com o crescimento da piscicultura marinha no Brasil faz-se necessário um maior cuidado em relação a identificação e tratamento das principais patologias neste tipo de cultivo. Este estudo relata a primeira ocorrência de *Neobenedenia melleni* em dentão (*Lutjanus jocu*) no oeste do Atlântico Sul. Também são sugeridos procedimentos adotados para eliminação deste parasito em peixes cultivados em laboratório.

Palavras-chave: aquicultura, Brasil, ectoparasitos, patologia.

Snappers (Lutjanidae) can be found in tropical and subtropical waters of the Atlantic, Indian and Pacific Oceans and have high commercial demand and high added value. In addition, snappers are hardy and adaptable to aquaculture, with some well-established species and others being studied in coastal and oceanic regions (Ibarra-Castro and Duncan, 2007). Dog snapper, *Lutjanus jocu* (Bloch and Schneider, 1801), can be found in continental shelf areas of the western Atlantic Ocean and feeds preferentially on fish,

shrimp, crabs, cephalopods and gastropods. It is of great importance in Brazilian fishing and is considered fully exploited and vulnerable to the effects of overfishing (Froese and Pauly, 2019).

Little information on parasitism in *L. jocu* is available, especially when related to maintenance in farming systems, with the exception of its classification as susceptible to *Epibdella melleni* after an infestation in a New York aquarium (Jahn and Kuhn, 1932). *E. melleni* was later redescribed as *Neobenedenia melleni* by Yamaguti (1963) and occurs in more than 100 species of wild or captive teleosts with low specificity and high pathogenicity (Whittington and Horton, 1996). Under experimental or culture conditions, *N. melleni* is highly efficient in acquiring a host and in reproduction and can be reproduced using a single individual. Thus, *N. melleni* is recognized as a severe and lethal threat that can cause great harm to the producers (Militz *et al.*, 2014).

The present study aimed to describe the first record of *Neobenedenia melleni* in dog snapper (*L. jocu*) in the western South Atlantic. Procedures for the elimination of this parasite in fish reared in the laboratory are also suggested.

Forty specimens of *L. jocu* (280 ± 104 g and 25.7 ± 3.5 cm) were captured in the estuary of the Piraque-Açu River, Aracruz/ES, Brazil ($19^{\circ}56'S$ $40^{\circ}10'W$), using a gill net (Authorization for activity for scientific purposes by ICMBio SISBIO number 52082-2) and transported in plastic boxes with 100 L of water and aeration to the Laboratory of Cultivation of Marine Organisms of the Federal University of Espírito Santo (Protocol 96/2015 of the Ethics Committee on the Use of Animals CEUA/UFES). One specimen was deposited in an ichthyological collection (CIUFES 3553). The fish were acclimated and transferred to two 6000L circular tanks in a climate-controlled room with a water recirculation system, where they were kept under observation. Feeding was provided daily (5% of the biomass) using a mixture of chopped sardines, squid and shrimp.

The physicochemical parameters of water quality were measured daily using a multiparameter meter and maintained at a temperature of $23.51 \pm 0.26^{\circ}C$, pH of 7.82 ± 0.21 , dissolved oxygen of 5.69 ± 0.11 mg/L, salinity of 34.85 ± 0.15 and photoperiod of 12-12 hours. A photocolimeter was used to quantify the levels of ammonia, nitrite and nitrate, which were 0.05 ± 0.15 , 0.91 ± 0.60 and 0.32 ± 0.20 mg/L, respectively.

The first symptoms of abnormality appeared after 40 days, with approximately half of the individuals showing lack of appetite and erratic and lethargic swimming. Five days after the onset of symptoms, the clinical condition worsened, with exophthalmia, eye opacity

or hemorrhage, sudden movements of disorientation, mucus hypersecretion, color changes. Signs of secondary infection by bacteria were also observed, such as hemorrhagic lesions (ulcers) and erosion of the fins and gills (Figure 1), which are strong indicators of the presence of ectoparasites, as observed by Hoa and Ut (2007) and Sanches and Viana (2007).

Treatment consisted of keeping the fish in a box (500L) with freshwater for 15 min, adapted from Sanches and Viana (2007). No fish mortality occurred during the exposure, but before the end of the exposure, it was possible to observe the whitish color of the parasites in the fish body, especially in the caudal and dorsal fins, caudal peduncle and eyeball; detachment of the parasites from the fish body; and parasites in the water column at the bottom of the box where the treatment was performed. The parasites were collected, fixed (Justine *et al.*, 2012), quantified, analyzed under a stereoscopic microscope and, using the identification key proposed by Whittington and Horton (1996), identified as *N. melleni* (Figure 2). The parasites were then measured under a trinocular microscope with image capture and software.

Approximately 82 parasites were found per fish, with a total length of 2000-5000 μ m. The large amount of parasites found in the fish is the result of the temperature and salinity in which they were kept in the laboratory. The salinity provided a faster life cycle, and the temperature facilitated attachment of the parasite to the host, egg production and egg length, similar to observations reported by Brazenor and Hutson (2015). Then, 48 hours after the first freshwater bath, a second bath was performed, and a complete absence of parasites in the fish and water was observed.

N. melleni is a pathogen with a wide distribution and high potential to cause economic losses in marine teleost cultures. *N. melleni* has been reported in captive and wild fish in the Caribbean Sea, Western Atlantic Ocean, Eastern and Central Pacific Ocean, Red Sea (Whittington and Horton, 1996) and Australia in farmed *Lates calcarifer* (barramundi), which resulted in mortality of more than 200,000 fish (Deveney *et al.*, 2001). In Brazil, Kerber *et al.* (2011) reported *N. melleni* for the first time in farmed cobia (*Rachycentron canadum*), and Sanches and Viana (2007) reported *N. melleni* in the cultivation of the dusky grouper (*Epinephelus marginatus*). There are few records of infection of snappers in the literature, with some reports by Hoa and Ut (2007) in *Lutjanus argentimaculatus* cultured in Vietnam and Ravi and Yahaya (2016) in *Lutjanus erythropterus* cultured in Malaysia. The current study presents the second record of *N. melleni* in *L. jocu* in captivity

and the first record of this species in the western South Atlantic, considerably expanding its geographical distribution.

The commercial culture of snappers is growing considerably in the Neotropical region (Central America and the Caribbean), and several research studies in South America and the United States have demonstrated their importance and potential for aquaculture (Castillo-Vargasmachuca *et al.*, 2018). With the growth of marine fish farming in Brazil, greater care is needed regarding the identification and treatment of the main pathologies in this type of culture. Among the treatments used for infestations with monogenoids, the exposure time in freshwater differs between marine fish species in a period that can vary from 5 min (Sanches and Viana, 2007) up to 60 min (Fajer-Ávila *et al.*, 2008), and immersion for 15 min was effective for dog snapper.

The rapid identification of parasitic fauna in fish collected in a natural environment and transported to farming sites, often under high density, and prophylactic actions for their elimination are essential for the sanitary control of farmed fish. The threat posed by monogenoids for marine fish farming should always be considered. Thus, prior knowledge of the parasitic fauna of a possible farmed fish is essential, especially for the diagnosis, control and management of possible parasitic diseases.

ACKNOWLEDGEMENTS

To Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Financing Code 001, for supporting the first author with postgraduate fellowship. To Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) and CAPES supporting the second author (PROFIX FAPES/CAPES09/2014, process no. 72358173). To FAPES for financial support (process no. 698/2016, FAPES/ SEAG no. 06/ 2015-PPE Agro).

REFERENCES

- BRAZENOR, A.K.; HUTSON, K.S. Effects of temperature and salinity on the life cycle of *Neobenedenia sp.* (Monogenea: Capsalidae) infecting farmed barramundi (*Lates calcarifer*). Parasitology Research, v.115, n.5, p.1875-1886, 2015.
- CASTILLO-VARGASMACHUCA, S. G., PONCE-PALAFIX, J. T., ARÁMBUL-MUÑOZ, E. *et al.* The spotted rose snapper (*Lutjanus guttatus* Steindachner 1869) farmed in marine cages: review of growth models. Reviews in Aquaculture, v.10, n.2, p.376-384, 2018.

DEVENEY, M.R.; CHISHOLM, L.A.; WHITTINGTON, I.D. First published record of the pathogenic monogenean parasite *Neobenedenia melleni* (Capsalidae) from Australia. *Diseases of Aquatic Organisms*, v.46, n.1, p. 79-82, 2001.

FAJER-ÁVILA, E. J., MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, I., DE LA PARRA, M. I. A. *et al.* Effectiveness of freshwater treatment against *Lepeophtheirus simplex* (Copepoda: Caligidae) and *Neobenedenia* sp. (Monogenea: Capsalidae), skin parasites of bullseye puffer fish, *Sphoeroides annulatus* reared in tanks. *Aquaculture*, v.284, n.1, p.277-280, 2008.

FROESE, R.; PAULY, D. FishBase. World Wide Web electronic publication. 2019. Disponível em: <<http://www.fishbase.org>> versão 04/2019. Acessado em: 02 abr. 2019.

HOA, D.T.; UT, P.V. Monogenean disease in cultured grouper (*Epinephelus* spp.) and snapper (*Lutjanus argentimaculatus*) in Khanh Hoa Province. Vietnam. *Aquaculture Asia Magazine*, v.12, n.4, p.40-42, 2007.

JAHN, T.L.; KUHN, L.R. The Life History of *Epibdella Melleni* Maccallum 1927, A Monogenetic Trematode Parasitic on Marine Fishes. *Biological Bulletin*, v.62, n.1, p.89-111, 1932.

IBARRA-CASTRO, L.; DUNCAN, N.J. GnRH α -induced spawning of wild-caught spotted rose snapper *Lutjanus guttatus*. *Aquaculture*, v.272, n.1-4, p.737-746, 2007.

JUSTINE, J.L.; BRIAND, M.J.; BRAY, R.A. *et al.* A quick and simple method, usable in the field, for collecting parasites in suitable condition for both morphological and molecular studies. *Parasitology Research*, v.111, n.1, p.341-351, 2012.

KERBER, C.E.; SANCHES, E.G.; SANTIAGO, M.; LUQUE, J.L. First record of *Neobenedenia melleni* (Monogenea: Capsalidae) in sea-farmed cobia (*Rachycentron canadum*) in Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.20, n.4, p.331-333, 2011.

MILITZ, T.A.; SOUTHGATE, P.C.; CARTON, A.G. *et al.* Efficacy of garlic (*Allium sativum*) extract applied as a therapeutic immersion treatment for *Neobenedenia* sp. management in aquaculture. *Journal of Fish Diseases*, v.37, n.5, p.451-461, 2014.

RAVI, R.; YAHAIA, Z.S. *Neobenedenia melleni* Parasite of Red Snapper, *Lutjanus erythropterus*, with Regression Statistical Analysis between Fish Length, Temperature, and Parasitic Intensity in Infected Fish, Cultured at Jerejak Island, Penang, Malaysia. *Journal of Parasitology Research*, v.2016, 2016.

SANCHES, E.G.; VIANNA, R.T. Ocorrência de *Neobenedenia melleni* (Monogenea: Capsalidae) em garoupa-verdadeira *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) cultivada em tanques-rede. Arquivo de Ciências do Mar, v.40, n.2, p.96- 100, 2007.

WHITTINGTON, I.D.; HORTON, M.A. A revision of *Neobenedenia* Yamaguti, 1963 (Monogenea: Capsalidae) including a redescription of *N. melleni* (MacCallum, 1927) Yamaguti, 1963. Journal of Natural History, v.30, n.8, p.1113-1156, 1996.



Figure 1. Symptoms of abnormalities in *Lutjanus jocu* parasitized by *Neobenedenia melleni* arising after 40 days of culture. Exemplar showing gill erosion (a) and pectoral fin erosion (b). Eye physiognomy comparison: (c) exophthalmia; (b) opacity and exophthalmia; (e) opacity, exophthalmia and intraocular hemorrhage. Color change in fish with exophthalmia (f).

