

1 **FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG**

2 **INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA – IO**

3 **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA – PPGAq**

4

5

6

7

8

9

10

11

12 **ESTRESSE EM JUVENIS DE GAROUPA *Epinephelus marginatus* (LOWE,**

13 **1834) TRANSPORTADOS EM DIFERENTES DENSIDADES DE ESTOCAGEM**

14

15

16

17 **PAOLA MILENA PEREIRA CARDONA**

18

19

20 **Rio Grande/RS.**

21 **Setembro/2013**

22



23 **FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG**

24 **INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA – IO**

25 **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA – PPGAq**

26

27

28

29

30 **ESTRESSE EM JUVENIS DE GAROUPA *Epinephelus marginatus* (LOWE,**
31 **1834) TRANSPORTADOS EM DIFERENTES DENSIDADES DE ESTOCAGEM**

32

33 **Aluna: Paola Milena Pereira Cardona**

34 **Orientador: Dr. Ricardo Berteaux Robaldo**

35 **Co-Orientador: Dr. Luís André Sampaio**

36

37

38

39

40

41

42

Rio Grande/RS

43

Setembro/2013

44

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Aquicultura no Programa de Pós Graduação em Aquicultura da Fundação Universidade Federal do Rio Grande

45 **ÍNDICE**

| | |
|--|-----|
| AGRADECIMENTOS..... | v |
| RESUMO GERAL..... | vi |
| ABSTRACT..... | vii |
| 1. INTRODUÇÃO GERAL..... | 1 |
| 1.1 Criação de garoupas..... | 1 |
| 1.2 <i>Epinephelus marginatus</i> | 2 |
| 1.3 Transporte de peixes vivos..... | 3 |
| 1.4 Estresse e resposta fisiológica em peixes..... | 4 |
| 1.5 Estresse e sistema imune de peixes..... | 5 |
| 1.6 Leucócitos em peixes..... | 6 |
| 1.7 Contagem diferencial de leucócitos..... | 7 |
| 2. OBJETIVOS..... | 9 |
| 2.1 Objetivo geral..... | 9 |
| 2.2 Objetivos específicos..... | 9 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 10 |
| MANUSCRITO..... | 17 |
| ABSTRACT..... | 19 |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 20 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS..... | 22 |
| 3. RESULTADOS..... | 25 |
| 4. DISCUSSÃO..... | 26 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 37 |
| CONCLUSÕES..... | 46 |

*A mi familia... por todo su apoyo, comprensión y amor durante
estos dos años...*

Gracias a ustedes este sueño hoy es una realidad.

Y a el más grande amor en mi vida...

*mi hija querida, pasar estos dos años lejos de ti fue mi mayor
sacrificio, más saber que puedo mejorar tu futuro me dio
fuerzas para soportar tu lejanía... porque nunca estuviste
ausente... siempre estás en mi corazón.*

49 **AGRADECIMENTOS:**

50

51 Quero agradecer ao programa de Pós-Graduação em Aquicultura por me abrir suas
52 portas.

53

54 A meu orientador o Prof. Dr. Ricardo Berteaux Robaldo por ter me aceitado como
55 orientada ainda sem me conhecer e ajudado em tudo quanto eu precisava, pelos
56 conhecimentos adquiridos que foram muitos.

57

58 A todos os professores do programa em especial aos professores Dr. Luís André
59 Sampaio e Dr. Marcelo Borges Tesser, pelo auxílio da bolsa no início do mestrado e
60 pelos conhecimentos adquiridos, em especial ao Prof. Dr. Luís Romano, Prof. Dr. José
61 Monserrat e o Prof. Dr. Wilson Wasielesky Jr, pela suas ajudas ao longo do meu
62 mestrado.

63

64 Ao CNPq e REUNI pelos auxílios financeiros durante meu mestrado. Ao secretario
65 Sergio Balzarini Pilenghi pela sua ajuda ao longo destes dois anos.

66 Aos colegas da Estação Marinha da Aquicultura, técnicos e funcionários.

67

68 Aos amigos do grupo de Piscicultura Estuarina e Marinha, em especial a Leonardo,
69 Okamoto, Janaina, Ricardo, Angélica, Martha, Faby, Bianca, Claudio, Danilo e André,
70 pela colaboração durante as coletas do meu experimento.

71

72 E muito especialmente a duas pessoas que fizeram da minha estada no Brasil um lar...
73 As minhas irmãs da alma Viviana e Clivea, muito obrigada mesmo.

74

75 A Adriana (Shakira) e Yorley, pela amizade e por ter compartilhado juntas esta
76 experiência de vida.

77

78 A minha família a o Hernando pela compreensão, ajuda e amor, e a nossa filha Celeste,
79 que mudou a minha vida e fez de mim outra pessoa, para ela eu fiz este mestrado.

80

81 RESUMO GERAL

82

83 A saúde e o bem-estar dos peixes são afetados negativamente durante o transporte, as
84 respostas ao estresse são espécie-específica, assim este estudo objetivou avaliar a
85 resposta ao estresse ao transporte de juvenis de garoupa *Epinephelus marginatus* em
86 diferentes densidades de estocagem, através de marcadores hematológicos. Para isso,
87 após 24h de jejum, juvenis de garoupas foram transportados em 27 sacos plásticos por
88 8h a 28, 45 e 64g/L. Na chegada, foram transferidos para 18 tanques (300L) de
89 recuperação onde foram mantidos por 24h. Amostras de água foram coletadas antes e
90 após o transporte e foi analisado oxigênio dissolvido, temperatura, pH, alcalinidade e
91 dióxido de carbono. Coletas de sangue (n=9) foram realizadas antes da embalagem
92 (pré-transporte), e em cada densidade de estocagem, na chegada (0h), 2 e 24h após o
93 transporte (3 peixes/repetição). O sangue foi analisada no analisador clínico i-Stat para
94 medida dos níveis de glicose, pressão parcial de O₂ (pO₂), pressão parcial de CO₂
95 (pCO₂), pH no sangue e bicarbonato (HCO₃⁻). O cortisol plasmático foi analisado pelo
96 método de electroquimioluminescência. Além disso, extensões sanguíneas foram
97 preparadas para contagem diferencial dos leucócitos e relação de neutrófilos a
98 linfócitos (N/L). Os níveis de pH e oxigênio dissolvido na água diminuíram
99 gradualmente, enquanto as concentrações de CO₂ aumentaram com o aumento das
100 densidades de estocagem. As pCO₂, pH, e HCO₃⁻ apresentaram aumentaram nos peixes
101 de todos os tratamentos, quando comparados com os valores pré-transporte. A glicemia
102 foi elevada apenas na maior densidade de transporte. O cortisol plasmático e a pO₂ não
103 foram influenciados pelo aumento na densidade de transporte. O transporte teve um
104 efeito marcante na proporção de leucócitos evidenciado nos peixes amostrados em
105 todos os tratamentos ao término do transporte, que mostrou mudanças tanto na
106 proporção de leucócitos (linfopenia e neutrofilia) como na relação N/L. A linfopenia
107 perdurou até 2h após o transporte, nas maiores densidades testadas. O perfil
108 leucocitário é uma técnica barata e rápida, que demonstrou ser sensível e eficaz para o
109 acompanhamento da resposta de estresse nesta espécie. Tanto o restabelecimento dos
110 parâmetros hematológicos, em 2h e sua estabilização em 24h de recuperação pós-
111 transporte, quanto o fato de não ter ocorrido mortalidade evidenciam a tolerância da
112 espécie á metodologia de transporte empregada. Portanto como a rentabilidade dos

113 sistemas de transporte de peixes vivos está fundamentada em altas densidades de
114 estocagem, sugere-se que a densidade de 64g/L seja a ideal para o transporte de juvenis
115 de garoupas em sistema fechado por até 8h.

116

117 **ABSTRACT**

118

119 Health and welfare of fish are negatively affected during transportation, stress
120 responses are species-specific, therefore this study aimed to evaluate the stress response
121 to transportation of juvenile dusky grouper *Epinephelus marginatus* at different
122 stocking densities. After 24h of fasting, juvenile dusky grouper were transported in 27
123 plastic bags for 8h at different stocking densities (28, 45 and 64kg m⁻³). On arrival, they
124 were transferred into 18 fiberglass tanks of 300l, where they were maintained for 24h,
125 with the aim of evaluating the response to stress by monitoring hematological
126 biomarkers. Water samples were collected before and after transport and was analyzed
127 dissolved oxygen, temperature, pH, alkalinity and carbon dioxide. Blood samples were
128 collected before packaging (before transport), upon arrival (0h), 2 and 24h after
129 transport. Fresh blood was analyzed in i-Stat meter to measure levels of glucose, O₂
130 partial pressure (*p*O₂), CO₂ partial pressure (*p*CO₂), blood pH and HCO₃⁻. Plasma
131 cortisol was analyzed by electrochemiluminescence method. In addition, blood smears
132 were prepared to study the leukocyte profile and neutrophils / lymphocyte ratio (N / L).
133 The levels of pH and dissolved oxygen in the water gradually decreased, while the
134 concentration of CO₂ increased with the increasing stocking densities. At the end
135 transport, blood *p*CO₂, pH and HCO₃⁻ showed substantial increases in fish from all
136 treatments compared to the pre-transport. The plasma glucose levels were elevated only
137 in fish subjected to the higher density of transport. On the other side, plasma cortisol
138 and *p*O₂ levels, were not influenced by the increase of transport densities. Transport
139 had a marked effect on the proportion of leukocytes evidenced in the fish sampled from
140 all treatments immediately after transport, which showed changes (lymphopenia and
141 neutrophilia), both on the proportion of leukocytes, such as in N / L ratio. Lymphopenia
142 was also observed at the higher stocking densities 2h after the transport, in comparison
143 with initial condition. Profile leukocyte is cheap and fast technique, evidenced be
144 sensitive and effective for monitoring the stress response in this species. The restoration

145 of all hematological parameters in 2h of recovery, stabilization in 24h after transport
146 and the fact that no mortality occurred, demonstrate the physiological tolerance of this
147 species to transport methodology employed. Therefore, as the profitability of the
148 transport systems of live fish is grounded at high stocking densities, and based on the
149 physiological indicators obtained in this study suggests that the optimal density for the
150 transport of grouper in a closed system for eight hours is approximately 64kg m^{-3} .