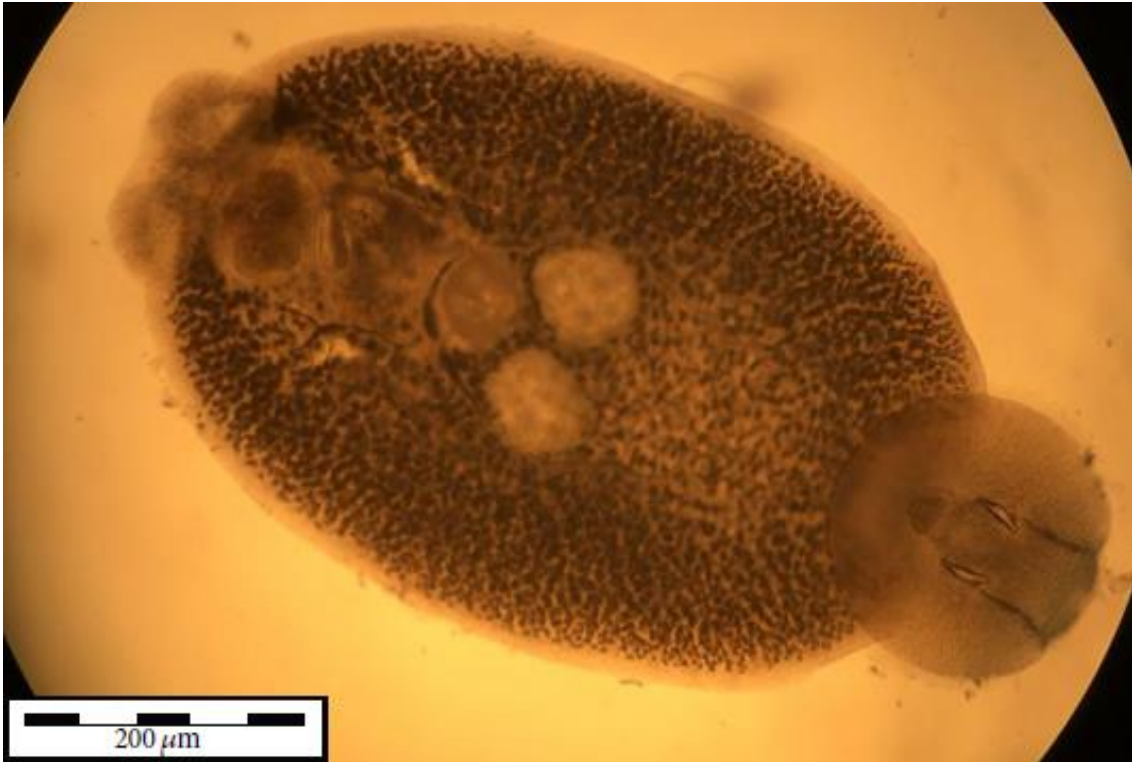


Figure 2. *Neobenedenia melleni* MacCallum, 1927 (Monogenea: Capsalidae) specimen measured under a microscope. The specimen was collected in *Lutjanus jocu* after 40 days of culture in the laboratory.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM OCEANOGRAFIA AMBIENTAL**

CAPÍTULO 3


**Levamisole on the biochemical and hematological responses to parasitism by
monogenoids in dog snapper**

(Artigo publicado na revista Ciência Rural – Novo Qualis A4)

**VITÓRIA
2020**



Levamisole on the biochemical and hematological responses to parasitism by monogenoids in dog snapper

Bruno De Laquila Oliveira^{1*}  Rodrigo Matos de Souza² Jorge Pinto da Silva Filho³
 Halysson Pena Ribeiro² Deusélio Bassini Fioresi⁴ Levy de Carvalho Gomes⁵
 Luiz Fernando Loureiro Fernandes³

¹Programa de Pós-Graduação em Oceanografia Ambiental, Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), 29199-970, Aracruz, ES, Brasil. E-mail: brunodlo@yahoo.com.br. *Corresponding author.

²Laboratório de Cultivo de Organismos Marinhos, Base Oceanográfica, Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Aracruz, ES, Brasil.

³Departamento de Oceanografia e Ecologia, Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Vitória, ES, Brasil.

⁴Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Espírito Santo (IFES), Venda Nova do Imigrante, ES, Brasil.

⁵Universidade Vila Velha (UVV), Vila Velha, ES, Brasil.

ABSTRACT: *The response of biochemical and hematological parameters were analyzed in dog snapper (*Lutjanus jocu*) grown in net cages, as well as for the specimens kept in the laboratory during an infestation by *Neobenedenia melleni*, and after treatment with freshwater bath and injectable application of levamisole. Significant changes were observed in *N. melleni* parasitized individuals, characterized by increased glucose and lactate levels, as well as a significant fish hematocrit reduction and leukocyte increase. Treatment with freshwater baths, concomitant with injectable levamisole application, showed therapeutic efficacy in several parameters after 14 days of treatment.*

Key words: *aquaculture, biochemistry, hematology, *Neobenedenia melleni*, fish.*

Efeito do levamisol na resposta bioquímica e hematológica ao parasitismo por monogenoides em dentão

RESUMO: *A resposta de parâmetros bioquímicos e hematológicos foram analisadas no dentão (*Lutjanus jocu*) cultivados em tanque-rede, bem como os exemplares mantidos em laboratório durante a infestação por *Neobenedenia melleni* e após o tratamento com banho de água doce e aplicação injetável de levamisol. Foram observadas alterações significativas nos indivíduos parasitados por *N. melleni*, caracterizado pelo aumento dos níveis de glicose e lactato, bem como significativa redução em hematócrito e aumento em leucócito dos peixes. O tratamento com banhos de água doce, concomitante à aplicação injetável de levamisol, evidenciou eficácia terapêutica em diversos parâmetros após 14 dias de tratamento.*

Palavras-chave: *aquicultura, bioquímica, hematologia, *Neobenedenia melleni*, peixe.*

Monogenoids parasites recorded in Brazil, *Neobenedenia melleni* in particular, have been known to cause losses, like partial or total mortality of the cultured individuals (KERBER et al., 2011; SILVA et al., 2014). A study on the occurrence of monogenoids and the proposition of treatments in cultured marine fishes is still incipient and there are few articles published for Lutjanidae (LIANG et al., 1992; FAJER-ÁVILA et al., 2007; DEL RIO-ZARAGOZA et al., 2010; DEL RIO-ZARAGOZA et al., 2011).

Effective treatments are available for the elimination of monogenoids in marine fish, including the immersion of the fish in freshwater from 5 min (SANCHES et al., 2007) up to 60 minutes (FAJER-ÁVILA et al., 2007). The use of specific drugs has

also been explored to treat these fish pathogens, such as levamisole, a popular antiparasitic (PETRILLO et al., 2017). The immunomodulatory capacity of levamisole can be used to control pathogenic infections and reduce the harmful effects of stress in fish farming (BILLER-TAKAHASHI et al., 2016).

Due to its high market value and as its present declining population, dog snapper is an important marine species to be studied, as well as its rusticity and adaptability in aquaculture (LINDEMAN et al., 2016). The aim of this study was to investigate the effects of levamisole in the physiological responses of *Lutjanus jocu* infested with *Neobenedenia melleni*.

Forty fish (220±68 g and 24.5±2.5 cm total length) were collected at the Piraquê-açu

estuary, Aracruz / ES, southeastern Brazil (19°56'S 40°10'W), through a gillnet (Authorization for activity for scientific purposes of ICMBio, SISBIO number 52082-2), and transferred to a 4m³ cage, also located in the estuary. After the 30-day acclimation period, seven specimens were collected. At the time they were taken out of the cage, they were sedated using benzocaine (50 mg L⁻¹) and blood was collected immediately via caudal puncture. Next, the remaining fish were transferred to the Marine Organisms Rearing Laboratory of the Universidade Federal do Espírito Santo (Protocol 96/2015 of the Ethics Committee for the Use of Animals CEUA / UFES).

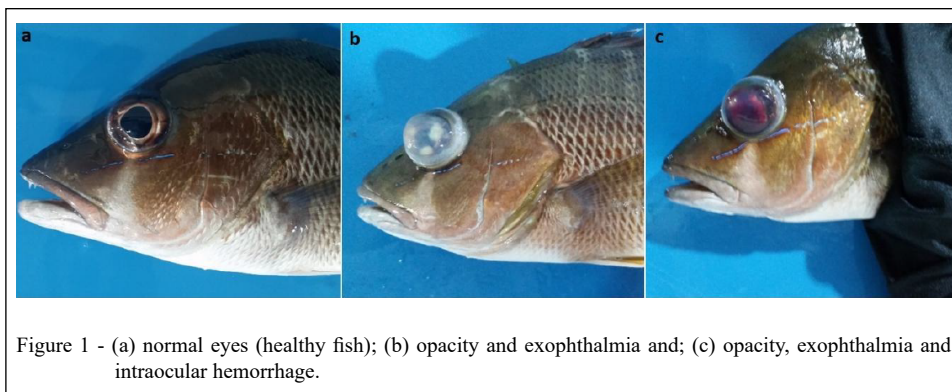
In the laboratory, the fish were transferred to 6.000L tanks, provided with Recirculating Aquaculture System (RAS). Mean values of temperature 23.5 ± 0.8 °C, pH 7.82 ± 0.65, dissolved oxygen 5.69 ± 0.4 mg L⁻¹ and salinity 34.85 ± 0.4 were measured with a YSI Professional Plus probe. After forty days in the laboratory, fish were observed to refuse food, presented erratic and lethargic swimming, showed signs of secondary infection such as hemorrhagic lesions (ulcers) and fin erosion. Exophthalmia was also visible, with opacity and intraocular hemorrhage (Figure 1).

On parasitic examination, 21 fish revealed the presence of monogenoid parasites. These parasites were then collected, fixed, quantified, and analyzed under a stereoscopic microscope. Utilizing the key proposed by ERNST & WHITTINGTON (1996), the *Neobenedenia melleni* parasite was identified. The infected fish were then removed and placed in 500 L tanks for five days, and seven specimens were randomly selected and anesthetized with benzocaine (50 mg/L) prior to blood withdrawal.

In order to remove the monogenoid parasites, the remaining fish were placed in freshwater baths for 15 min (KERBER et al., 2011). Subsequently, under the trinocular microscope, the parasites were measured having between 2 and 4 mm in total length, with 82 ± 23 of them, on average, present per fish. A second bath was performed on the next day after the first freshwater bath, and at this time no parasites were recorded. Immediately after the freshwater baths, the fish were separated into two groups, each having seven individuals, and placed in 500 L tanks.

The first group was administered levamisole (Levamisole-Ripercol® Chloridate), diluted in physiological solution, the injection being equivalent to 5 mg kg⁻¹ of live weight and given in the dorsal muscle at the beginning of the dorsal fin. The second group was administered a saline injection (control), to simulate similar stress as in the levamisole treatment. After 14 days, fish from both treatments were anesthetized prior to blood withdrawal, and biochemical and hematological analyses were performed. Subsequently, a comparative study was done between the two groups (control and infected fish).

The blood was centrifuged in heparinized microcapillary tubes and the hematocrit reading (%) was determined. Dilutions of 1:200 in dye solution (Na₂ EDTA, formaldehyde, NaCl, NaOH, methylene blue) were examined to identify the erythrocyte count and the counting was done directly in a Neubauer chamber under an optical microscope (Olympus CX41). The differential and total counts of the leukocytes and thrombocytes were noted using dry blood samples, fixed and stained with rapid panoptic dye (RENYLAB® commercial kit, Brazil), and counted by the indirect method.



Plasma glucose and hemoglobin concentrations (commercial kit, Bioclin®, Brazil) and plasma lactate (commercial kit, BioTecnica®, Brazil) were recorded after employing the colorimetric method and spectrophotometer analysis.

For each parameter the statistical analysis was done separately using ANOVA. Results of groups (treatments) were compared using the Tukey test ($p < 0.05$) and the final values are given as the means and standard deviation with the analyses performed using the PAST 2.17 software.

Table 1 lists the biochemical and hematological parameters of *L. jocu*. The hematocrit, lymphocyte and thrombocyte values indicated the efficacy of the levamisole compared to the levamisole control, returning values significantly equal to the control group. The leukocytes and neutrophils revealed no difference between both the levamisole and levamisole control; however, the treatment with levamisole revealed that the levels returned to values significantly equal to those of the control group. MCV and MCH showed no significant difference between treatment with levamisole and levamisole control, but levamisole group showed a difference from the infected fish group. From Table 1 it is clear that a significant difference was present in the glucose

and lactate values, between the control and infected fish, and both parameters showed regression in the levamisole-treated group.