151 1. INTRODUÇÃO GERAL

152

153 1.1 Criação de garoupas

154 As garoupas, também conhecidas como meros, pertencem à família Serranídea e a
155 subfamília Epinephelinae. Possuem 159 espécies classificadas em 15 gêneros
156 (Heemstra & Randall, 1993) e se distribuem em águas marinhas tropicais, subtropicais e
157 temperadas, pelo Oceano Atlântico e Mar Mediterrâneo (Boglione et al., 2009).

158 Esta família possui elevada demanda de mercado (Zhou et al., 2004),
159 principalmente em Hong Kong, Singapura e Taiwan (Pierre et al., 2008), entretanto sua
160 oferta é ineficiente para suprir a demanda, o que eleva seu preço (Ottolenghi et al.,
161 2004).

162 Os preços relatados por Williams et al. (2005) na Ásia, vão desde 8 até 11 US\$/kg
163 para *Epinephelus coioides* (garoupa alaranjada), 15-20 US\$/kg para *Epinephelus*
164 *fuscoguttatus* (garoupa manchada), 30-40 US\$/kg para *Plectropomus spp* (garoupa
165 vermiculada) e *Epinephelus akaara* (garoupa vermelha) e 80-95 US\$/kg para
166 *Cromileptes altivelis* (garoupa corcunda).

167 Sua elevada demanda tem motivado a expansão da aquicultura de garoupas no
168 mundo, pois além do ponto de vista aquícola, também são importantes para a pesca
169 esportiva e o turismo subaquático, pelos quais em diversas áreas são sobre pescadas
170 (Whaylen et al., 2004), fato que reforça a introdução das garoupas na piscicultura
171 marinha.

172 Dentre as qualidades que fazem destes peixes ótimos candidatos à aquicultura
173 comercial destacam-se sua adaptabilidade aos sistemas intensivos de criação,
174 principalmente em tanques redes (Sim et al., 2005), rápido crescimento e boas taxas de
175 conversão alimentar (Zhou et al., 2004).

176 Sua criação tem sido desenvolvida principalmente na Ásia e tem como os
177 principais países produtores a Indonésia, Malásia, Filipinas, Taiwan, Tailândia, Hong
178 Kong, China, Vietnam, Índia, Arábia Saudita, Coréia do Sul e Austrália. (Pierre et al.,
179 2008).

180 Nos ambientes costeiros do litoral brasileiro há ocorrência de diversas espécies de
181 serranídeos, inclusive as que atingem maior tamanho como o mero (*Epinephelus*
182 *itajara*), o badejo-quadrado (*Mycteroperca bonaci*) o badejo-de-areia (*Mycteroperca*
183 *microlepis*) e a garoupa verdadeira (*Epinephelus marginatus*), que podem ultrapassar
184 um metro de comprimento e mais de 40kg de peso (Smith, 1971).

185 1.2. *Epinephelus marginatus*

186 *E. marginatus* conhecida como garoupa verdadeira ou dusky grouper (Lowe 1834)
187 é um peixe marinho altamente valorizado é importante tanto para a pesca comercial
188 como para a pesca desportiva. Globalmente são distribuídas no leste e sudeste do
189 Oceano Atlântico, no mar mediterrâneo e no ocidente do Oceano Índico (Heemstra &
190 Randall, 1993), onde é considerada como candidata potencial para aquicultura
191 comercial (Glamuzina et al., 2001; Marino & Mandich. 2001; Machado et al., 2003).



192

193 Figura 1. Exemplo de garoupa verdadeira *Epinephelus marginatus*

194 *E. marginatus* habita zonas costeiras, geralmente sobre fundos rochosos de águas
195 pouco profundas (50m), apresenta hermafroditismo protogínico, com agregações
196 reprodutivas e estrutura social complexa (Zabala et al., 1997; Andrade et al., 2003). A
197 maturação sexual das fêmeas é alcançada aos 45cm e 2kg, enquanto que nos machos, a
198 inversão sexual a partir das fêmeas, acontece entre os 9 e 10 anos, quando apresentam
199 90cm e entre 3 e 9kg (Brusle, 1985; Marino & Mandich, 2001).

200 Devido ao decréscimo substancial das capturas totais da pesca e da população
201 natural, esta espécie tem sido classificada na Lista Vermelha da IUCN como em perigo
202 de extinção (Cornish & Harmelin-Vivien, 2004).

203 Uma alternativa para a redução do extrativismo da espécie é sua criação em
204 cativeiro, com a formação de planteis de reprodutores, que deve preceder a criação de
205 juvenis até sua maturação sexual, ou coleta reduzida de reprodutores silvestres seguida,
206 se necessário, de técnicas hormonais para inversão sexual e criopreservação de sêmen
207 (Marino & Mandich, 2001). Estudos nestes temas foram iniciados em 1995, por
208 pesquisadores na Itália, Croácia, Espanha e Grécia (Marino & Mandich, 2001) com
209 objetivo da preservação da espécie no Mar Mediterrâneo.

210 Atualmente no Brasil, estão sendo produzidos juvenis de garoupas *E. marginatus*
211 em laboratório privado como da empresa Redemar Alevinos, Ilha Bela, SP. No entanto,
212 a criação desta espécie no Brasil ainda está sendo realizada apenas em nível
213 experimental, por Instituições Públicas como o Instituto de Pesca (APTA, SAA), a
214 Universidade do Vale de Itajaí (UNIVALI - Itajaí, SC) e a Universidade Federal do Rio
215 Grande (FURG - Rio Grande, RS), entre outras. Os resultados tem sido promissores
216 tanto em relação ao crescimento (Ramos et al., 2012), como no manejo em sistemas
217 intensivos (tanques rede) (Sanches et al., 2007). A espécie apresenta boa aceitação e
218 preço (20 R\$/Kg) no mercado especialmente no Rio de Janeiro e São Paulo (Sanches et
219 al., 2007).

220 1.3. *Transporte de peixes*

221 O aumento significativo do transporte de peixes vivos e das técnicas de transporte
222 tem sido proporcional ao crescimento da indústria aquícola (Stieglitz et al., 2012). No
223 transporte é de fundamental importância o uso de altas densidades para a redução dos
224 custos (Carneiro & Urbinati, 2002; Carneiro et al., 2009; Tang, 2009).

225 Os peixes podem ser transportados em sistemas abertos ou fechados (Amend et
226 al., 1982; Berka, 1986). Nos sistemas abertos é comum à utilização de barcos ou
227 caminhões onde são utilizados recipientes abertos, que podem estar conectados, ou não,
228 a sistemas de recirculação, oxigenação e/ou degaseificação da água. Nos sistemas
229 fechados, aqueles mais comumente empregados, os peixes são transportados em
230 tanques ou sacos plásticos hermeticamente fechados. O suprimento de oxigênio é
231 garantido pelo preenchimento de aproximadamente 2/3 do volume da embalagem com
232 oxigênio puro, antes do transporte (Ashley, 2006).

233 Apesar de o sistema fechado ser o mais utilizado, este apresenta problemas como
234 redução dos níveis de oxigênio e a impossibilidade de troca de água do sistema,
235 acarretando assim na deterioração da qualidade da água devido ao acúmulo de amônia,
236 dióxido de carbono e sólidos suspensos (Treasurer et al., 2012).

237 Desta forma, ao mesmo tempo em que é uma das etapas de maior importância na
238 produção de peixes o transporte também é uma atividade que atua como um potente
239 estressor devido o excessivo manejo dos peixes (Urbinati et al., 2004; Chandroo et al.,
240 2005). Assim, quando mal planejado e ou executado, o transporte pode provocar
241 elevadas taxas de mortalidade e grandes prejuízos ao produtor.

242 A suscetibilidade à manipulação e as respostas fisiológicas dos peixes são espécie-
243 específica, o que dificulta a padronização de um protocolo universal para o transporte
244 de peixes vivos. Portanto, para maximizar o bem-estar e a sobrevivência, é necessário o
245 desenho de protocolos, antes e pós-transporte, para cada espécie alvo (Ashley, 2006;
246 Chandroo et al., 2005; Gomes et al., 2006). Dentre as especificações para o
247 estabelecimento deste protocolo, está a determinação da densidade de estocagem
248 adequada ao transporte.

249 Na determinação de protocolos experimentais, são utilizados indicadores
250 biológicos para monitorar as repostas fisiológicas de estresse antes e após o transporte,
251 sendo a concentração plasmática do cortisol a variável mais frequentemente empregada.
252 Não obstante a concentração de glicose também é uma ferramenta útil no
253 monitoramento do estado fisiológico e como indicadora de estresse durante os
254 procedimentos do transporte de peixes (Chandroo et al., 2005; Inversen et al., 2009;
255 Oyoo-Okoth et al., 2011; Treasurer et al., 2012).

256 1.4. *Estresse em peixes e suas respostas fisiológicas*

257 De acordo com o conceito proposto por Selye (1936, 1973), o estresse é
258 simplesmente a resposta não específica do organismo a qualquer exigência feita sobre
259 ele, chamado Síndrome de Adaptação Geral (GAS). Na aquicultura, o estresse
260 desempenha um papel fundamental nos processos homeostáticos dos peixes, pois as
261 diversas práticas rotineiras implicadas nela, como o confinamento, a manipulação e o
262 transporte. Esses fatores influenciam diretamente o estado fisiológico dos peixes, desta

263 forma, a elucidação dos mecanismos de resposta ao estresse é fundamental para o
264 desenvolvimento da aquicultura, já que a significativa demanda energética para sua
265 ativação pode prejudicar os esforços dirigidos a melhora da produtividade e/ou
266 desencadear perdas por mortalidade. Além disso, sabe-se que o estresse é um fator que
267 contribui à susceptibilidade de doenças infecciosas na indústria aquícola devido a sua
268 ação imunossupressora (Barton & Iwama, 1991; Pickering, 1993; Wendelaar Bonga,
269 1997).

270 As respostas ao estresse dependem do tipo, duração e severidade do estímulo e
271 podem dividir-se em: primária, secundária e terciária (Mazeaud et al., 1977;
272 Wedemeyer et al., 1990).

273 A resposta primária é bifásica e geralmente caracterizada por um inicial, curto e
274 significativo incremento da concentração de catecolaminas (adrenalina e noradrenalina),
275 seguido por um prolongado aumento de hormônios corticosteróides (cortisol) no
276 plasma. O aumento do cortisol é resultado da secreção hipotalâmica do fator liberador
277 de corticotropina (CRF), o qual estimula à glândula pituitária a liberar o hormônio
278 adrenocorticotrópico (ACTH) que, ao circular pela corrente sanguínea, estimula o
279 tecido interrenal a produzir e liberar cortisol (Barton & Iwama, 1991; Barton, 2002;
280 Pankhurst, 2011).

281 A resposta secundária é a consequência direta da reação dos elevados níveis
282 plasmáticos de catecolaminas e cortisol sobre os tecidos, estimulando o sistema
283 cardiovascular e respiratório, bem como a hidrólise das reservas teciduais de glicogênio
284 e lipídios, promovendo o aumento dos níveis de glicose no sangue (Wendelaar Bonga,
285 1997). Enquanto que a magnitude das respostas terciárias está diretamente relacionada à
286 intensidade e duração do agente estressor, podendo prejudicar o crescimento e a
287 reprodução (Barton & Iwama, 1991; Barton et al., 2002).

288 1.5. *Estresse e sistema imune dos peixes*

289 O padrão de resposta do sistema imune dos peixes frente a fatores estressantes
290 pode ser de supressão ou de ativação, por conseguinte a resolução a um evento
291 estressante dependerá da evolução no tempo, da resposta induzida e da intensidade e
292 duração do fator de estresse (Tort, 2011). Quando o fator de estresse é agudo e de curta

293 duração, o padrão de resposta é estimulante e a resposta imune dos peixes mostra uma
294 fase de ativação potencializando as respostas inatas. Se o estresse é crônico, a resposta
295 imune mostra efeitos supressores e por tanto a possibilidade de doenças podem ser
296 aumentadas, principalmente as infecciosas.

297 Nos vertebrados inferiores, especialmente nos peixes, é evidente a conexão entre o
298 sistema neuroendócrino e o sistema imune. Em primeiro lugar pelas citocinas e
299 neuropeptídios, que desempenham papéis em ambos os sistemas e, além disso, alguns
300 dos mensageiros imunes e endócrinos pertencem à mesma família de moléculas. Em
301 segundo lugar o rim cefálico que exerce um papel central na resposta ao estresse,
302 implicando em uma estreita comunicação entre estes sistemas de regulação. Estudos
303 anteriores têm demonstrado que as respostas ao estresse podem suprimir ou estimular
304 vias da resposta imune (Dhabhar et al., 1995;. Dhabhar, 2002).

305 Por tanto, vários autores concluem que o estresse induz mudanças no número e na
306 distribuição de leucócitos no sangue (Fauci & Dale, 1974; Fauci, 1975; Dhabhar et al.,
307 1996; Wojtaszek et al., 2002). Davis (2008) revisou a relação entre a condição de
308 estresse e o padrão do perfil leucocitário apontando este último como um confiável
309 biomarcador de estresse nos vertebrados em geral.

310 1.6. *Leucócitos em peixes*

311 As células sanguíneas são classificadas em três tipos principais: os eritrócitos
312 (células vermelhas), os leucócitos (células brancas) e os trombócitos ou plaquetas. Os
313 leucócitos integram diferentes linhagens celulares nas quais são diferenciados
314 morfológicamente pela presença ou ausência de granulações, sendo então, classificados
315 em granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos), e agranulócitos (linfócitos e
316 monócitos) (Brown, 1982).

317 Segundo Clauss et al. (2008), os mais comuns granulócitos em teleósteos são os
318 neutrófilos, que possuem morfologia tipicamente arredondada com núcleo em forma de
319 bastonete, segmentado ou não, e suas granulações, quando visíveis, são acidófilas com
320 citoplasma variando de cinza a ligeiramente azul. Os eosinófilos têm tamanhos
321 diversos, variando de acordo com a quantidade e o tamanho de grânulos no citoplasma,
322 o núcleo é arredondado e excêntrico, e o citoplasma é abundante e rico em grânulos

323 grosseiros dispostos por todo citoplasma que se coram de rosa-alaranjado (grânulos
324 eosinofílicos). Os basófilos são células com forma arredondada e contorno regular, o
325 citoplasma apresenta granulações grosseiras basofílicas, que recobrem o núcleo na
326 maioria das vezes.

327 Dentre os agranulócitos, os linfócitos são células de tamanhos variados,
328 predominantemente pequenos e arredondados, com núcleo densamente basófilo e o
329 citoplasma proporcionalmente reduzido em comparação ao núcleo grande e
330 arredondado. Os monócitos são células grandes com formato esférico, porém também
331 pode ser ocasionalmente irregulares ou polimórficos, o núcleo é grande e em geral
332 excêntrico, o citoplasma é intensamente basófilo e podem apresentar prolongamentos
333 citoplasmáticos com vacuolização.

334 1.7. *Contagem diferencial de leucócitos*

335 A contagem diferencial de leucócitos permite inferir o estado imune dos peixes
336 devido os leucócitos serem a primeira linha de defesa imune nos vertebrados (Tavares–
337 Dias & Moraes, 2004). A técnica é realizada utilizando-se extensões de sangue
338 periférico, que são coradas para diferenciação dos tipos de leucócitos circulantes. A
339 contagem dos tipos é realizada em triplicata, considerando-se no mínimo 100 leucócitos
340 para cada amostra, percorrendo-se campos contínuos (Alleman et al., 1992).

341 A técnica da contagem diferencial de leucócitos tem sido empregada em peixes
342 teleósteos e elasmobrânquios, como biomarcador de estresse, após exposição a vários
343 estressores agudos como excessiva manipulação (Pulsford et al., 1994, Van Rijn &
344 Reina, 2010), exposição a metais e contaminantes (Mishra & Srivastava, 1979; Dick &
345 Dixon, 1985; Murad & Houston, 1988; Dethloff et al., 1999; Witeska, 2005), choques
346 térmicos (Engelsma et al., 2003; Pettersen et al., 2005) e alterações no fotoperíodo e na
347 temperatura (Valenzuela et al., 2008). Além disso, têm sido demonstrados efeitos do
348 estresse *in vitro*, após tratamentos com ACTH, cortisol e hidrocortisona (McLeay,
349 1973; Ellsaesser & Clem, 1986; Wojtaszek et al., 2002).

350 As mudanças claramente evidenciadas no perfil leucocitário, pelo efeito do estresse
351 são a linfopenia (diminuição dos linfócitos) e neutrofilia (aumento dos neutrófilos). A
352 proliferação na circulação dos neutrófilos acontece devido a que estas células possuem

353 atividade fagocítica e são de mais importância no mecanismo celular não-específico.
354 Enquanto, os linfócitos possuem pouca capacidade fagocítica, e realizam outras funções
355 tardias da resposta imunológica, tais como a produção de imunoglobulinas e modulação
356 da defesa imunológica (Praslow & Bainton, 2004).

357

358 2. OBJETIVOS

359

360 2.1 *Objetivo geral:*

- 361 • Avaliar o efeito de diferentes densidades de estocagem durante o transporte de
362 juvenis de garoupa *Epinephelus marginatus*, em sistema fechado, através do
363 acompanhamento de biomarcadores hematológicos da resposta de estresse.

364 2.2. *Objetivos específicos:*

- 365 • Determinar a densidade de estocagem adequada para o transporte de juvenis de
366 garoupas e seu efeito sobre os parâmetros da qualidade da água;
- 367 • Avaliar os níveis plasmáticos do cortisol e glicose em condições de pré e pós-
368 transporte, como resposta de estresse nas diferentes densidades de estocagem;
- 369 • Determinar as respostas dos peixes à hipercarbúria promovida pelo transporte em
370 diferentes densidades de estocagem, mediante acompanhamento da pressão parcial
371 de CO₂ e O₂, assim como da concentração de HCO₃⁻ e de H⁺ (pH) no sangue;
- 372 • Validar a técnica da contagem diferencial de leucócitos como indicador de estresse
373 fisiológico em garoupa, através da contagem diferencial de leucócitos e da relação
374 numérica entre neutrófilos e linfócitos (N/L);

375

376

377 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

378

379 Amend, D.F., Croy, T.R., Goven, B.A., Johnson, K.A., McCarthy, D.H., 1982.

380 Transportation of fish in closed systems: methods to control ammonia, carbon
381 dioxide, pH, and bacterial growth. Transactions of the American Fisheries
382 Society 111, 603-611.

383 Andrade, A.B., Machado, L.F., Hostim-Silva, M., Barreiros, J.P., 2003. Reproductive

384 biology of the dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834). Brazilian
385 Archives of Biology and Technology 46, 373-381.

386 Alleman, A.R., Jacobson, E.R., Raskin, R.E., 1992. Morphologic and cytochemical

387 characteristics of blood cells from the desert tortoise (*Gopherus agassizii*).
388 American Journal of Veterinary Research 3, 1645-1651.

389 Ashley, P.J., 2006. Fish welfare: current issues in aquaculture. Applied Animal

390 Behaviour Science 104, 199-235.

391 Barton, B.A., Iwama, G.K., 1991. Physiological changes in fish from stress in

392 aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids.
393 Annual Review of Fish Diseases 1, 3-26.

394 Barton, B.A., 2002. Stress in Fishes: a diversity of responses with particular reference

395 to changes in circulating corticosteroids. Integrative and Comparative Biology
396 42, 517-525.

397 Berka, R., 1986. The Transport of Live Fish: A Review. EIFAC Technical Paper 48.

398 Bly, J.E., Miller, N.W., Clem, L.W., 1990. A monoclonal antibody specific for

399 neutrophils in normal and stressed catfish. Developmental and Comparative
400 Immunology 14, 211-221.

401 Boglione, C., Marino, G., Giganti, M., Longobardi, A., De Marzi, P., Cataudella, S.,

402 2009. Skeletal anomalies in dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe
403 1834) juveniles reared with different methodologies and larval densities.
404 Aquaculture 291, 48-60.