In the laboratory, the infestation by *N. melleni* induced physiological reactions in the dog snapper, with progressive results, mainly in terms of food refusal, to more severe instances of temporary blindness due to exophthalmia and intraocular hemorrhage. Hematological and biochemical manifestations reported in this study in *L. jocu* and diseases caused by monogenoids reported in the literature, including for snappers, such as in spanish flag snapper (*Lutjanus carponotatus*) (ERNST & WHITTINGTON, 1996), rose snapper (*Lutjanus guttatus*) (DEL RIO-ZARAGOZA et al., 2011), revealed vulnerability of the genus to monogenoids during periods of confinement.

The pathogen-induced stress conditions in the present study revealed elevated glucose and lactate levels, implying that monogenoid parasitism stimulates the high plasma glucose levels as a physiological defense response. These results concurred with the monogenoid infestation-induced high glycemic levels in the *Lutjanus guttatus* (DEL RIO-ZARAGOZA et al., 2011) and *Pangasianodon hypophthalmus* (KUMAR et al., 2018). Plasma

Table 1 - Hematological and biochemical parameters of the dog snapper (*Lutjanus jocu*) in cage prior to being infected, during infestation of *N. melleni* and 14 days post levamisole treatment (5 mg/kg).

Parameter	Control	Infected Fish	Levamisole Control	Levamisole	P value
-----Hematological-----					
Hemoglobin (g dL ⁻¹)	13.93±1.30 a	12.70±0.81 a	13.31±0.46 a	13.59±0.80 a	0.0997
Erythrocytes (10 ⁶ mm ³)	2.6±0.52 ab	3.0±0.72 a	2.2±0.28 b	2.0±0.33 b	0.0068
Hematocrit (%)	45.7±4.5 a	35.5±7.0 b	32.6±5.4 b	40.75±4.5 a	0.0017
Leukocyte (10 ³ µL ⁻¹)	47.07±18.86 b	117.0±30.56 a	76.15±36.52 ab	86.07±22.67 ab	0.0037
Neutrophils (%)	14.60±4.34 c	33.86±9.01 a	30.86±10.75 ab	18.14±12.02 bc	0.0047
Lymphocytes (%)	75.40±5.18 a	52.57±11.06 b	60.0±6.51 b	75.14±11.77 a	0.0003
Monocytes (%)	10.0±6.16 a	13.57±8.62 a	9.14±5.55 a	6.71±2.87 a	0.2597
Thrombocytes (10 ³ µL ⁻¹)	29.48±10.64 b	55.17±8.54 a	51.12±6.68 a	37.39 ±9.21 b	0.0001
MCV (µL ⁻¹)	182.54±47.90 a	121.65±21.54 b	150.42±36.88 ab	188.47±30.61 a	0.0059
MCH (%)	55.96±15.50 ab	45.31±13.68 b	61.10±8.14 ab	68.53±10.14 a	0.0109
MCHC (g dL ⁻¹)	30.72±4.74 a	37.21±8.83 a	41.76±6.56 a	36.88±6.21 a	0.0870
-----Biochemical-----					
Glucose (g dL ⁻¹)	74.36±15.52 c	123.26±19.01 a	113.89±27.21 ab	85.83±16.24 bc	0.0010
Lactate (g dL ⁻¹)	9.33±1.77 b	16.04±2.25 a	14.70±2.82 a	10.95±2.42 b	0.0002

Mean ± SD. Different letters (a, b or c) indicate a significant difference ($p < 0.05$) between the groups.

Control: Fish cultured in the cage; Infected Fish: *N. melleni*-infected fish; Levamisole Control: collection 14 days post exposure to infected fish and application of the levamisole-free injection; Levamisole: collection 14 days post exposure to infected fish and administration of the levamisole injection.

lactate spike occurs under conditions of limited oxygen available for aerobic cellular metabolism, initiating gluconeogenesis from the lactate (OLSEN et al., 1995). The levamisole administered permitted a significant decrease in the high lactate levels when compared to the parasitized fish group.

In this research, the injectable levamisole was selected for the intense symptoms revealed during the treatment of the *L. jocu*. In fact, HANG et al. (2014) utilized the identical concentration of injectable levamisole (5 mg kg⁻¹ live weight), and reported a positive effect on the catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) defense mechanisms during a bacterial infection treatment. One of the reasons for the choice of levamisole as a determinant factor was because it has been recognized as an immunostimulant, which apart from positively raising the productivity also facilitates the decrease or total ban on the employment of antibiotics, a crucial advantage in the aquatic culture systems (ZANON et al., 2014).

This study revealed important biochemical and hematological changes in the *Neobenedenia melleni*-infected dog snapper (*Lutjanus jocu*). Treatments performed with freshwater baths related to the administration of injectable levamisole revealed therapeutic efficacy in several parameters post treatment for 14 days.

ACKNOWLEDGEMENTS

To Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Financing Code 001, for supporting the first author with postgraduate fellowship. To Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) and CAPES supporting the second author (PROFIX FAPES/CAPES09/2014, process no. 72358173). To FAPES for financial support (process no. 698/2016, FAPES/ SEAG no. 06/ 2015-PPE Agro).

DECLARATION OF CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare no conflict of interest. The founding sponsors had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, and in the decision to publish the results.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

All authors contributed equally for the conception and writing of the manuscript.

REFERENCES

BILLER-TAKAHASHI, J.D. et al. Levamisole promotes an adjuvant effect on the immunity of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) when immunized with *Aeromonas hydrophila*, even when provided in the diet. **Animal Feed Science and Technology**, v.211, p.164-

173, 2016. Available from: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037784011530064X>>. Accessed: Oct. 19, 2018. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2015.11.008.

DEL RIO-ZARAGOZA, O.B. et al. Haematological and gill responses to an experimental infection of dactylogyrid monogeneans on the spotted rose snapper *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869). **Aquaculture Research**, v.41, n.11, p.1592-1601, 2010. Available from: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2109.2009.02471.x>>. Accessed: Mar. 19, 2019. doi: 10.1111/j.1365-2109.2009.02471.x.

DEL RIO-ZARAGOZA, O.B. et al. Hematological characteristics of the spotted rose snapper *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869) healthy and naturally infected by dactylogyrid monogeneans. **Tissue and Cell**, v.43, n.3, p.137-142, 2011. Available from: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0040816611000085>>. Accessed: Oct. 19, 2018. doi:10.1016/j.tice.2011.01.002.

ERNST, I.; WHITTINGTON, I.D. Hatching rhythms in the capsalid monogeneans *Benedenia lutjani* from the skin and *B. rohdei* from the gills of *Lutjanus carponotatus* at Heron Island, Queensland, Australia. **International Journal for Parasitology**, v.26, n.11, p.1191-1204, 1996. Available from: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S002075199600118X>>. Accessed: Oct. 19, 2018. doi:10.1016/S0020-7519(96)00118-X.

FAJER-ÁVILA, E.J. et al. Effectiveness of treatments against eggs, and adults of *Haliotrema sp.* and *Euryhaliotrema sp.* (Monogenea: *Ancyrocephalinae*) infecting red snapper, *Lutjanus guttatus*. **Aquaculture**, v.264, n.1-4, p.66-72, 2007. Available from: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0044848606009264>>. Accessed: Oct. 19, 2018. doi: 10.1016/j.aquaculture.2006.12.035.

HANG, B.T.B. et al. Can immunostimulants efficiently replace antibiotic in striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) against bacterial infection by *Edwardsiella ictaluri*? **Fish & Shellfish Immunology**, v.40, n.2, p.556-562, 2014. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25120215>>. Accessed: Oct. 19, 2018. doi: 10.1016/j.fsi.2014.08.007.

KERBER, Claudia Ehlers et al. First record of *Neobenedenia melleni* (Monogenea: Capsalidae) in sea-farmed cobia (*Rachycentron canadum*) in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.20, n.4, p.331-333, 2011. Available from: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-29612011000400013>. Accessed: Oct. 19, 2018. doi: 10.1590/S1984-29612011000400013.

KUMAR, S. et al. Effects on haematological and serum biochemical parameters of *Pangasianodon hypophthalmus* to an experimental infection of *Thaparocleidus sp.* (Monogenea: dactylogyridae). **Experimental parasitology**, v.188, p.1-7, 2018. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29501694>>. Accessed: Oct. 19, 2018. doi: 10.1016/j.exppara.2018.02.007.

LIANG, K.S. et al. Treatment of cultured golden snapper, *Lutjanus johni* Bloch, infected with monogeneans. **Aquaculture**, v.106, n.1, p.1-8, 1992. Available from: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/004484869290244F>>. Accessed: Mar. 19, 2019. doi: 10.1016/0044-8486(92)90244-F.

LINDEMAN, K. et al. *Lutjanus jocu*. **The IUCN Red List of Threatened Species 2016**: e.T190221A1944443, 2016.

Available from: <<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-1.RLTS.T190221A1944443.en>>. Accessed: Oct. 19, 2018.

OLSEN, Y. et al. Metomidate anaesthesia in Atlantic salmon, *Salmo salar*, prevents plasma cortisol increase during stress. **Aquaculture**, v.134, n.1-2, p.155-168, 1995. Available from: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/004484869500008P>>. Accessed: Oct. 19, 2018. doi: 10.1016/0044-8486(95)00008-P.

PETRILLO, T.R. et al. Influence of dexamethasone and levamisole on macrophage recruitment, giant cell formation and blood parameters in the tropical fish *Piaractus mesopotamicus*. **Bioscience Journal**, v.33, n.4, 2017. Available from: <<http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/33016>>. Accessed: Oct. 19, 2018. doi: 10.14393/BJ-v33n4a2017-33016.

SANCHES, E.G. et al. Occurrence and treatment of monogenoides in fingerlings of florida pompano (*Trachinotus carolinus*) cultivated

experimentally in the north area of the state of São Paulo. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, p.1-4, 2007. Available from: <<https://repositorio.unesp.br/handle/11449/453>>. Accessed: Oct. 19, 2018.

SILVA, F.C. et al. First record of *Neobenedenia "melleni"*-like species (Monogenea: Capsalidae) in Goliath grouper *Epinephelus itajara* in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.23, n.2, p.248-250, 2014. Available from: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-29612014000200248>. Accessed: Oct. 19, 2018. doi: 10.1590/S1984-29612014025.

ZANON, R.B. Dietary Levamisole as immunostimulant for striped surubim, *Pseudoplatystoma reticulatum*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 45, n. 6, p. 672-680, 2014. Available from: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jwas.12156>>. Accessed: Oct. 19, 2018. doi:10.1111/jwas.12156.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM OCEANOGRAFIA AMBIENTAL**

CAPÍTULO 4

Occurrence of *Caligus asperimanus* Pearse, 1951 (Copepoda: Caligidae) parasitic *Lutjanus* spp. (Perciformes: Lutjanidae) in the western South Atlantic


(Artigo publicado na revista *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* - Novo Qualis A2)

VITÓRIA

2020

Occurrence of *Caligus asperimanus* Pearse, 1951 (Copepoda: Caligidae) parasitic *Lutjanus* spp. (Perciformes: Lutjanidae) in the western South Atlantic

Ocorrência de *Caligus asperimanus* Pearse, 1951 (Copepoda: Caligidae) parasitos de *Lutjanus* spp. (Perciformes: Lutjanidae) no Atlântico Sul ocidental

Bruno De Laquila Oliveira^{1*} ; Luiz Fernando Loureiro Fernandes²; Gustavo Martins Rocha²; Ana Cecilia Gomes Silva Malanski³; Fabiano Paschoal⁴

¹Programa de Pós-graduação em Oceanografia Ambiental, Base Oceanográfica, Universidade Federal do Espírito Santo - UFES, Aracruz, ES, Brasil

²Departamento de Oceanografia e Ecologia, Universidade Federal do Espírito Santo - UFES, Vitória, ES, Brasil

³Laboratório de Cultivo de Organismos Marinhos, Universidade Federal do Espírito Santo - UFES, Aracruz, ES, Brasil

⁴Laboratório de Parasitologia Animal, Centro de Pesquisa em Biologia - CEPBio, Universidade Castelo Branco-RJ, Realengo, RJ, Brasil

How to cite: Oliveira BL, Fernandes LFL, Rocha GM, Malanski ACGS, Paschoal F. Occurrence of *Caligus asperimanus* Pearse, 1951 (Copepoda: Caligidae) parasitic *Lutjanus* spp. (Perciformes: Lutjanidae) in the western South Atlantic. *Braz J Vet Parasitol* Ano; 29(2): e018219. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612020001>

Abstract

Sea lice are widespread copepods in marine teleost around the world. In this paper the first record of *Caligus asperimanus* Pearse, 1951 in the Western South Atlantic is documented parasitizing *Lutjanus jocu* and *Lutjanus vivanus* caught from coastal zones of Espírito Santo and Rio de Janeiro State, respectively.