- 405 Brown, E.M., 1982. Sangue e medula óssea. In: Dellmann, H.D., Brown, E.M., (Eds.)
406 Histologia veterinária. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.66-87.
- 407 Bruslé, J., 1985. Esposé synoptique des données biologiques sur les mérours
408 *Epinephelus aeneus* (Geoffroy Saint Hilaire, 1809) et *Epinephelus guaza*
409 (Linnaeus, 1758) de Océan Atlantique et de la Méditerranée. FAO Synop. Pêches
410 129, 64.
- 411 Carneiro, P.C.F., Urbinati, E.C., 2002. Transport stress in matrinxã, *Brycon cephalus*
412 (Teleostei: Characidae), at different densities. Aquaculture International 10,
413 221-229.
- 414 Carneiro, P.C.F., Kaiseler, P.H.S., Swarofsky, E.A.C., Baldisserotto, B., 2009.
415 Transport of jundiá *Rhamdia quelen* juveniles at different loading densities:
416 water quality and blood parameters. Neotropical Ichthyology 7, 283-288.
- 417 Chandroo, K.P., Cooke, S.J., MCKinley, R.S., Moccia, R.D., 2005. Use of
418 electromyogram telemetry to assess the behavioural and energetic responses of
419 rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) to transportation stress.
420 Aquaculture Research 36, 1226-1238.
- 421 Cornish, A., Harmelin-Vivien, M., 2004. *Epinephelus marginatus*. IUCN 2008. IUCN
422 Red List of Threatened Species. www.iucnredlist.org
- 423 Davis, A.K., Maney, D.L., Maerz, J.C., 2008. The use of leukocyte profiles to measure
424 stress in vertebrates: a review for ecologists. Functional Ecology 22, 760-772.
- 425 Dethloff, G.M., Schlenk, D., Hamm, J.T., Bailey, H.C., 1999. Alterations in
426 physiological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with exposure
427 to copper and copper/zinc mixtures. Ecotoxicology and Environmental Safety
428 42, 253-264.
- 429 Dhabhar, F.S., Miller, A.H., McEwen, B.S., Spencer, R.L., 1995. Effects of stress on
430 immune cell distribution—dynamics and hormonal mechanisms. Journal of
431 Immunology 154, 5511-5527.

- 432 Dhabhar, F.S., Miller, A.H., McEwen, B.S., Spencer, R.L., 1996. Stress induced
433 changes in blood leukocyte distribution—role of adrenal steroid hormones.
434 Journal of Immunology 157, 1638-1644.
- 435 Dhabhar, F.S., 2002. A hassle a day may keep the doctor away: stress and the
436 augmentation of immune function. Integrative and Comparative Biology 42,
437 556-564.
- 438 Dick, P.T., Dixon, D.G., 1985. Changes in circulating blood cell levels of rainbow trout,
439 *Salmo gairdneri* Richardson, following acute and chronic exposure to copper.
440 Journal of Fish Biology 26, 475-481.
- 441 Ellsaesser, C.F., Cle, L.W., 1986. Hematological and immunological changes in
442 channel catfish stressed by handling and transport. Journal of Fish Biology 28,
443 511-521.
- 444 Engelsma, M.Y., Houge, S., Nap, D., Hofenkm, M., Rombout, H.W.M., van
445 Muiwinkel, WB., Verburg-van Kemenade, B.M., 2003. Multiple acute
446 temperature stress affects leukocyte populations and antibody responses in
447 common carp, *Cyprinus carpio* L. Fish and Shellfish Immunology 15, 397-410.
- 448 Fauci, A.S., Dale, D.C., 1974. Effect of in-vivo hydrocortisone on subpopulations of
449 human lymphocytes. Journal of Clinical Investigation 53, 240-246.
- 450 Fauci, A.S., 1975. Mechanisms of corticosteroid action on lymphocyte subpopulations
451 1. Redistribution of circulating T-lymphocytes and B lymphocytes to bone
452 marrow. Immunology 28, 669-680.
- 453 Glamuzina, B.N., Glavić, B., Skaramuc, V., Kožul, P., Tutman., 2001. Early
454 development of the hybrid *Epinephelus costae* ♀ x *E. marginatus* ♂.
455 Aquaculture 198, 55-61.
- 456 Gomes, L.C., Chagas, E.C., Brinn, R.P., Roubach, R., Coppati, C.E., Baldisserotto. B.,
457 2006. Use of salt during transportation of air breathing pirarucu juveniles
458 (*Arapaima gigas*) in plastic bags. Aquaculture 256, 521-528.

- 459 Heemstra, P.C., Randall, J.E., 1993. Groupers of the world (Family Serranidae,
460 Subfamily Epinephelinae). An annotated and illustrated catalogue of the grouper,
461 rockcod, hind, coral grouper and lyretail species known to date. In: FAO Species
462 Catalogue (ed.): FAO Fisheries Synopsis, Rome, p.125.
- 463 Iversen, M., Eliassen, R.A., Finstad, B., 2009. Potential benefit of clove oil sedation on
464 animal welfare during salmon smolt, *Salmo salar* L. transport and transfer to
465 sea. Aquaculture Research 40, 233-241.
- 466 Marino, G., Mandich, A., 2001. State of the art and cultivation perspectives for the
467 dusky grouper. In: Workshop on New Species for Aquaculture, organized by
468 Centre of Marine Sciences (CCMAR) of the University of Algarve, 20-21
469 November 2000, Faro, Portugal; 49-52.
- 470 Machado, L.F., Andrade A.B., Hostim-Silva, M., Barreiros, J.P., 2003. Habitat use by
471 the juvenile dusky grouper *Epinephelus marginatus* and its relative abundance,
472 in Santa Catarina, Brazil. Aqua, Journal of Ichthyology and Aquatic Biology 6,
473 133-138.
- 474 Marino, G.E., Azzuro, A., Massari, M.G., Finioia Mandich, A., 2001. Reproduction in
475 the dusky grouper from the southern Mediterranean. Journal of Fish Biology 58,
476 909-927.
- 477 Mazeaud, M.M., Mazeaud, F., Donaldson, E.M., 1977. Primary and secondary effects
478 of stress in fish: Some new data with a general review. Transactions of the
479 American Fisheries Society 106, 201-212.
- 480 McLeay, D.J., 1973. Effects of ACTH on pituitary interrenal axis and abundance of
481 white blood cell types in juvenile coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. General
482 and Comparative Endocrinology 21, 431-440.
- 483 Mishra, S., Srivastava, A.K., 1979. Hematology as index of sublethal toxicity of zinc in
484 a freshwater teleost. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology
485 22, 695-698.

- 486 Murad, A., Houston, A.H., 1988. Leukocytes and leukopoietic capacity in goldfish,
487 *Carassius auratus*, exposed to sublethal levels of cadmium. *Aquatic Toxicology*
488 13, 141-154.
- 489 Ottolenghi, F.C., Silvestri, P., Giordano, A., Lovatelli, New, M.B., 2004. The fattening
490 of eels, groupers, tunas and yellowtails. In: *Captured-based Aquaculture* FAO,
491 Rome, 308.
- 492 Oyoo-Okoth, E., Cherop, L., Ngugi, C.C., Chepkirui-Boit, V., Manguya-Lusega, D.,
493 Ani-Sabwa, J., Charo-Karisa, H., 2011. Survival and physiological response of
494 *Labeo victorianus* (Pisces: Cyprinidae, Boulenger 1901) juveniles to transport
495 stress under a salinity gradient. *Aquaculture* 319, 226-231.
- 496 Pankhurst, N.W., 2011. The endocrinology of stress in fish: An environmental
497 perspective. *General and Comparative Endocrinology* 170, 265-275.
- 498 Parslow, T.G., Bainton, D.F., 2004. Imunidade inata. In: Parslow, T.G., Stites, D.P.,
499 Terr, A.I., Imboden, J.B., (Eds.) *Imunologia médica*. Rio de Janeiro: Guanabara
500 Koogan, p. 16-33.
- 501 Pettersen, E.F., Bjorlow, I., Hagland, T.J., Wergeland, H.I., 2005. Effect of seawater
502 temperature on leucocyte populations in Atlantic salmon post-smolts. *Vet*
503 *Immunol Immunopathol* 106, 65-76.
- 504 Pickering, A.D., 1993. Growth and stress in fish production. *Aquaculture* 111, 51-63.
- 505 Pierre, S., Gaillard, S., Prevot-D'Alvise, N., Aubert, J., Rostaing-Capaillon, O., Leung-
506 Tack, D., Grillasca, J., 2008. Grouper aquaculture: Asian success and
507 Mediterranean trials. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*
508 18, 297-308.
- 509 Pulsford, A.L., Lemairegony, S., Tomlinson, M., Collingwood, N., Glynn, P.J., 1994.
510 Effects of acute stress on the immune system of the Dab, *Limanda limanda*.
511 *Comparative Biochemistry and Physiology C – Pharmacology Toxicology and*
512 *Endocrinology* 109, 129-139.

- 513 Ramos, F.M., Sanches E.G., Fujimoto, R.Y., Cottens, K.F., Cerqueira, V.R., 2012.
514 Crescimento de juvenis da garoupa-verdadeira *Epinephelus marginatus*
515 submetidos a diferentes dietas. Boletim do Instituto de Pesca 38, 81-88.
- 516 Sanches, E.G., De Azevedo, V.G., Da Costa, M.R., 2007. Criação da garoupa-
517 verdadeira *Epinephelus marginatus* (lowe, 1834) (teleostei, serranidae)
518 alimentada com rejeito de pesca e ração úmida em tanques-rede. Atlântica 29,
519 121-126.
- 520 Selye, H., 1973. The evolution of the stress concept. American scientist. 61, 692-699.
- 521 Selye, H., 1936. A syndrome produced by diverse nocuous agents. Nature 138, 32.
- 522 Sim, S.Y., Rimmer, A., Williams, K., Toledo, J.D., Sugama, K., Rumengan, I., Phillips,
523 M.J., 2005. A practical guide to feeds and feed management for cultured
524 groupers. NACA, ACIAR, Publication No. 2005-02 of the Asia-Pacific Marine
525 Finfish Aquaculture Network.
- 526 Smith, C.L., 1971. A revision of the American groupers: *Epinephelus* and allied genera.
527 Bulletin of the American Museum of Natural History 146, 1-241.
- 528 Stieglitz, J.D., Benetti, D.D., Serafy, E.J., 2012. Optimizing transport of live juvenile
529 cobia (*Rachycentron canadum*): Effects of salinity and shipping biomass.
530 Aquaculture 364, 293-297.
- 531 Sumpter, J.P., 1997. The endocrinology of stress. In: Iwama, G.K., Pickering, A.D.,
532 Sumpter, J.P., Schreck, C.B. (Eds.), Fish Stress and Health in Aquaculture.
533 Society for Experimental Biology Seminar Series 62. Cambridge University
534 Press, pp. 95-118.
- 535 Tang, S.H., Thorarensen, C.J., Brauner, C.M., Wood, Farrell, A., 2009. Modeling the
536 accumulation of CO₂ during high density, re-circulating transport of adult
537 Atlantic salmon, *Salmo salar*, from observations aboard a sea-going commercial
538 live-haul vessel. Aquaculture 296, 102-109.
- 539 Tavares-Dias, M., Moraes, F.R., 2004. Hematologia de peixes teleósteos. Villimpress,
540 Ribeirão Preto. 144p.

- 541 Tort, L., 2011 Stress and immune modulation in fish. *Developmental and Comparative*
542 *Immunology* 35, 1366-1375.
- 543 Treasurer, J.W., 2012. Changes in pH during transport of juvenile cod *Gadus morhua* L.
544 and stabilization using buffering agents. *Aquaculture* 330, 92-99.
- 545 Urbinati, E.C., Abreu, J.S., Camargo, A.C.S., Parra, M., 2004. Loading and transport
546 stress of juvenile matrinxã (*Brycon cephalus*, Characidae) at various densities.
547 *Aquaculture* 229, 389-400.
- 548 Valenzuela, A.E., Silva, V.M., Klempau, A.E., 2008. Effects of different artificial
549 photoperiods and temperatures on haematological parameters of rainbow trout
550 (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiology and Biochemistry* 34, 159-167.
- 551 Van Rijn, J.A., Reina, R. D., 2010. Distribution of leukocytes as indicators of stress in
552 the Australian swellshark, *Cephaloscyllium laticeps*. *Fish and Shellfish*
553 *Immunology* 29, 534-538.
- 554 Whaylen, L., Pattengill-Semmens, C.V., Semmens, B.X., Bush, P.G., Boardman, M.R.,
555 2004. Observations of a Nassau grouper, *Epinephelus striatus*, spawning
556 aggregation site in Little Cayman, Cayman Islands, including multi-species
557 spawning information. *Environmental Biology of Fishes* 70, 305-313.
- 558 Wedemeyer, G.A., Barton, B.A., Mcleay, D.J., 1990. Stress and acclimation. In:
559 Schreck, C.B., Moyle, P.B., (Eds.) *Methods for Fish Biology*. American
560 Fisheries Society. Bethesda, MD, pp. 451-489.
- 561 Wendelaar Bonga, S.E., 1997. The stress response in fish. *Physiological Reviews* 77,
562 591-625.
- 563 Williams, K.C., Smith, D.M., Williams, I.H., Irvin, S.J., Mbarcla, Y., 2005. ACIAR
564 grouper grow-out feeds program and related CSIRO research. *Aquaculture Asia*
565 *Magazine* 29-33.
- 566 Witeska, M., 2005. Stress in fish: hematological and immunological effects of heavy
567 metals. *Electronic Journal of Ichthyology* 1, 35-41.

- 568 Wojtaszek, J., Dziewulska-Szwajkowska, D., Lozinska-Gabska, M., Adamowicz, A.,
569 Dzugaj, A., 2002. Hematological effects of high dose of cortisol on the carp
570 (*Cyprinus carpio* L.) cortisol effect on the carp blood. General and Comparative
571 Endocrinology 125, 176-183.
- 572 Zabala, M., Louisy, P., Garcia-Rubies, A., Gracia, V., 1997. Social behavioral context
573 of reproduction in the Mediterranean dusky grouper *Epinephelus marginatus*
574 (Lowe, 1834) (Pisces, Serranidae) in the Medes Islands Marine Reserve (NW
575 Mediterranean, Spain). Scientia Marina 6, 79-89.
- 576 Zhou, Q.C., Liu, Y.J., Mai, K.S., Tian, L.X., 2004. Effect of dietary phosphorus levels
577 on growth, body composition, muscle and bone mineral concentration for
578 orange spotted grouper, *Epinephelus coioides*, reared in floating cages. Journal
579 of the World Aquaculture Society 35, 427-435.
- 580

581 **FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG**
582 **INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA – IO**
583 **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA – PPGAq**

584

585

586

587

588

589

590

591 **Resposta ao estresse em juvenis da garoupa verdadeira, *Epinephelus marginatus***
592 **(Lowe, 1834), transportadas em diferentes densidades de estocagem**

593

594

595

596

Paola Milena Pereira Cardona

597

598

599

600

601

602

603

604

605

606

Manuscrito formatado de acordo nas normas da revista *Aquaculture*

607

608 **RESUMO**

609

610 O estresse associado ao transporte de peixes vivos pode promover efeitos negativos na
611 saúde dos peixes, provocando elevadas taxas de mortalidades pós-transporte. Juvenis de
612 garoupa, *Epinephelus marginatus*, foram transportadas em 27 sacos plásticos por 8h sob
613 densidades de estocagem de 28, 45 e 65 g/L. Na chegada, estes foram transferidos para
614 18 tanques de fibra de vidro de 300 L, onde foram mantidos por 24h com o objetivo de
615 avaliar a resposta de estresse, através do acompanhamento de biomarcadores
616 hematológicos. Amostras da água foram coletas antes e após o transporte para analisar
617 oxigênio, temperatura, pH, alcalinidade e dióxido de carbono. Foram coletadas
618 amostras de sangue, antes da embalagem (pré-transporte), no momento da chegada (0h),
619 2 e 24h após o transporte. O sangue fresco foi analisada no analisador clinico i-Stat para
620 medir os níveis de glicose, pressão parcial de O₂ (*p*O₂), pressão parcial de CO₂
621 (*p*CO₂), pH e bicarbonato do sangue (HCO₃⁻). O cortisol plasmático foi analisado por
622 eletroquimiuniscencia. Além disso, de cada amostra de sangue, extensões sanguíneas
623 foram preparadas em triplicata, com a finalidade de verificar mudanças nos padrões
624 leucocitários e na relação neutrófilo/linfócito (N/L). Os níveis de pH e oxigênio
625 dissolvido na água diminuiram gradualmente com o aumento da densidade de
626 estocagem, enquanto que as concentrações de CO₂ aumentaram com o incremento nas
627 densidades de estocagem. Ao final do transporte as concentrações plasmáticas da *p*CO₂,
628 pH e HCO₃⁻ apresentaram aumentos substanciais nos peixes de todos os tratamentos
629 quando comparados com os valores pré-transporte. Os níveis plasmáticos de glicose
630 foram elevados apenas nos peixes submetidos à maior densidade de transporte. Em
631 contraste, os níveis de cortisol e *p*O₂ não foram influenciados pelo aumento nas
632 densidades de transporte. O transporte teve efeito marcante no perfil leucocitário. Na
633 chegada, todos os tratamentos evidenciaram linfopenia e neutrofilia resultando em
634 aumento na relação N/L. Linfopenia perdurou na maior densidade até 2h após do
635 transporte. As restaurações de todos os parâmetros hematológicas com 2h de
636 recuperação, sua estabilização com 24h após do transporte e a total sobrevivência
637 demonstra a tolerância fisiológica de esta espécie à metodologia empregada.
638 Considerando que a rentabilidade dos sistemas de transporte de peixes vivos está
639 fundamentada em altas densidades de estocagem, e com base nos indicadores

640 fisiológicos obtidos no presente estudo, é concluído que juvenis de garoupa verdadeira
641 podem ser transportados em sistemas fechados por 8h a partir de uma densidade 64 g/L.
642 **Palavras chaves:** Estresse, Transporte, cortisol, glicose, perfil leucocitário.

643

644 **Abstract**

645 The stress associated with the transportation of fish can have negative effects on fish
646 health, which may lead to high rates of mortality during and after the transport. Juvenile
647 dusky grouper, *Epinephelus marginatus*, were transported in 27 plastic bags for 8h at
648 stocking densities of 28, 45 and 64kg m⁻³. On arrival, they were transferred into 18
649 fiberglass 300L tanks, where they were maintained for 24h with the aim of evaluating
650 the stress response by monitoring hematological biomarkers. Water samples collected
651 before and after transport were analyzed for oxygen, temperature, pH, alkalinity and
652 carbon dioxide. Blood samples were collected before transport, upon arrival (0h) and at
653 2 and 24h after transport. Fresh blood was analyzed in an i-Stat meter to measure the
654 levels of glucose, O₂ partial pressure (*p*O₂), CO₂ partial pressure (*p*CO₂), blood pH and
655 HCO₃⁻. Plasma cortisol was analyzed by electrochemiluminescence. In addition, blood
656 smears were prepared to study the leukocyte profile and neutrophils/lymphocyte ratio
657 (N/L). The pH and dissolved oxygen level in the water gradually decreased, while the
658 concentration of CO₂ increased with increasing stocking densities. At the end of
659 transport, blood *p*CO₂, pH and HCO₃⁻ showed substantial increases in the fish from all
660 treatments compared to pre-transport. Plasma glucose levels were elevated only in fish
661 subjected to the higher density during transport. By contrast, plasma cortisol and *p*O₂
662 levels were not influenced by increased transport densities. Transport had a marked
663 effect on the leukocyte profile. Upon arrival, all treatments evidenced lymphopenia and
664 neutrophilia resulting in an increased N/L ratio. Lymphopenia was sustained at higher
665 stocking densities until 2h after transport. The restoration of all hematological
666 parameters within 2h of recovery, stabilization within 24h after transport and total
667 survival demonstrate physiological tolerance of this species to the transport
668 methodology employed. Considering that the profitability of live fish transport relies on
669 high stocking densities, and given the physiological indicators obtained in this study, it

670 is concluded that juvenile dusky grouper could be transported in a closed system for 8h
671 starting with a density of 64kg m⁻³.