Keywords: *Lutjanus vivanus*, *Lutjanus jocu*, ectoparasites, infestation, South Atlantic.

Resumo

Os piolhos marinhos são copépodes abrangentemente relatados em teleósteos marinhos ao redor do mundo. Neste estudo, é documentado o primeiro registro de *Caligus asperimanus* Pearse, 1951 no Atlântico Sul Ocidental parasitando *Lutjanus jocu* e *Lutjanus vivanus* capturados nas zonas costeiras do Espírito Santo e Rio de Janeiro, respectivamente.

Palavras-chave: *Lutjanus vivanus*, *Lutjanus jocu*, ectoparasitos, infestação, Atlântico Sul.

Snappers *Lutjanus* species (Lutjanidae) can be found in tropical and subtropical waters of the Atlantic, Indian, and Pacific oceans (Nelson et al., 2016). They are a high commercial demand and possess high added value, in addition to hardiness and adaptability in aquaculture, with some well-known species and others being studied in coastal and oceanic regions (Ibarra-Castro & Duncan, 2007). The dog snapper, *Lutjanus jocu* Bloch & Schneider, 1801, and silk snapper, *Lutjanus vivanus* Cuvier, 1828 are found in continental shelf areas, as well as in clear waters around islands. These species are widely distributed in the Atlantic Ocean from North Carolina (USA) to Southeastern Brazil, feeding day and night on fish, shrimp, crabs, cephalopods, and gastropods (Froese & Pauly, 2019).

Received October 10, 2019. Accepted December 13, 2019.

*Corresponding author: Bruno De Laquila Oliveira. E-mail: brunodlo@yahoo.com.br



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

According to Luque & Poulin (2007), our knowledge about Latin American fish parasite biodiversity is still quite limited, study effort distribution has been quite heterogeneous, and most known fish species have not been examined for parasites.

Members of the Caligidae family are predominantly external fish parasites, inhabiting the external surface, mouth, gills, and opercular cavity of their hosts and comprise one of the most speciose group within the Copepoda, currently encompassing 450 species distributed in 31 genera (Boxshall & Halsey, 2004; Dojiri & Ho, 2013).

The genus *Caligus* has the largest number of species in its family, comprising more than 250 species, and is also the most widely represented genus in Brazil, totalling 31 species found in the marine environment (Luque et al., 2013). Although the above caligids species have been found on 55 fish species of the Brazilian coast, but there are no records of Caligidae species parasitizing Lutjanidae fish species in Brazilian coast (Luque & Tavares, 2007; Luque et al., 2013). In the Neotropical Region, Morales-Serna et al. (2016) listed 115 sea lice species found on 217 Neotropical fish species, of which 58 are known *Caligus* species.

In this study, specimens of *Caligus asperimanus* Pearse 1951 were collected from two snapper species in Brazil, specifically *L. jocu* ($n= 8$) caught in the Piraquê-mirim river estuary, Aracruz municipality, Espírito Santo State (19°56'S, 40°10'W), and *L. vivanus* ($n= 2$) caught off the coast of Rio de Janeiro State (22°55'S, 43°12'W). Copepods were removed from the fish surface, fixed in 70% alcohol, and subsequently cleared in a drop of lactophenol before testing with a phase contrast microscope and were examined according to the procedure proposed by Humes & Gooding (1964). Illustrations were made with the aid of an Olympus CX41 microscope (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) equipped with a drawing attachment. Measurements based on nine females are given in millimetres, with the range followed by the mean in parentheses. Representative specimens were deposited in the scientific collection of the Museum of Zoology, University of São Paulo, Brazil. The scientific and common names of the fish used in the present study were according to Froese & Pauly (2019).

Based in the morphology of cephalothorax, genital process, abdomen, small appendages and body proportion, specimens of copepods collected in Brazil (Figure 1) corresponds to the description of *C. asperimanus* given by Pearse (1951) and Cressey (1991). A total of nine *C. asperimanus* female specimens, six on *L. jocu* (MZUSP No 40232 - 2♀) and three on *L. vivanus* (MZUSP No 40231 - 2♀), were collected from the hosts. The female copepods ($n = 9$) had a body length of 3.79-4.32 (4.08) mm (excluding caudal rami setae), and all were attached to the external surface of the fish, close to the operculum. No male individuals were found. Female specimens from Brazil are larger (4.08 mm) than the type specimens collected in Bimini, Bahamas (3.3 mm), and probably with similar size to the specimens collected in Carrie Bow Cay, Belize (4.42 mm) (Pearse, 1951; Cressey, 1991).

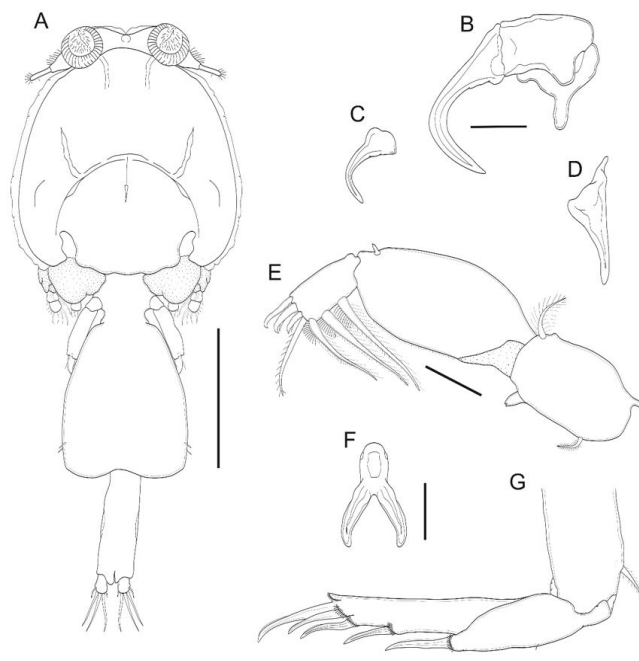


Figure 1. *Caligus asperimanus* from Brazil. Adult Female. (A) Habitus, dorsal view; (B) Antenna; (C) Postantennal process; (D) Maxillule; (E) Leg 1; (F) Sternal furca; (G) Leg 4. Scale bars: A = 1 mm; B-C and F = 80 µm; E and G = 100 µm.

Caligus asperimanus was originally described by Pearse (1951) from the mutton snapper *Lutjanus analis* Cuvier, 1828 (Perciformes, Lutjanidae), collected in the Bimini Sea, Bahamas. This species of ectoparasite was subsequently recorded by Cressey (1991) on schoolmaster snapper *Lutjanus apodus* Walbaum, 1792, *L. jocu*, and lane snapper, *Lutjanus synagris* Linnaeus, 1758, in the Carrie Bow Cay sea, Belize. Years later, Pilla et al. (2012) recorded this species of ectoparasite in John's snapper *Lutjanus johnii* Bloch, 1792 in the Pacific Ocean for the first time, more specifically from the Indian coast. Although this species of ectoparasite has a high prevalence in snapper fish, recently Morales-Serna et al. (2016), in their study on copepod parasites of economically important Ecuadorian fish, recorded this species for the first time in non-lutjanid fish, i.e., the Chere-chere grunt *Haemulon steindachneri* Jordan & Gilbert, 1882 (Haemulidae) and the pacific porgy *Calamus brachysomus* Lockington, 1880, in addition to the yellow snapper *Lutjanus argentiventris* Peters, 1869, all from the coastal waters of Jaramijó, Manabí province, Ecuador.

The discovery of *C. asperimanus* in Brazilian waters represents the 32nd *Caligus* species recorded in the country and the first record of this species of copepod in the western South Atlantic, considerably expanding its geographical distribution. As mentioned in the previous paragraph, this parasitic copepod species has a high incidence in lutjanid fish; however, in this study, *C. asperimanus* has been recorded for the first time in *L. vivanus*, being also the first caligid copepod found in snappers in Brazil.

Snapper commercial farming is growing considerably in the Neotropics (Central America and the Caribbean), and several research initiatives are underway in South America and the United States, showing their importance and potential for aquaculture (Castillo-Vargasmachuca et al., 2018). In Brazil, studies with snappers have been developed focused on laboratory reproduction (Fernandes et al., 2012; Sanches et al., 2015), transport (Oliveira et al., 2018) and diets (Sanches, 2011). Appears to be the most suitable for farming in floating cages because it accepts artificial food (pellet), it is easy to

manipulate, it tolerates captivity and its growth from hatchery to market size is completed within 8 months (Hernández et al., 2015).

Caligid copepods are a serious problem in European and Asian aquaculture (Boxshall & Defaye, 1993). According to Johnson et al. (2004), the estimated that in marine and brackish water fish cultures, 61% of copepod infestations are caused by members of the family Caligidae of which 47% are caused by species of *Caligus*, and 14% by species of *Lepeophtheirus*. The best-studied examples of this epidemiological interaction are the ectoparasites *Caligus elongatus* Nordmann, 1832, *Caligus rogercresseyi* Boxhall & Bravo, 2000 and *Lepeophtheirus salmonis* Krøyer, 1837, which can cost the salmon industry, for example, € 300 million (US \$ 480 million) per year and 6% of the product value (Costello, 2009; Dojiri & Ho, 2013). The rapid identification and prophylactic actions to eliminate parasitic fauna in fish collected from a natural environment and transported to farming sites (often under high density) are essential for the sanitary control of farmed fish. The threat of sea lice to marine-fish farming should always be considered. Thus, prior knowledge of the parasitic fauna of a possible aquaculture fish is essential, especially in relation to the diagnosis, control, and management of possible parasitic diseases.

Acknowledgements

To Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Financing Code 001, for supporting the first author with postgraduate fellowship.

References

- Boxshall GA, Halsey SH. *An introduction to copepod diversity*. London: Ray Society; 2004.
- Boxshall GA, Defaye D. *Pathogens of wild and farmed fish: sea lice*. Chichester: Ellis Horwood; 1993.
- Castillo-Vargasmachuca SG, Ponce-Palafox JT, Arámbul-Muñoz E, Rodríguez-Domínguez G, Aragón-Noriega EA. The spotted rose snapper (*Lutjanus guttatus* Steindachner 1869) farmed in marine cages: review of growth models. *Rev Aquacult* 2018; 10(2): 376-384. <http://dx.doi.org/10.1111/raq.12166>.
- Costello MJ. How sea lice from salmon farms may cause wild salmonid declines in Europe and North America and be a threat to fishes elsewhere. *Proc R Soc Lond B* 2009; 276(1672): 3385-3394. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2009.0771>. PMID:19586950.
- Cressey RF. Parasitic copepods from the Gulf of Mexico and Caribbean sea, III. *Caligus*. *Smithson. Contr. Zool.* 1991; 497(497): 1-53. <http://dx.doi.org/10.5479/si.00810282.497>.
- Dojiri M, Ho JS. *Systematics of the Caligidae, copepods parasitic on marine fishes*. Leiden: Brill Publishers; 2013. (Crustaceana Monographs; vol. 18).
- Fernandes CAF, Oliveira PGV, Travassos PEP, Hazin FHV. Reproduction of the Brazilian snapper, *Lutjanus alexandrei* Moura & Lindeman, 2007 (Perciformes: Lutjanidae), off the northern coast of Pernambuco, Brazil. *Neotrop Ichthyol* 2012; 10(3): 587-592. <http://dx.doi.org/10.1590/S1679-62252012005000022>.
- Froese R, Pauly D. Epi Info – FishBase: version 04/2019 [online]. Stockholm: FishBase; 2019 [cited 2019 Aug 20]. Available from: <http://www.fishbase.org>
- Hernández C, Ibarra-Castro L, Hernández CH, Quintero-Martínez G, Aragón-Noriega EA, Tacon AG. Growth performance of spotted rose snapper in floating cages and continuous water-flow tank systems. *N Am J Aquaculture* 2015; 77(4): 423-428. <http://dx.doi.org/10.1080/15222055.2015.1032458>.
- Humes AG, Gooding RU. A method for studying the external anatomy of copepods. *Crustaceana* 1964; 6(3): 238-240. <http://dx.doi.org/10.1163/156854064X00650>.
- Ibarra-Castro L, Duncan NJ. GnRHa-induced spawning of wild-caught spotted rose snapper *Lutjanus guttatus*. *Aquaculture* 2007; 272(1-4): 737-746. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.09.007>.
- Johnson SC, Treasure JW, Bravo S, Nagasawa K, Kabata Z. A review of the impact of parasitic copepods on marine aquaculture. *Zoologic Stud* 2004; 43(2): 229-243.