672 **Keywords:** Stress, transport, cortisol, glucose, leukocyte profile.

673

674 1. INTRODUÇÃO

675

676 O transporte de peixes vivos tem acompanhado o rápido crescimento da
677 aquicultura (Stieglitz et al., 2012). O transporte atua como um potencial estressor que
678 afeta negativamente à saúde e o bem-estar dos peixes (Iversen et al., 2009; King, 2009).

679 Após o estímulo de um agente estressor, duas respostas endócrinas são ativadas: a
680 primeira resposta é mediada pelo eixo cérebro-simpático-células cromafinas (BSC), e a
681 segunda resposta pelo eixo hipotálamo-pituitaria-interrenal (HPI). Durante a ativação do
682 eixo (BSC), as catecolaminas, adrenalina e noradrenalina são rapidamente liberadas na
683 circulação pelas células cromafinas do rim cefálico; A ativação de eixo-HPI é
684 caracterizada pelo incremento dos níveis do hormônio glicocorticóide cortisol (Barton
685 & Iwama, 1991; Barton, 2002). Estes hormônios promovem as respostas secundárias
686 para os requerimentos energéticos, incluindo elevação dos níveis da glicemia sanguínea
687 (Barton and Iwama, 1991). Assim, os níveis plasmáticos de cortisol e glicose são
688 comumente empregados como indicadores de estresse (Fanouraki et al., 2011).

689 Durante o estresse, respostas neuroendócrinas interagem com o sistema imune
690 (Harris & Bird, 2000; Yada & Nakanishi, 2002). A liberação de catecolaminas e
691 glicocorticóide influenciam as funções imunes para estimular ou inibir a resposta imune
692 (Elenkov and Chrousos, 2006; Fast et al., 2007; Butts and Sternberg, 2008). Mudanças
693 no número e na distribuição dos leucócitos no sangue têm sido reportadas como efeito
694 do estresse (Dhabhar et al., 1996; Wojtaszek et al., 2002), portanto, a contagem
695 diferencial de leucócitos tem sido utilizada como indicador de estresse fisiológico em
696 vários taxa de vertebrados (Davis et al., 2008).

697 A deterioração da qualidade da água junto a inadequadas pratica de agravam a
698 resposta de estresse nos peixes durante o transporte. O transporte de peixes em sistema

699 fechado tem o suprimento de oxigênio garantido pela injeção direta deste gás, ou de ar,
700 nas unidades de transporte. Entretanto, o processo não evita a rápida acidificação do
701 meio pelo acréscimo constante de dióxido de carbono (CO₂) produzido pela respiração
702 dos peixes (Fivelstad et al., 1998; Tang et al., 2009). A alta solubilidade do CO₂ em
703 meio aquoso facilita sua difusão através das brânquias e tecidos (Ishimatsu et al., 2005)
704 elevando rapidamente a pressão parcial do CO₂ (pCO₂) no sangue (hipercapnia),
705 promovendo o declínio do pH no plasma e da capacidade de carga o oxigênio no
706 sangue (Heisler, 1993). A acidificação extra e intracelular resultante pode ser
707 tamponada pela elevação plasmática dos níveis de HCO₃⁻ através da conversão de CO₂
708 pela ação catalítica da anidrase carbônica e subsequente secreção pelo antiporte HCO₃⁻
709 /Cl⁻ (Marshall & Grosell, 2006).

710 Para obter eficiência e rentabilidade, o transporte de peixes vivos deve ser
711 realizado sob elevada densidade de estocagem (Carneiro & Urbinati, 2002; Carneiro et
712 al., 2009; Tang et al., 2009). Desta forma, o estudo da tolerância fisiológica dos
713 organismos ao transporte, bem como a densidade de estocagem adequada a ser
714 empregada, é fundamental para manter o estado de saúde dos peixes, maximizar a
715 sobrevivência e minimizar os custos do transporte (Paterson et al., 2003; Lim et al.,
716 2003).

717 As garoupas apresentam robustez em condições intensivas de criação e rápido
718 crescimento a elevadas temperaturas, motivando a expansão da aquicultura de estas
719 espécies (Pierre et al., 2008). A garoupa verdadeira, *Epinephelus marginatus* (Lowe,
720 1834), ocorre no Oceano Atlântico oriental, ao longo da costa do sul do Brasil e no Mar
721 Mediterrâneo (Heemstra & Randall, 1993), onde é altamente demandada e de grande
722 importância na pesca recreativa, sendo apontada como candidata à piscicultura marinha
723 e programas de gestão de zona costeira (Machado & Mandich, 2001).

724 Ainda são escassas informações sobre esta espécie na aquicultura e não são
725 conhecidos estudos sobre a densidade de estocagem ideal para o seu transporte. Assim,
726 este estudo teve como objetivo determinar a densidade de estocagem apropriada para o
727 transporte de juvenis de *E. marginatus*, monitorando as respostas primárias, secundária
728 e terciárias ao estresse.

729 2. MATERIAL E MÉTODOS

730

731 2.1 *Os peixes*

732

733 Juvenis de garoupas foram comprados no laboratório da empresa Redemar
734 Alevinos, (Ilhabela, São Paulo, SP, Brasil) e foram produzidos de acordo com o
735 protocolo descrito por Kerber et al. (2012). Os peixes foram trasladados ao
736 Laboratório de Piscicultura Estuarina e Marinha (LAPEM) da Universidade Federal do
737 Rio Grande (FURG), onde foram mantidas por 9 meses, em cinco tanques de 1000L,
738 conectados em sistema de recirculação de água (RAS).

739

740 2.2 *Aclimação dos peixes*

741

742 As garoupas ($89,9 \pm 1,7$ g) foram aclimatados às condições experimentais, durante
743 duas semanas e depois dividida em nove tanques de fibra de vidro 300L (18
744 peixes/tanque, 5,4 kg/L), num RAS.

745 Durante a aclimação, os peixes foram alimentados com uma dieta comercial de
746 50% de proteína e 10% de lipídios (Nicoluzzi, Penha-SC, Brasil), duas vezes ao dia até
747 a saciedade aparente. A alimentação foi interrompida 24 horas antes do transporte.

748 A temperatura da água foi reduzida gradualmente nos tanques 24-21 °C (0,5°C/h),
749 antes de colocar os peixes nos sacos de transporte. De acordo com Fanouraki et al.
750 (2011), *E. marginatus* apresenta baixa atividade e menor resposta ao estresse entre 19 e
751 21°C.

752

753 2.3 *Desenho experimental*

754

755 Para a análise da condição inicial (pré-transporte), nove peixes, um em cada
756 tanque, foram capturados aleatoriamente a partir dos tanques de aclimação. Os peixes
757 foram então embalados em sacos de plástico 60L, contendo, 10L de água e 20L de
758 oxigênio, em três densidades: 27, 45 e 64 g/L correspondentes a 3, 5 e 7 de peixe por
759 saco, respectivamente. Vinte e sete sacos de transporte foram analisados, nove sacos por
760 densidade, três sacos de cada densidade foram destinados para cada um dos tempos de

761 amostragem [imediatamente após o transporte (0h), 2 e 24h após o transporte]. Para
762 manter constante a temperatura da água, os sacos foram colocados em caixas de isopor.
763 As caixas foram colocados em uma caminhonete e transportados para 8h. Na chegada,
764 os três peixes de cada saco foram transferidos para 18 tanques de recuperação, que eram
765 mesmos tanques utilizados para aclimatação.

766

767 2.4 *Análises química da água*

768

769 Os parâmetros da qualidade da água foram determinados antes e após o transporte.
770 A temperatura da água ($\pm 0,01^\circ\text{C}$) e oxigênio dissolvido (OD) ($\pm 0,01\text{mg/L}$) foram
771 medidos com oxímetro digital (Yellow springs Instruments, Yellow Springs, OH,USA).
772 O pH da água ($\pm 0,01$) foi verificado em pHmetro (Five Easy FE20, Suíça). A
773 alcalinidade total ($0,1\text{ mg CaCO}_3/\text{L}$) foi avaliada por titulação de acordo com a guias da
774 American Public Health Association. O dióxido de carbono (CO_2) ($\pm 0,01\text{ mg/L}$) foi
775 calculado pelo método de Wurts & Durborow (1992). Amônia total (TAN) ($\pm 0,1$
776 mg/L), foi quantificado de acordo com a UNESCO (1983), e nitrito ($\pm 0,1\text{mg/L}$) foi
777 determinado de acordo com Strickland & Parsons (1972).

778 Os valores (média \pm SE) para o oxigênio dissolvido, temperatura, salinidade, pH,
779 TAN e nitrito no período de aclimatação, foram $6,39 \pm 0,4\text{mg/L}$, $24,1 \pm 0,6^\circ\text{C}$, $30 \pm$
780 $0,0\%$, $7,95 \pm 0,07$, $0,07 \pm 0,1\text{mg/L}$ e $0,02 \pm 0,1\text{ mg/L}$, respectivamente.

781

782 2.5 *Amostras de sangue e parâmetros*

783

784 Pós-transporte, três peixes foram amostrados em cada saco para cada densidade
785 testada. Antes da amostragem, os peixes foram anestesiados com benzocaína (50ppm),
786 pesados (g), e medidos (cm). O sangue foi colhido a partir de navios de caudal, com o
787 auxílio de seringas heparinizadas (1mL) a menos de 2 minutos após a anestesia.

788 Glucose no sangue, a pressão parcial de CO_2 ($p\text{CO}_2$), a pressão parcial de O_2
789 ($p\text{O}_2$), a concentração de bicarbonato (HCO_3^-), e o pH foram determinados com um
790 analisador clínico portátil i-STAT[®] utilizando um cartucho CG8+ (Abbott Laboratories,
791 Chicago, IL, EUA). Os valores de $p\text{CO}_2$, $p\text{O}_2$, pH e HCO_3^- foram corrigidos para a
792 temperatura do transporte (21°C), como descrito por Hanley et al. (2010). O uso de i-

793 STAT[®] e cálculos para os gases no sangue têm sido descritas para várias espécies de
794 peixes (Jacobs et al, 1993, Pidetcha et al, 2000; Harrenstien et al, 2005, Kristensen et al,
795 2010).

796 O plasma foi obtido por centrifugação de sangue total (4300g/10min a 5°C) para
797 medir os níveis de cortisol em electroquimioluminescência em um analisador
798 totalmente automatizado Cobas[®] 6000 (Cobas 6000, Roche, Alemanha).

799

800 2.6 *Contagem diferencial de leucócitos*

801

802 Imediatamente após a colheita de sangue foram confeccionadas extensões
803 sanguíneas (três lâminas/peixe). As extensões foram secas a temperatura ambiente (2h)
804 e fixadas em metanol absoluto por 10min, para posterior coloração com soluções de
805 May Grunwald e Giemsa. As lâminas foram imersas em May Grunwald (0,3%) por
806 5min. e em Giemsa (5%) durante 30 min., logo após foram lavadas com água destilada
807 e secadas ao ar. As células foram contadas sobre o óleo de imersão em objetiva (1000X)
808 até que um total de 100 leucócitos fossem identificados sequencialmente. O termo
809 diferencial neste contexto refere-se a diferenças percentuais por tipo celular (linfócito,
810 neutrófilo, eosinófilo, monócito e basófilo). Os leucócitos foram identificados segundo
811 os critérios de Clauss et al. (2008). A relação de neutrófilos e linfócitos (N/L) foi
812 calculada para cada tratamento e tempo amostral.

813

814 2.7 *Análises estatística*

815

816 Os dados foram analisados utilizando Statistica 7,0 e expressos como a média (\pm
817 S.E). A qualidade da água para cada densidade foi comparado por um ANOVA uma via
818 e o teste de Tukey para comparações post-hoc das médias ($P < 0,05$). Os dados foram
819 analisados por uma análise de variância de duas vias (ANOVA), com densidade (27, 45
820 e 64 kg m⁻³) e tempo de amostragem (imediatamente (0h), 2, e 24 horas após o
821 transporte). Quando foi observada uma diferença significativa ($P < 0,05$), as médias
822 foram comparadas pelo teste de Tukey. As médias obtidas nas diferentes amostragem
823 foram comparados com a condição inicial (antes do transporte), utilizando teste Dunnett
824 's ($P < 0,05$).

825 3. RESULTADOS

826

827 Não foi observada mortalidade durante o período experimental.

828 3.1 *Parâmetros da água*

829

830 Temperatura e alcalinidade não foram alterados durante o transporte,
831 independente da densidade de estocagem. No entanto, houve uma diminuição
832 significativa na concentração de oxigênio e do pH com o aumento da densidade. Em
833 contraste, a concentração de CO₂ aumentou significativamente durante o transporte, e a
834 concentração mais elevada de CO₂ foi registada para a maior densidade (Tabela 1).

835

836 3.3 *Parâmetros sanguíneos*

837

838 Os níveis de cortisol não foram alterados pelo transporte (Fig. 1A). Na maior
839 densidade (65g/L), um aumento significativo na concentração de glucose no sangue
840 ocorreu imediatamente após o transporte ($P < 0,05$). No entanto, 2h mais tarde, a
841 glicose sanguínea regressou ao nível inicial (Fig. 1B).

842 No fim do transporte os peixes expostos aos duas maiores densidades
843 apresentaram altos valores médios para a $p\text{CO}_2$ arterial do que aqueles na menor
844 densidade (Fig. 2A). $[\text{HCO}_3^-]$ no sangue aumentou com as densidades (Fig. 2B), e o pH
845 do sangue aumentou em todas as densidades após o transporte (Fig. 3A). Em todos os
846 tratamentos, o sangue $p\text{CO}_2$, $[\text{HCO}_3^-]$ e pH retornou aos níveis basais dentro de 2h e
847 permaneceram estáveis por 24h após o transporte. Não foram observadas diferenças na
848 $p\text{O}_2$ do sangue entre os tratamentos durante o transporte (Fig. 3B).

849

850 3.3 *Proporção de leucócitos e relação de N/L*

851

852 Na condição inicial, os neutrófilos e linfócitos foram as mais numerosas leucócitos,
853 a sua percentagem média foi de $45,80 \pm 4,88$ e $48,40\% \pm 4,86\%$, respectivamente (Fig.
854 4- BT). A percentagem de eosinófilos e monócitos foi de $4,00 \pm 2,53\%$ e $3,40 \pm 1,75\%$,
855 respectivamente (Fig. 4-BT). Os basófilos foram raramente encontrados ($0,40 \pm 0,40\%$).
856 A relação N/L média foi $1,01 \pm 0,19$ (Fig. 5).

857 O transporte teve um efeito marcado na proporção do número de leucócitos.
858 Linfopenia (diminuição dos linfócitos) e granulocitose (aumento no número de
859 neutrófilos e eosinófilos), foram observados em todas as densidades no final do
860 transporte com relação à condição inicial ($P < 0,05$). No entanto, a proporção de
861 leucócitos não foi alterada ($P > 0,05$) entre as densidades de estocagem imediatamente
862 após o transporte. Transporte não afetou a porcentagem de monócitos (Fig. 4). Entre os
863 tratamentos, não foram observadas diferenças significativas nos percentuais de
864 leucócitos 2h após o transporte. No entanto, nas duas maiores densidades, a
865 percentagem de linfócitos era ainda baixo no que diz respeito à condição inicial. Vinte e
866 quatro horas após o transporte, a proporção de leucócitos voltou para o nível antes do
867 transporte para todas as densidades de estocagem (Fig. 4).

868 A neutrofilia (aumento do número de neutrófilos), associada com a linfopenia
869 promoveu um aumento significativo ($P < 0,05$) na relação N/L para todas as densidades
870 imediatamente após o transporte. No entanto, apesar da diferença a partir da condição
871 inicial, não foram observadas diferenças significativas em relação N/L entre as
872 densidades (Fig. 5).

873

874 4. DISCUSSÃO

875

876 Nos sistemas de transporte de peixes vivos, principalmente nos fechados,
877 acontecem rápidas e significativas mudanças na qualidade da água, as quais foram
878 evidenciadas neste estudo. Embora os níveis de oxigênio tenham permanecido elevados,
879 mesmo na maior densidade de estocagem (64 g/L), os níveis de pH e a concentração de

880 dióxido de carbono (CO₂) diminuíram e aumentaram, respectivamente, nos sistemas,
881 proporcionalmente ao aumento da densidade.

882 A máxima concentração de CO₂ (61,22 ± 2,34 mg/L) foi registrada na maior
883 densidade de estocagem quando o pH diminuiu à 6,38 ± 0,01. Valores similares de
884 concentração de CO₂ (75 mg/L) e pH (6,4) foram reportados por Moran et al., (2008)
885 durante o transporte de yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) sob densidade de 20 g/L,
886 também em sistema fechado.

887 O incremento no CO₂ dissolvido na água (hipercarbia) é um efeito característico e
888 associado aos sistemas de transporte (Rimmer, 1997). Os valores de CO₂ registrados
889 neste estudo correspondem a hipercarbia severa, descrita por outros autores para
890 espécies marinhas (Foss et al., 2004; Hayashi et al., 2004a, 2004b; Moran et al., 2008).

891 Vários autores têm reportado marcada hipercapnia como uma consequência direta
892 do incremento das concentrações de CO₂ na água (Hosfeld et al., 2008; Tang et al.,
893 2009; Petochi et al., 2011), como foi observado neste estudo.

894 A hipercapnia afeta a relação ácido-base (Crocker & Cech, 1998) e promove a
895 acidificação do sangue (Hayashi et al., 2004a, 2004b). Os peixes possuem
896 quimiorreceptores para acidose do sangue localizada predominantemente no sistema
897 nervoso central (Taylor, 1992), assim como receptores no epitélio branquial capazes de
898 sentir mudanças ambientais de CO₂ molecular (níveis crescentes), em vez de H⁺. Esses
899 quimiorreceptores iniciam vários reflexos cardiorrespiratórios, incluindo
900 hiperventilação e taquicardia ou bradicardia (Perry & Abdallah, 2012). Vários outros
901 mecanismos compensatórios, envolvendo, principalmente, a regulação iônica, podem
902 ser ativados em resposta a acidose no sangue. Estes mecanismos incluem elevação das
903 [HCO₃⁻] no plasma (Wood & Jackson, 1980), em resposta à ação catalítica da anidrase
904 carbônica nas brânquias e glóbulos vermelhos (RBC) (Tufts & Perry, 1998)
905 acompanhada pela excreção de prótons (H⁺), pelo antiportador Na⁺/H⁺ nos eritrócitos
906 ou através de um V-ATPase nas brânquias e a excreção de HCO₃⁻ através do
907 antiportador HCO₃⁻/Cl⁻ (Marshall & Grosell, 2006).

908 De facto, de acordo com relatos na literatura, observou-se um aumento
909 significativo na [HCO₃⁻] no sangue que era proporcional à densidade de estocagem após

910 o aumento da $p\text{CO}_2$. No entanto, o pH do sangue aumentou após o transporte na
911 proporção das densidades avaliadas. Vários autores têm relatado a estabilidade do pH
912 do sangue após a exposição à hipercapnia devido às respostas compensatórias rápidas a
913 acidose. Petochi et al. (2011) relataram que sea bass (*Dicentrarchus labrax*) acumulam
914 níveis significativos de HCO_3^- no sangue a partir das primeiras 3h da exposição a
915 diferentes níveis de $p\text{CO}_2$ na água (24,7mm Hg e 37,8mm Hg), o que resulta num
916 aumento do pH do sangue no mesmo período. Japanese flounder (*Paralichthys*
917 *olivaceus*) expostos a 32mm Hg $p\text{CO}_2$ mostraram uma redução no pH do sangue em 2h
918 de exposição, seguindo-se um aumento deste em 3h, quando os níveis de $[\text{HCO}_3^-]$ no
919 sangue também aumentaram (Hayashi et al, 2004a.; 2004b).