- Luque JL, Poulin R. Metazoan parasite species richness in Neotropical fishes: hotspots and the geography of biodiversity. *Parasitology* 2007; 134(6): 865-878. <http://dx.doi.org/10.1017/S0031182007002272>. PMID:17291392.
- Luque JL, Tavares LE. Checklist of Copepoda associated with fishes from Brazil. *Zootaxa* 2007; 1579(1): 1-39. <http://dx.doi.org/10.11646/zootaxa.1579.1.1>.
- Luque JL, Vieira F, Takemoto R, Pavanelli G, Eiras J. Checklist of Crustacea parasitizing fishes from Brazil. *Check List* 2013; 9(6): 1449-1470. <http://dx.doi.org/10.15560/9.6.1449>.
- Morales-Serna FN, Medina-Guerrero RM, Fajer-Avila EJ. Sea lice (Copepoda: Caligidae) parasitic on fishes reported from the Neotropical region. *Neotrop Biodivers* 2016; 2(1): 141-150. <http://dx.doi.org/10.1080/23766808.2016.1236313>.
- Nelson JS, Grande TC, Wilson MV. *Fishes of the world*. 5th ed. USA: John Wiley & Sons; 2016. <http://dx.doi.org/10.1002/9781119174844>.
- Oliveira BL, Souza RM, Silva JP Fo, Gomes LC, Fernandes LFL. Hematological and biochemical characteristics during the transport of dog snapper *Lutjanus jocu* (Perciformes: Lutjanidae). *Neotrop Ichthyol* 2018; 16(1): e170140. <http://dx.doi.org/10.1590/1982-0224-20170140>.
- Pearse AS. Parasitic Crustacea from Bimini, Bahamas. *Proc Unit Stat Nat Mu* 1951; 101(3280): 341-372. <http://dx.doi.org/10.5479/si.00963801.101-3280.341>.
- Pilla S, Vankara AP, Chikkam V. Copepod parasites of snappers, *Lutjanus* spp (Pisces, Lutjanidae) with description of a new caligid copepod, *Caligus rivulatus* sp nov (Copepoda, Caligidae) from Visakhapatnam coast, India. *Cibtech J Zool* 2012; 1: 16-24.
- Sanches EG, Oliveira IR, Serralheiro PCS, Cerqueira VR. Sperm cryopreservation of lane snapper *Lutjanus synagris* (Linnaeus, 1758). *Braz J Biol* 2015; 75(3): 662-669. <http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.20613>. PMID:26465727.
- Sanches EG. Rearing of mutton snapper *Lutjanus analis* subjected to different diets. *Bioikos (Campinas)* 2011; 25(1): 33-40.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM OCEANOGRAFIA AMBIENTAL**

CAPÍTULO 5

**Efeito da salinidade em parâmetros bioquímicos e hematológicos do dentão
Lutjanus jocu (Perciformes: Lutjanidae)
(Artigo a ser submetido para a revista Aquaculture Reports - Novo Qualis A2)**

**VITÓRIA
2020**

Efeito da salinidade em parâmetros bioquímicos e hematológicos do dentão *Lutjanus jocu* (Perciformes: Lutjanidae)

Bruno De Laquila Oliveira¹, Ana Cecília Gomes Silva Malanski³, Evandro Malanski³, Jorge P. Silva Filho², Levy de Carvalho Gomes⁵, Halysson Pena Ribeiro³, Dandara Cabral⁵, Luís André Sampaio⁴, Luiz Fernando Loureiro Fernandes²

¹ Programa de Pós-Graduação em Oceanografia Ambiental, Base Oceanográfica, Universidade Federal do Espírito Santo. Rodovia ES-010, km 16, Aracruz-ES, Brazil.

² Departamento de Oceanografia e Ecologia, Universidade Federal do Espírito Santo. Av. Fernando Ferrari 514, Vitória-ES, Brazil.

³ Laboratório de Cultivo de Organismos Marinhos, Universidade Federal do Espírito Santo, Base Oceanográfica. Rodovia ES-010 km 16, Aracruz-ES, Brazil.

⁴ Programa de Pós-graduação em Aquicultura, Estação Marinha de Aquicultura, Instituto de Oceanografia, Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rua do Hotel no. 02, Cassino, Rio Grande, RS, Brazil.

⁵ Universidade Vila Velha, UVV. Comissário José Dantas de Melo, 21, 29102-770, Vila Velha, ES, Brazil.

Resumo: A salinidade exerce influência sobre diversos mecanismos fisiológicos, reprodutivos e comportamentais em peixes. O conhecimento das características hematológicas e bioquímicas é uma ferramenta não letal importante, que pode ser usada como parâmetro eficaz e sensível para caracterizar e monitorar peixes cultivados. O objetivo do presente estudo foi avaliar a influência da salinidade (0-30) nos parâmetros bioquímicos e hematológicos em juvenis de dentão (*Lutjanus jocu*). Não foram encontradas diferenças significativas entre as salinidades testadas para cortisol e glicose, enquanto para lactato houve diferença significativa entre o tratamento de salinidade 0 e 15. Para os parâmetros hematológicos, houve diferença significativa apenas para leucócitos e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM). O presente estudo indicou através de parâmetros bioquímicos e hematológicos que juvenis de *L. jocu* são tolerantes a uma grande amplitude de salinidade (0 a 30) em cultivo de curto prazo (15 dias). Estudos de longo prazo em baixas salinidades e diferentes tamanhos devem ser incentivados.

Palavras chave: Aquicultura, Bioquímica, Hematologia, *Lutjanus jocu*, Salinidade.

Abstract: Salinity influences several physiological, reproductive and behavioral mechanisms in fish. Knowledge of hematological and biochemical characteristics is an important non-lethal tool, which can be used as an effective and sensitive parameter to characterize and monitor farmed fish. The aim of the present study was to evaluate the influence of salinity (0-30) on biochemical and hematological parameters in juvenile dog snappers (*Lutjanus jocu*). No significant differences were found between the salinities tested for cortisol and glucose, while for lactate there was a significant difference between the treatment of salinity 0 and 15. For hematological parameters, there was a significant difference only for leukocytes and mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC). The present study indicated through biochemical and hematological parameters that juveniles of *L. jocu* are tolerant to a wide range of salinities (0 to 30) in a short period of 15 days. Long-term studies on low salinities and different sizes should be encouraged.

Keywords: Aquaculture, Biochemistry, Hematology, *Lutjanus jocu*, Salinity.

INTRODUÇÃO

A salinidade é um fator ambiental crucial que altera as respostas fisiológicas, o crescimento e a sobrevivência em peixes, sendo importante conhecer os efeitos de diferentes salinidades em cada espécie para determinar a melhor condição para a criação (Anni et al., 2016). Na aquicultura, trabalhos apontam que a salinidade exerce influência sobre diversos mecanismos como a fecundação, incubação, embriogênese, inflação da bexiga natatória, desova, eficiência alimentar e crescimento (El-Sayed et al., 2005; Flores e Mark Shrimpton, 2012; Lisboa et al., 2015). Portanto, o conhecimento da capacidade osmorregulatória de uma espécie é chave para o desenvolvimento de técnicas de cultivo mais apropriadas.

A adaptação de peixes eurialinos a diferentes salinidades envolve mudanças nos mecanismos de transporte de íons, que promovem variações nas demandas energéticas para osmorregulação (Mylonas et al., 2009), onde a energia poupada pode variar de 10% a mais de 50% (Boeuf e Payan, 2001). Espera-se que peixes criados em salinidades com osmolaridade semelhante a sanguínea (ponto isosmótico) possam ter

um custo energético menor (Gaumet et al., 1995; Lisboa et al., 2015). Os tempos de ativação de respostas osmorregulatórias podem influenciar a tolerância fisiológica da espécie estudada, podendo se dar de forma aguda ou crônica, e a tolerância fisiológica, portanto, está relacionada com a ativação de mecanismos compensatórios que permitam os teleósteos manterem a homeostase sem configurar um estresse osmótico (Schultz e McCormick, 2013).

O conhecimento das características hematológicas e bioquímicas é uma ferramenta importante que pode ser usada como parâmetro eficaz e sensível para monitorar mudanças fisiológicas em peixes (Zarejabad et al., 2010), e com a expansão da aquicultura, o monitoramento da saúde de peixes através de técnicas não letais será cada vez mais necessário (Hrubec et al., 2000). Os parâmetros sanguíneos podem ser usados como indicadores no monitoramento do bem-estar dos peixes, sendo utilizados como ferramenta para o diagnóstico de estresse animal e na detecção de agentes infecciosos.

O cortisol pode desempenhar um importante papel na sinalização do estresse oxidativo, ativando o metabolismo em teleósteos (Olsen et al., 2008). É um corticoide importante no processo de osmorregulação e está associado à resposta primária de estresse (Sakamoto et al., 2001; Tsuzuki et al., 2007). O custo energético associado à osmorregulação em peixes é mantido principalmente pela oxidação da glicose (Pérez-Robles et al., 2011), enquanto o aumento de lactato plasmático ocorre quando há insuficiência de oxigênio disponível para o metabolismo celular aeróbico, desencadeando aumento da gliconeogênese a partir do lactato (Olsen et al., 1995), onde ambos estão associados à resposta secundária de estresse.

A hematologia, uma ferramenta valiosa para a determinação da condição fisiológica e dos parâmetros sanguíneos dos peixes, pode ser usada para identificar e avaliar condições que causam estresse ou doenças que afetam o desempenho da produção (Fazio et al., 2017; Tavares-Dias e Moraes, 2007; Toorchi et al. 2012), sendo reconhecido como resposta secundária diante de situações de estresse (Pierson et al., 2004). Em um sistema intensivo, perdas econômicas podem ser minimizadas quando métodos hematológicos são utilizados como auxiliares em diagnóstico de estado nutricional, estresse e doenças (Fazio, 2019).

Peixes do gênero *Lutjanus*, ao contrário do que acontece na natureza, em condições de cultivo apresentam um rápido crescimento e podem ser considerados como potenciais espécies para aquicultura, em função de seu desempenho produtivo e elevada demanda (Garcia-Ortega, 2009; Watanabe, 2001). São considerados importantes recursos pesqueiros, com alto valor de mercado, e explorados comercialmente nas águas costeiras tropicais e subtropicais (Frédou et al., 2006). Possuem elevada rusticidade e adaptabilidade ao cultivo, com algumas espécies bem estabelecidas e outras sendo estudadas em tanques escavados e em tanques-rede nas regiões costeiras e oceânicas (Ibarra-Castro e Duncan, 2007).

O dentão (dog snapper), *Lutjanus jocu* (Bloch e Schneider, 1801), pode ser encontrado em áreas da plataforma continental do Oceano Atlântico ocidental, com distribuição entre a Flórida (EUA) ao sudeste do Brasil, alimentando-se preferencialmente de peixes, camarões, caranguejos, cefalópodes e gastrópodes (Frédou et al., 2009; Previero et al., 2011). Podem ser encontrados em águas marinhas, salobras e doce, sendo um dos poucos lutjanídeos que pode ser encontrado em água doce (Allen, 1985). São de grande importância na pesca brasileira, considerado plenamente explorado e vulnerável aos efeitos de sobrepesca (Froese e Pauly, 2019). Por possuir alto valor de mercado, elevada rusticidade e ocorrência em águas salobra e doce, o dentão apresenta-se como uma potencial espécie para o desenvolvimento de um pacote tecnológico para seu cultivo. Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a influência da salinidade (0-30) nos parâmetros bioquímicos e hematológicos em juvenis de dentão (*L. jocu*).

METODOLOGIA

Desenho experimental

Exemplares de dentão (212 ± 68 g e $22,7 \pm 4,1$ cm) foram coletados no estuário do rio Piraquê-mirim, Aracruz/ES, sudeste do Brasil ($19^{\circ}56'S$ $40^{\circ}10'W$), através de rede de espera (Autorização para atividade com finalidades científicas do ICMBio SISBIO número 52082-2), acondicionados próximo ao local de captura em um tanque-rede de 4 m^3 . Após 30 dias, foram transferidos para o Laboratório de Cultivo de Organismos Marinhos da Universidade Federal do Espírito Santo (Protocolo 96/2015 do Comitê de Ética para Uso de Animais CEUA/UFES). Os peixes foram mantidos em tanques de fibra de vidro de 500L em sistema de recirculação de água (SRA). Foram monitorados os parâmetros físico-químicos (sonda YSI Professional Plus), com valores médios de temperatura $23,5 \pm 0,8$ °C, pH $7,82 \pm 0,65$, oxigênio dissolvido $5,69 \pm 0,4$ mg L⁻¹ e salinidade $30 \pm 0,5$. O fotoperíodo foi fixado em 12/12.

Antes do início do experimento, foi adotado um período de aclimação de 20 dias, considerando que todos os peixes já apresentavam comportamento ativo e alimentação normal antes de serem designados para seus tratamentos de salinidade. Os peixes foram divididos aleatoriamente em 12 tanques de 500L e progressivamente aclimatados durante quatro dias para as salinidades experimentais desejadas (0, 5, 15 e 30), sendo 5 peixes por tanque em triplicata (15 peixes por grupo de salinidade). As diluições foram preparadas com água doce previamente desclorada a partir da água do mar local (salinidade 30).

Visando comparar os resultados do presente estudo com os obtidos anteriormente para outros peixes teleósteos eurialinos, foi utilizado um período experimental (15 dias) semelhante ao utilizado em estudos anteriores com o mesmo objetivo (Sampaio e Bianchini, 2002; Anni et al., 2016), onde espera-se que todas as respostas fisiológicas relacionadas à aclimação dos peixes a mudanças na salinidade da água ambiente já tenham ocorrido (Baldisserotto et al., 2013; Lisboa et al., 2015).

Durante o período experimental, os peixes foram alimentados uma vez ao dia com dieta comercial (GuabiTech Carnívoros Marinhos 4-5mm com 45% de proteína bruta) até saciedade aparente. Após a alimentação, os tanques foram sifonados para

remoção de fezes e restos de comida, e a água parcialmente renovada (80%) diariamente.

Procedimentos analíticos

Os peixes foram individualmente anestesiados com eugenol (50 ppm) e o sangue (1,5-2 ml) colhido por punção caudal com auxílio de seringa de 3 mL (agulha com EDTA), onde cada coleta durou menos de 2 min, a fim de evitar a elevação dos parâmetros pela manipulação durante a amostragem.

O cortisol foi determinado no soro com um kit de ensaio imunoenzimático (ELISA Kit - DBC®- Diagnostics Biochem Canada Inc.), e a absorbância foi lida em um leitor de microplacas (450 nm). As concentrações de glicose plasmático e hemoglobina (kit comercial Bioclin®, Brasil), e lactato plasmático (kit BioTecnica®, Brasil), foram realizados por método colorimétrico e análise em espectrofotômetro.

A leitura de hematócrito (%) foi determinada após centrifugação do sangue em tubos microcapilares heparinizados. Para a contagem de eritrócitos foram realizadas diluições de 1:200 em solução corante (Na₂EDTA, formaldeído, NaCl, NaOH, azul de metileno) e a contagem efetuada de forma direta em câmara de Neubauer sob microscópio óptico (Olympus CX41). Para a contagem diferencial e total de leucócitos e trombócitos foram preparadas extensões sanguíneas secas à temperatura ambiente, fixadas e coradas com o corante panótico rápido (kit comercial RENYLAB®, Brasil), e contagem pelo método indireto. A partir desses resultados, foram calculados, segundo Wintrobe (1934), o volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM).

Análise Estatística

Os dados foram diagnosticados quanto à normalidade de distribuição e homogeneidade. A análise estatística foi realizada separadamente para cada parâmetro usando a Análise de Variância (ANOVA) e as comparações entre os grupos (tratamentos) foram realizadas utilizando o teste Tukey ($p < 0,05$). Os resultados estão apresentados como médias e desvio padrão e todas as análises foram realizadas pelo programa PAST.

RESULTADOS

Após o período experimental de 15 dias, não houve mortalidade e todos os peixes estavam se alimentando ativamente. Nenhuma diferença significativa no peso e comprimento foi observada no final do experimento entre os grupos de diferentes salinidades ambientais. Concentrações de cortisol sérico, glicose e lactato plasmático em juvenis de *L. jocu* em diferentes salinidades após 15 dias são mostradas na Figura 1. Não foram encontradas diferenças significativas entre as salinidades testadas para cortisol e glicose, enquanto para lactato houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre o tratamento de salinidade 0 ($11,3 \pm 1,20 \text{ mg dL}^{-1}$) e 15 ($9,8 \pm 0,79 \text{ mg dL}^{-1}$). No entanto, o controle (30), não apresentou diferença em relação ao tratamento com água doce (0).

Os parâmetros hematológicos do dentão cultivados em diferentes salinidades são mostrados na Tabela 1. Houve diferença significativa entre os tratamentos apenas para leucócitos e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM). Para leucócitos, o tratamento na salinidade 15 ($68,33 \pm 10,71 \cdot 10^3 \mu\text{L}^{-1}$) obteve a menor média entre os tratamentos, diferenciando-se significativamente do tratamento na salinidade 0 ($82,30 \pm 11,63 \cdot 10^3 \mu\text{L}^{-1}$). A concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), calculado pela razão entre hemoglobina e hematócrito, apresentou diferenças significativa entre os tratamentos de água doce ($16,99 \pm 2,85 \text{ g dL}^{-1}$) e salinidade 5 ($14,13 \pm 2,24 \text{ g dL}^{-1}$).

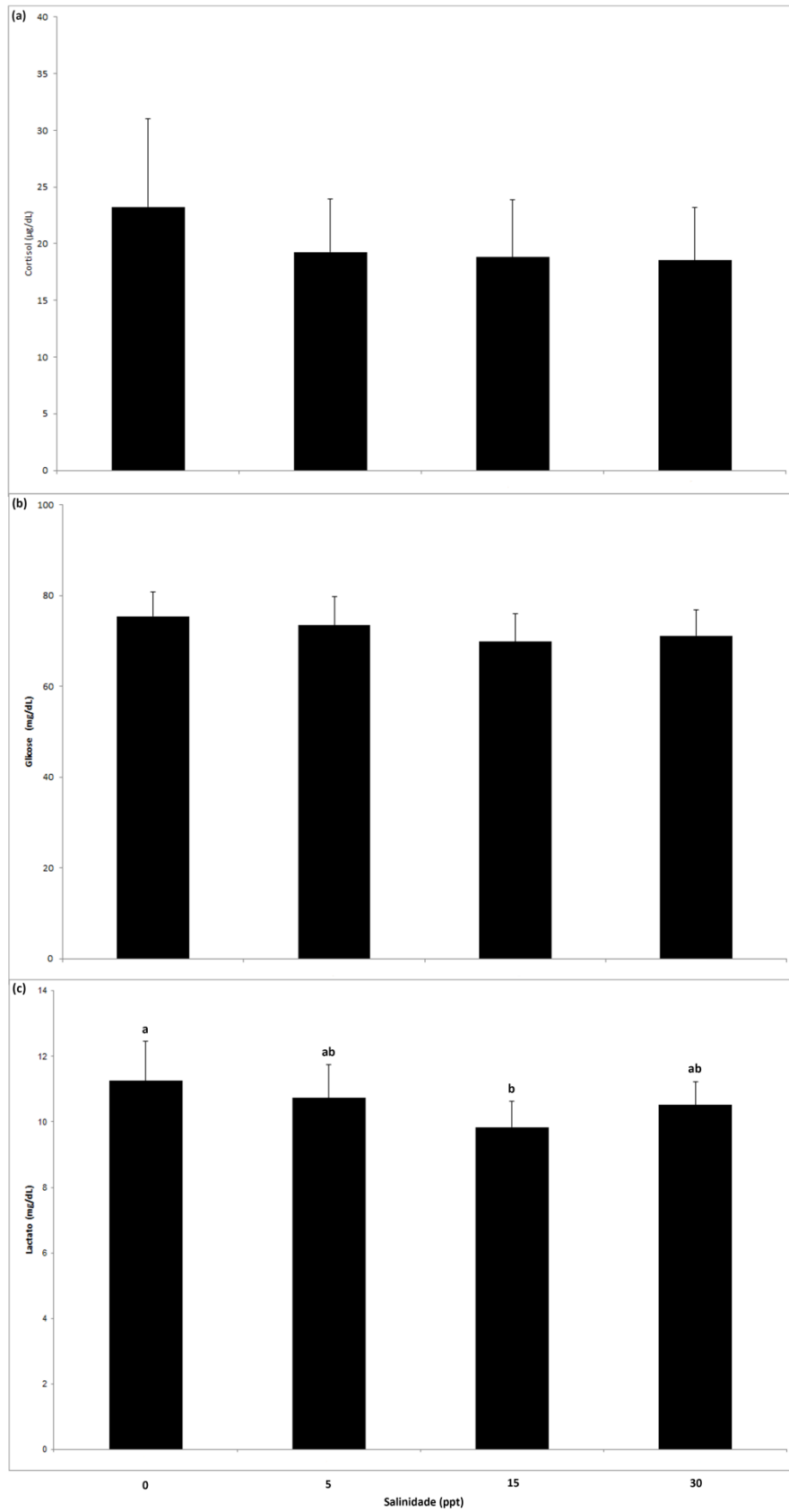


Figura 1. Concentração de cortisol (a), glicose (b) e lactato (c) em juvenis de *L. jocu* cultivados sob diferentes salinidades (0, 5, 15 e 30) durante um período de 15 dias.

Tabela 1 - Parâmetros hematológicos do dentão (*Lutjanus jocu*) cultivados sob diferentes salinidades durante um período de 15 dias.

Parâmetros hematológicos	Salinidades ambientais				P
	0	5	15	30	
Hemoglobina (g dL ⁻¹)	8,90 ± 1,76	8,17 ± 1,39	7,97 ± 0,85	8,15 ± 0,95	0,2223
Eritrócitos (10 ⁶ mm ³)	2,17 ± 0,49	2,17 ± 0,37	1,95 ± 0,45	1,99 ± 0,31	0,3204
Hematócrito (%)	55,30 ± 8,36	58,12 ± 7,03	53,53 ± 9,89	51,22 ± 11,76	0,2431
Leucócitos (10 ³ µL ⁻¹)	82,30 ± 11,63 a	71,80 ± 13,85 ab	68,33 ± 10,71 b	69,56 ± 18,41 ab	0,0334
Neutrófilos (%)	19,80 ± 10,30	14,07 ± 11,00	13,60 ± 7,39	14,87 ± 8,21	0,2506
Linfócitos (%)	77,07 ± 10,40	80,73 ± 12,28	81,13 ± 8,69	80,40 ± 7,98	0,666
Monócitos (%)	3,13 ± 2,47	5,20 ± 4,04	5,27 ± 2,84	4,73 ± 1,87	0,1676
Trombócitos (10 ³ µL ⁻¹)	32,13 ± 10,76	34,83 ± 10,83	35,28 ± 9,68	30,69 ± 6,16	0,5054
VCM (µL ⁻¹)	250,35 ± 49,17	277,38 ± 69,58	283,35 ± 70,76	258,99 ± 49,74	0,413
HCM (%)	41,91 ± 7,78	38,55 ± 8,48	43,04 ± 10,93	41,65 ± 6,31	0,5218
CHCM (g dL ⁻¹)	16,99 ± 2,85 a	14,13 ± 2,24 b	15,39 ± 3,37 ab	16,42 ± 2,81 ab	0,041

Média ± DP. Diferentes letras (a ou b) indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos.

DISCUSSÃO

O presente estudo mostrou que juvenis de *L. jocu* são capazes de se adaptar e serem cultivados dentro de uma ampla faixa de salinidade (0 a 30) durante o período experimental de 15 dias, o que permite confirmar e classificá-lo como uma espécie eurialina. Diversos estudos apontam outras espécies de lutjanídeos cultivados em laboratórios ou gaiolas como eurialinos: *Lutjanus argentiventris* (Serrano-Pinto e Caraveo-Patiño, 1999), *Lutjanus argentimaculatus* (Estudillo et al., 2000; Van Chi e True, 2018), *Lutjanus griseus* (Serrano et al., 2010), *Lutjanus peru* (Castillo-Vargasmachuca et al., 2013).

Essa capacidade de adaptação a diferentes salinidades para teleósteos eurialinos ocorre em um período relativamente curto, onde, no presente trabalho, demonstrou-se que o período de 15 dias foi suficiente para que os níveis de cortisol não apresentassem diferença entre os tratamentos. Tahir et al. (2018) expondo uma espécie de garoupa *Epinephelus fuscoguttatus* em salinidade de 5 a 31, reportou que, apesar de existir diferença significativa dos níveis de cortisol sérico nos 60 primeiros minutos, houve decréscimo e estabilização aos 120 minutos pós-desafio. Tsui et al. (2012) também constatou que a garoupa *Epinephelus malabaricus* é um bom osmorregulador e pode ser cultivado em vários níveis de salinidade, sendo essa capacidade também explicada através dos níveis de cortisol, glicose e lactato. Os padrões temporais de aclimação da água do mar na truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss* mostraram duas fases diferentes: adaptação inicial que durou 4 dias com rápidas mudanças fisiológicas, e a de estabilização, que resultou em um novo equilíbrio com a água marinha dentro de 8 dias (Bath e Eddy, 1979).

As menores médias dos parâmetros bioquímicos de cortisol, glicose e lactato foram encontrados no tratamento de salinidade 15, o que pode sugerir uma melhor capacidade adaptativa do dentão em salinidades próximas ao ponto isosmótico, também evidenciado por outros trabalhos para teleósteos marinhos (Anni et al., 2016; Herrera et al., 2009; Jensen et al., 1998; Ruiz-Jarabo et al., 2018; Sampaio et al., 2002). Por ser uma espécie de grande transitoriedade, juvenis de *Lutjanus jocu* podem ser observados migrando em uma grande variedade de habitats próximos à costa, que variam de rios, estuários até o ambiente marinho, e essas mudanças na salinidade

externa têm custos energéticos, o que pode justificar uma melhor adaptabilidade fisiológica em águas próximas ao ponto isosmótico.

Serrano et al. (2010) em experimento comportamental *indoor*, demonstrou que *Lutjanus griseus* tendia a selecionar salinidades isosmóticas (12) que minimizassem os custos osmorregulatórios em comparação com extremos de salinidade, inclusive inferiores a 30 (salinidade em que foram capturados e mantidos). No presente trabalho, os indivíduos de *L. jocu* também foram capturados e mantidos em salinidade 30 antes da realização do experimento. Algumas espécies, como o bacalhau *Gadus morhua*, apresentam melhor crescimento quando aclimatados a uma salinidade próxima ao ponto isosmótico (15) ou hiposmótico (7) comparado ao ambiente marinho (Lambert et al., 1994). Van Chi e True (2018) ao cultivar juvenis de *Lutjanus argentimaculatus* em água com salinidade moderada (15-20), obtiveram uma taxa de sobrevivência melhorada em 20% e o crescimento em quase 10%.

Níveis elevados de glicose e lactato no sangue estão geralmente associados à aclimação de salinidade como resposta secundária ao estresse para lidar com a osmorregulação (Herrera et al., 2009). Ao final do período experimental, as respostas primárias e secundárias do dentão sob grande amplitude de salinidade foram suficientes para a normalização dos parâmetros bioquímicos, onde apenas o lactato demonstrou diferença significativa e o tratamento de salinidade 15 obteve a menor média, reforçando melhor conforto próximo ao ponto isosmótico. Oliveira et al. (2018) apontou que parâmetros de glicose e lactato foram eficientes para avaliar o nível de stress após o transporte de *L. jocu*, que indicaram aumento 2 h após o transporte e retorno aos níveis basais em 24 h, demonstrando assim, a excelente capacidade de resposta dessa espécie ao estresse agudo.

Em relação às células da série branca dos peixes, considera-se, de acordo com Vosyliene (1999), que a variação do número de leucócitos circulantes pode ser atribuído a uma resposta generalizada do sistema imune, acionado pelo estresse fisiológico e conseqüente estado de saúde afetado. Os animais sob estresse adaptam-se de várias maneiras para sobreviver, por exemplo, aumentando a quantidade de leucócitos em resposta às mudanças de salinidade, e o aumento de leucócitos devido ao estresse pode servir como indicador de adaptação e resistência a distúrbios externos (Fatimah et al., 2017). O aumento de leucócitos pode ser observado no início

de um estresse na maioria das espécies de peixes, sendo considerado como uma tentativa de recuperar a homeostase em desequilíbrio, o que foi evidenciado neste trabalho através de um aumento significativo de leucócitos do tratamento de água doce em relação ao 15 (próximo ao ponto isosmótico). Neste estudo, a contagem diferencial foi composta por elevado número de linfócitos, seguidos por neutrófilos e monócitos, semelhante ao relatado em cioba *Lutjanus analis* (Dotta et al., 2015) e robalo flecha *Centropomus undecimalis* (Fujimoto et al., 2009). Porém, não houve diferença significativa entre os tratamentos de salinidade para esses parâmetros.

Alterações nos valores de hematócrito têm sido utilizadas para avaliar respostas fisiológicas de peixes relacionadas a alterações na salinidade (Fang et al., 2019; Martinez-Álvarez et al., 2002; Prakoso et al., 2016). A falta de alterações no nível de hematócrito em função da salinidade da água ambiente é evidência de que os juvenis de *L. jocu* foram bem aclimatados após 15 dias de transferência para as novas condições de salinidade testadas.

Os índices hematimétricos podem ser utilizados na caracterização e monitoramento de patologias e estresse (Tavares-Dias et al., 2002). Dentre os três índices relacionados no experimento, apenas CHCM apresentou diferença entre o tratamento de salinidade 0 e 5, evidenciando um parâmetro importante de análise, já que os parâmetros individualmente apresentados de hemoglobina e hematócrito não apresentaram diferença. Munro et al. (1994) expondo uma espécie de linguado (*Hippoglossoides platessoides*) a diferentes salinidades ambientais (7, 14, 21 e 28) encontrou uma tendência de aumento nos níveis de MCHC no quarto dia, diminuição a partir do sétimo dia e estabilização dos valores a partir do vigésimo primeiro dia.

Apesar da amplitude de salinidade testada não afetar ou afetar levemente os parâmetros bioquímicos e hematológicos em *L. jocu* após uma exposição de curta duração (15 dias), devemos considerar que a exposição a essas salinidades por períodos mais longos pode induzir efeitos diferenciados. Após a realização do experimento, os peixes do tratamento com água doce foram mantidos por mais 85 dias, totalizando 100 dias com os 15 do experimento, e não foi registrado mortalidade. Entretanto, estudos de longo prazo (90 dias) mostram que a exposição de *Paralichthys orbignyanus* à salinidade extremamente baixa (água doce) induziu uma diminuição significativa na osmolaridade plasmática (Sampaio e Bianchini, 2002). Com base em

Morgan e Iwama (1991), esse tipo de resposta pode indicar que o peixe está sujeito a uma condição estressante de salinidade.

A possibilidade de cultivo do dentão em uma faixa segura de salinidade de 0 a 15, pelo período de 15 dias, permitirá a mitigação e eliminação de diversas parasitoses através da imersão dos organismos nesta faixa de salinidade, sem prejuízos com mortalidade, inibindo e combatendo parasitos já relatados para *L. jocu* em cultivo (Oliveira et al., 2020).

O presente estudo indicou através de parâmetros bioquímicos e hematológicos que juvenis de *L. jocu* são tolerantes a uma grande amplitude de salinidade (0 a 30) em cultivo de curto prazo (15 dias). Estudos de longo prazo em baixas salinidades e diferentes tamanhos devem ser incentivados, pois *L. jocu* é uma espécie de alto valor comercial e pode ser interessante para empreendimentos em locais distantes de áreas costeiras, e suas vantagens estariam associadas a preços de produção mais baixos do cultivo continental em relação ao marinho, proximidade dos mercados locais e facilidade na obtenção de licenças.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Código de Financiamento 001, por apoiar o primeiro autor com bolsa de pós-graduação.

REFERENCIAS

Allen, G.R., 1985. FAO species catalogue. Snappers of the world. Vol. 6 Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 6, 208.

Anni, I.S.A., Bianchini, A., Barcarolli, I.F., Junior, A.S.V., Robaldo, R. B., Tesser, M. B., Sampaio, L.A., 2016. Salinity influence on growth, osmoregulation and energy turnover in juvenile pompano *Trachinotus marginatus* Cuvier 1832. *Aquaculture* 455, 63-72.

Baldisserotto, B., 2013. Fisiologia de peixes aplicada à aquicultura. 3ª Ed., Santa Maria.

Bath, R.N., Eddy, F.B., 1979. Salt and water balance in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) rapidly transferred from fresh water to sea water. *J Exp Biol* 83, 193-202.

Boeuf, G., Payan, P., 2001. How should salinity influence fish growth? *Comp. Biochem. Physiol.* 130, 411-423.

Castillo-Vargasmachuca, S., Ponce-Palafox, J.T., Rodríguez-Chávez, G., Arredondo-Figueroa, J.L., Chávez-Ortiz, E., Seidavi, A., 2013. Effects of temperature and salinity on growth and survival of the Pacific red snapper *Lutjanus peru* (Pisces: Lutjanidae) juvenile. *Lat Am J Aquat Res* 41, 1013-1018.

Dotta, G., Roumbedakis, K., Sanches, E.G., Jeronimo, G.T., Cerqueira, V.R., Martins, M.L., 2015. Hematological profile of the red snapper *Lutjanus analis* captured in Florianópolis, SC, Brazil, and cultured in floating net cages. *Bol. Inst. Pesca* 41, 183-189.

El-Sayed, A.F.M., Mansour, C.R., Ezzat, A.A., 2005. Effects of dietary lipid source on spawning performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) broodstock reared at different water salinities. *Aquaculture* 248, 187-196.

Estudillo, C.B., Duray, M.N., Marasigan, E.T., Emata, A.C., 2000. Salinity tolerance of larvae of the mangrove red snapper (*Lutjanus argentimaculatus*) during ontogeny. *Aquaculture* 190, 155-167.

Fang, Y., Chan, V.K., Hines, C.W., Stiller, K.T., Richards, J.G., Brauner, C.J., 2019. The effects of salinity and photoperiod on aerobic scope, hypoxia tolerance and swimming performance of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) reared in recirculating aquaculture systems. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 231, 82-90.

Fatimah, F., Rachmawati, F.N., Wibowo, E.S., 2017. Leukocyte Differential of Anguillid Eel, *Anguilla Bicolor* McClelland, Exposed to Varied Salinities. *Scripta Biologica* 4, 169274.

Fazio, F., Arfuso, F., Levanti, M., Saoca, C., Piccione, G., 2017. High stocking density and water salinity levels influence haematological and serum protein profiles in mullet *Mugil cephalus*, Linnaeus, 1758. *Cah. Biol. Mar.* 58, 331–339.

Fazio, F., 2019. Fish hematology analysis as an important tool of aquaculture: a review. *Aquaculture* 500, 237-242.

Flores, A.M., Shrimpton, J.M., 2012. Differential physiological and endocrine responses of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, transferred from fresh water to ion-poor or salt water. *Gen. Comp. Endocrinol.* 175, 244-250.

Frédou, T., Ferreira, B.P., Letourneur, Y., 2006. A univariate and multivariate study of reef fisheries of northeastern Brazil. *ICES J. Mar. Sci.* 63, 883-896.

Frédou, T., Ferreira, B. P., Letourneur, Y., 2009. Assessing the stocks of the primary snappers caught in Northeastern Brazilian reef systems. 1: Traditional modelling approaches. *Fish. Res.* 99, 90-96.

Fujimoto, R.Y., Santana, C.A., Carvalho, W.L.C., Diniz, D.G., Barros, Z.M.N., Varella, J.E.A., Guimarães, M.D.F., 2009. Hematologia e parasitas metazoários de camurim (*Centropomus undecimalis*, Bloch, 1792) na região Bragantina, Braganá, Pará. Bol. Inst. Pesca 35, 441-450.

Froese, R., Pauly, D., 2019. FishBase. World Wide Web electronic publication. <http://www.fishbase.org>.

Gaumet, F., Boeuf, G., Severe, A., Le Roux, A., Mayer-Gostan, N., 1995. Effects of salinity on the ionic balance and growth of juvenile turbot. J. Fish Biol. 47, 865–876.

Garcia-Ortega, A., 2009. Nutrition and feeding research in the spotted rose snapper *Lutjanus guttatus* and bullseye puffer *Sphoeroides annulatus*, new species for marine aquaculture. Fish Physiol. Biochem. 35:69-80.

Herrera, M., Vargas-Chacoff, L., Hachero, I., Ruíz-Jarabo, I., Rodiles, A., Navas, J.I., Mancera, J.M., 2009. Osmoregulatory changes in wedge sole (*Dicologlossa cuneata* Moreau, 1881) after acclimation to different environmental salinities. Aquacult. Res. 40, 762-771.

Hrubec, T.C., Cardinale, J.L., Smith, S.A., 2000. Hematology and plasma chemistry reference intervals for cultured tilapia (*Oreochromis hybrid*). Vet Clin Pathol 29, 7–12.

Ibarra-Castro, L., Duncan, N.J., 2007. GnRH α -induced spawning of wild-caught spotted rose snapper *Lutjanus guttatus*. Aquaculture 272, 737-746.

Jensen, M.K., Madsen, S.S., Kristiansen, K., 1998. Osmoregulation and salinity effects on the expression and activity of Na⁺,K⁺-ATPase in the gills of European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.). J. Exp. Zool. 282, 290–300.

Lambert, Y., Dutil, J. D., Munro, J., 1994. Effects of intermediate and low salinity conditions on growth rate and food conversion of Atlantic cod (*Gadus morhua*). Can. J. Fish. Aquat. Sci. 51, 1569–1576.

Lisboa, V., Barcarolli, I.F., Sampaio, L.A., Bianchini, A., 2015. Effect of salinity on survival, growth and biochemical parameters in juvenile Lebranch mullet *Mugil liza* (Perciformes: Mugilidae). Neotrop. Ichthyol. 13, 447-452.

Martinez-Alvarez, R.M., Hidalgo, M.C., Domezain, A., Morales, A.E., García-Gallego, M., Sanz, A., 2002. Physiological changes of sturgeon *Acipenser naccarii* caused by increasing environmental salinity. J Exp Biol 205, 3699-3706.

Munro, J., Audet, C., Besner, M., Dutil, J.D., 1994. Physiological response of American plaice (*Hippoglossoides platessoides*) exposed to low salinity. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 51, 2448-2456.

Morgan, J.D., Iwama, G.K., 1991. Effects of salinity on growth, metabolism, and ion regulation in juvenile rainbow and steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) and fall chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). Can. J. Fish. Aquat. Sci. 48, 2083-2094.

Mylonas, C.C., Pavlidis, M., Papandroulakis, N., Zaiss, M.M., Tsafarakis, D., Papadakis, I. E., Varsamos, S., 2009. Growth performance and osmoregulation in the shi drum (*Umbrina cirrosa*) adapted to different environmental salinities. Aquaculture 287, 203-210.

Oliveira, B.L., Souza, R.M., Silva Filho, J.P., Gomes, L.C., Fernandes, L.F.L., 2018. Hematological and biochemical characteristics during the transport of dog snapper *Lutjanus jocu* (Perciformes: Lutjanidae). Neotrop. Ichthyol. 16.1.

Oliveira, B.L., Fernandes, L.F.L., Rocha, G.M., Malanski, A.C.G.S., Paschoal, F., 2020. Occurrence of *Caligus asperimanus* Pearse, 1951 (Copepoda: Caligidae) parasitic

Lutjanus spp. (Perciformes: Lutjanidae) in the western South Atlantic. Braz J Vet Parasitol 29, e018219.

Olsen, Y.A., Einarsdottir, I.E., Nilssen, K.J., 1995. Metomidate anaesthesia in Atlantic salmon, *Salmo salar*, prevents plasma cortisol increase during stress. Aquaculture 134, 155-168.

Olsen, R.F., Sundell, K., Ringo, E., Reider, M., Hemre, G.-I., Hansen, T., Karlsen, O., 2008. The acute stress response in fed and food deprived Atlantic cod, *Gadus morhua* L. Aquaculture 280, 232–241.

Pérez-Robles, J., Re, A.D., Giffard-Mena, I., Díaz, F., 2011. Interactive effects of salinity on oxygen consumption, ammonium excretion, osmoregulation and Na⁺/K⁺-ATPase expression in bullseye puffer (*Sphoeroides annulatus*, Jenyns 1842). Aquac. Res. 43, 1372–1383.

Pierson, P.M., Lamers, A., Flik, G., Mayer-Gostan, N. 2004. The stress axis, stanniocalcin, and ion balance in rainbow trout. Gen. Comp. Endocrinol. 137, 263-271.

Prakoso, V.A., Ryu, J.H., Min, B.H., Gustiano, R., Chang, Y.J., 2017. Effects of different salinity levels on physiological and hematological response of rock bream *Oplegnathus fasciatus*. Indonesian Aquaculture Journal 11, 75-79.

Previero, M., Minte-Vera, C.V., Freitas, M.O., Moura, R.L.D., Dei Tos, C., 2011. Age and growth of the dog snapper *Lutjanus jocu* (Bloch & Schneider, 1801) in Abrolhos Bank, Northeastern Brazil. Neotrop. Ichthyol. 9, 393-401.

Ruiz-Jarabo, I., Márquez, P., Vargas-Chacoff, L., Martos-Sitcha, J.A., Cárdenas, S., Mancera, J.M., 2018. Narrowing the range of environmental salinities where juvenile meagre (*Argyrosomus regius*) can be cultured based on an osmoregulatory pilot study. Fishes 3, 48.

Sakamoto, T., Kozaka, T., Takahashi, A., Kawauchi, H., Ando, M., 2001. Medaka (*Oryzias latipes*) as a model for hypoosmoregulation of euryhaline fishes. *Aquaculture* 193, 347-354.

Sampaio, L.A., Bianchini, A., 2002. Salinity effects on osmoregulation and growth of the euryhaline flounder *Paralichthys orbignyanus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 269, 187-196.

Schultz, E.T., McCormick, S.D., 2013. Eurihalinity in an evolutionary contexto, in: *Euryhaline Fishes*. Eds McCormick SD Farrell AP Brauner CJ, New York, pp. 477–529.

Serrano, X., Grosell, M., Serafy, J.E., 2010. Salinity selection and preference of the grey snapper *Lutjanus griseus*: field and laboratory observations. *J. Fish Biol.* 76, 1592-1608.

Serrano-Pinto, V., Caraveo-Patiño, J., 1999. Survival of amarillo snapper *Lutjanus argentiventris* (Peters 1869) at different salinities in captivity. *Aquacult. Res.* 30, 467-470.

Tahir, D., Shariff, M., Syukri, F., Yusoff, F.M., 2018. Serum cortisol level and survival rate of juvenile *Epinephelus fuscoguttatus* following exposure to different salinities. *Vet. World* 11, 327.

Tavares-Dias, M., Melo, J.F.B., Moraes, G., Moraes, F.R.D., 2002. Características hematológicas de teleósteos brasileiros: IV. Variáveis do jundiá *Rhamdia quelen* (Pimelodidae). *Cienci. Rural* 32, 693-698.

Tavares-Dias, M., Moraes, F.R.D., 2007. Leukocyte and thrombocyte reference values for channel catfish (*Ictalurus punctatus* Raf), with an assessment of morphologic, cytochemical, and ultrastructural features. *Vet. Clin. Pathol.* 36, 49-54.

Toorchi, M., Bani, A., Alizadehsabet, H., 2012. Effects of salinity on osmoregulation and plasma cortisol levels of juvenile Caspian trout, *Salmo trutta caspius* Kessler, 1877. J. Appl. Ichthyol. 28, 130-134.

Tsui, W.C., Chen, J.C., Cheng, S.Y., 2012. The effects of a sudden salinity change on cortisol, glucose, lactate, and osmolality levels in grouper *Epinephelus malabaricus*. Fish Physiol. Biochem. 38, 1323-1329.

Tsuzuki, M.Y., Ogawa, K., Strussmann, C.A., Maita, M., Takashima, F., Melo, C.M.R., 2007. The significance of cortisol on acclimation to salinity in pejerrey *Odontesthes bonariensis*. Arq Bras Med Vet Zootec 59, 1301-1307.

Van Chi, V., True, J.D., 2018. Effects of habitat structure and salinity on growth and survival of juvenile mangrove red snapper *Lutjanus argentimaculatus* (Forsskal, 1775). Songklanakarin Journal of Science & Technology 40, 6.

Vosyliene, M.Z., 1999. The effect of heavy metals on haematological indices of fish (survey). Acta Zoologica Lituanica 9, 76-82.

Watanabe, W.O, Ellis, S., Chaves, J., 2001. Effects of dietary lipid and energy to protein ratio on growth and feed utilization of juvenile mutton snapper *Lutjanus analis* fed isonitrogenous diets at two temperatures. J World Aquac Soc 32, 30-40.

Zarejabad, A.M., Sudagar, M., Pournalimotlagh, S., Bastami, K.D., 2010. Effects of rearing temperature on hematological and biochemical parameters of great sturgeon (*Huso huso* Linnaeus, 1758) juvenile. Comp Clin Path 19, 367-371.

IV. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A escolha do dentão (*L. jocu*) como espécie a ser estudada nessa tese foi construída a partir de mais de uma década de contato com os pescadores artesanais da comunidade ribeirinha do estuário do rio Piraque-mirim (Aracruz – ES). Durante suas pescarias rotineiras, através da técnica de captura com redes denominadas “beira-mangue” (a rede é armada perpendicularmente a vegetação do mangue em regiões de canais, e que na baixamar as redes são recolhidas), e após algumas horas de baixamar, os pescadores observavam que diversas espécies, entre robalos e tainhas já estavam mortas, e apenas o dentão (*Lutjanus jocu*) estavam em grande parte ainda vivos. Esta percepção despertou o interesse na espécie pela sua rusticidade, requisito bastante visado para seleção de novas espécies para produção de um pacote tecnológico direcionado ao cultivo em escala comercial.

Aspectos importantes para a aquicultura como rusticidade, eurihalinidade e rápida resposta imunológica frente à infestação por parasitos durante o cultivo foram evidenciadas para *L. jocu* neste trabalho. Portanto, vislumbramos a partir das informações geradas, um amplo espaço para novas pesquisas, para que num futuro próximo possamos dispor de conhecimentos que englobem, principalmente: esforços na reprodução da espécie em laboratório, no qual já vêm sendo mantidas matrizes no Laboratório de Cultivo de Organismos Marinhos da Universidade Federal do Espírito Santo (LabCOM - UFES); a avaliação do desempenho com a aplicação de diferentes hormônios visando a maturação e reprodução dessas matrizes; e a realização de experimentos voltados para o crescimento do dentão em gaiolas e em escala comercial.

Do ponto de vista socioambiental, a tese cumpriu um papel importante, apresentando mais uma espécie promissora para o cultivo em diferentes escalas, pois devido sua rusticidade comprovada, desde a facilidade de transporte, a resistência e recuperação diante de infestações parasitárias, até sua atuação em ampla variação de salinidade (0-30), é possível que se abra uma perspectiva (mais estudos devem ser realizados) de que o dentão possa ser cultivado desde águas continentais, estuarinas e em grandes gaiolas offshore. O fácil manejo também

permite que, no futuro, com a dominação da reprodução em laboratório, comunidades ribeirinhas possam promover o cultivo com equipamentos e ferramentas de baixo custo, diferente do cultivo atualmente do bijupirá no Brasil, que demandam de estruturas mais robustas.