920 O incremento nos níveis do cortisol e glicose no sangue durante o transporte são
921 comumente reportados como resposta primária e secundária ao estresse,
922 respectivamente (Inversen et al., 2005; Inversen et al., 2009; Oyoo-Okoth et al., 2011) e
923 às altas densidades de estocagens (Gomes et al., 2003; Urbinati et al., 2004; Carneiro et
924 al., 2009). No entanto, a garoupa verdadeira no mostrou nenhuma diferença nos níveis
925 do cortisol no plasma durante o transporte, e somente nos peixes transportados na maior
926 densidade de estocagem sofreram elevação de glicemia sanguínea. Os aumentos nos
927 níveis de glicose no plasma são gerados, inicialmente, por glicogenólise mediada pelas
928 catecolaminas, e em fases posteriores por gluconeogénese mediada pelo cortisol
929 (Mommensen et al, 1999; Pankhurst & Begg, 2004).

930 O decurso de tempo para a resposta interrenal do hormônio adrenocorticotrófico
931 (ACTH) para a produção de cortisol é variável entre espécies, mas tipicamente tem uma
932 latência de minutos em vez de horas após exposição a um stressor (Pankhurst, 2011;
933 Fanouraky et al, 2011). *Epinephelus Malabaricus* previamente mantidas em uma
934 salinidade de 24‰ e subsequentemente transferidos para 29‰ e 34‰ água salgada
935 mostrou um aumento significativo nos níveis de cortisol e de glicose no soro após 10 e
936 20 min, respectivamente, o que não foi observado após 30 min (Tsui et al, 2012).
937 Portanto, as respostas rápidas ao estresse pode não ter sido percebida em nosso estudo,
938 ou poderia ter sido atenuado pela temperatura da água. Estudos anteriores mostraram
939 claramente que *E. marginatus* em baixas temperaturas (19-21°C) não respondem com
940 mudanças significativas no nível de cortisol, mas que as concentrações de glicose no

941 sangue são constantemente elevadas (Fanouraky et al, 2011) após a exposição ao
942 estresse agudo.

943 Os hormônios liberados após o estresse (adrenalina, noradrenalina, ACTH e
944 cortisol) modulam a expressão de citocinas através de receptores específicos expressos
945 sob/em tipos e subtipos de leucócitos (Verburg-van Kemenade et al., 2013), o que afeta
946 a distribuição dessas células em tecido (Engelsma et al, 2003;. Metz et al, 2006).
947 Portanto, as alterações na contagem diferencial de leucócitos evidenciado após o
948 transporte e sua persistência nas altas densidades em 2h após o transporte demonstram
949 claramente que os peixes respondem ao estresse, e comprova a eficácia e sensibilidade
950 desta técnica como um biomarcador de estresse para a garoupa. Isso reforça a idéia de
951 que as elevações nos níveis de cortisol pode não ter sido percebida como uma função do
952 tempo monitorados neste estudo, ou que as mudanças na distribuição de leucócitos pode
953 ser afetada por outros hormônios relacionados ao estresse, como as catecolaminas e
954 ACTH (Castillo et al, 2009;. Kepka et al, 2013;. Verburg-van Kemenade et al, 2013).

955 Tanto a sinalização de quimiocinas e interações neuroendócrino-imunes são
956 fenômenos filogeneticamente conservados (Verburg-van Kemenade et al., 2013).
957 Portanto, neutrofilia e linfopenia também foram relatados como uma resposta ao
958 estresse por outros autores, não só em peixes (Ellsaesser & Clem, 1986; Pulsford et al,
959 1994; Khangarot et al, 1999), mas também em outros táxons de vertebrados, incluindo
960 mamíferos, aves, répteis e anfíbios (Gross & Siegel, 1983; Case et al, 2005; Cabagna et
961 al, 2005;. Frank et al, 2006;. Noda et al, 2007).

962 Outros estudos relataram mudanças no perfil leucocitário após exposição ao
963 estresse, como redução do número de linfócitos B circulantes em salmão coho
964 (*Oncorhynchus kisutch*) e catfish (*Ictalurus punctatus*) (Maule & Shreck, 1990;
965 Ainsworth et al., 1991). Diminuição da quantidade de linfócitos circulantes, também foi
966 reportada em *Cyprinus carpio* após exposição a estresse térmico agudo, em quanto que
967 a porcentagem relativa de granulócitos foi dobrada (Engelsma et al., 2003). Também,
968 um aumento no numero de granulócitos foi reportado para *Salmo salar* após choque
969 térmico (Pettersen et al., 2005).

970 Foi evidente que os juvenis de garoupa verdadeira eram tolerantes à manipulação,
971 hipercapnia e aglomeração, estressores associados ao transporte de peixes vivos, a
972 tolerância, devido a uma capacidade compensatória adequada contra o estresse
973 hipercápnico aumentando $[\text{HCO}_3^-]$ no sangue. Em um ensaio de transporte simulado,
974 Moran et al. (2008) relataram perturbação fisiológica limitada e baixa mortalidade de
975 juvenis de yellowtail kingfish expostos a concentrações de CO_2 dissolvidos tão elevado
976 como 75mg/L por 5h, a densidades inferiores (20g/L). Densidades menores de
977 estocagem, tais como 20-25g/L para red porgy (*Pagrus pagrus*) e de 20-30g/L para o
978 bacalhau (*Gadus morhua*), são comumente usados para o transporte de juvenis de
979 peixes marinhos (Pavlidis et al, 2003; Treasurer et al., 2012).

980 De acordo com os dados actuais, esta densidade normalmente utilizada para as
981 espécies marinhas poderia ser duplicada para a garoupa verdadeira. O perfil de
982 leucócitos mostrou ser o parâmetro mais sensível e confiável para avaliar a resposta ao
983 estresse nesta espécie nas condições testadas. Em todas as densidades, 2h depois do
984 transporte, os parâmetros monitorizados do sangue foram restaurados para os valores da
985 condição inicial, demonstrando que o garoupa verdadeira pode retomar a sua
986 homeostase eficaz uma vez que o estressor é removido. Porque a rentabilidade dos
987 sistemas de transporte para peixes vivos baseia-se na elevada densidade de estocagem, e
988 com base dos indicadores hematológicos obtidos neste estudo, é sugerido que garoupa
989 verdadeira pode ser transportado num sistema fechado por até 8h à 21°C numa
990 densidade de estocagem a partir de 64 g/L.

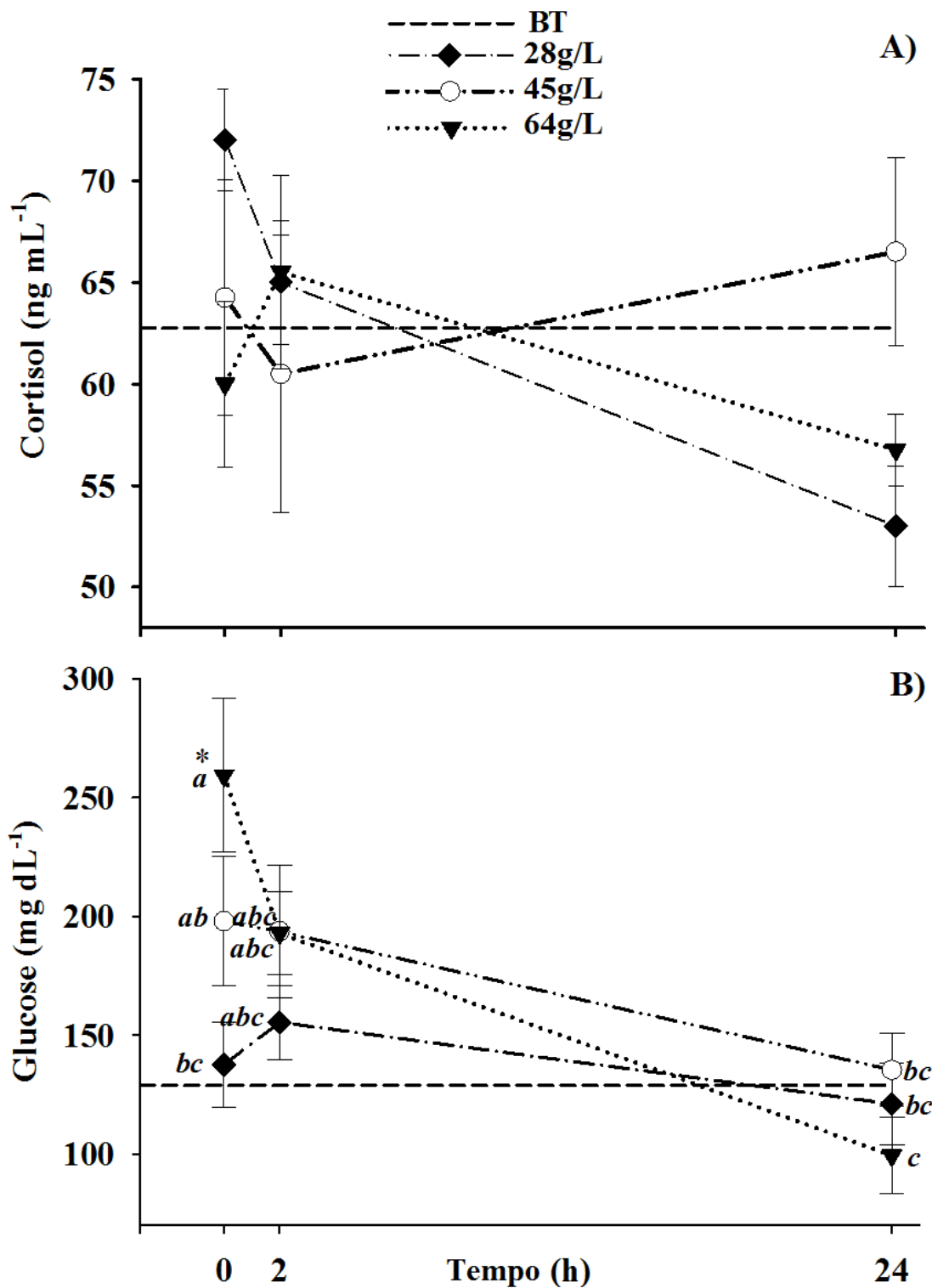
991

992 Tabela 1. Valores médios (\pm E.S) da temperatura (T), oxigênio dissolvido (OD), pH,
 993 concentração de dióxido de carbono na água (CO₂), e alcalinidade (Alc) antes e após de
 994 8h de transporte de juvenis de garoupa verdadeira *Epinephelus marginatus* em
 995 densidades de estocagem de 28, 45 e 64g/L. Letras distintas indicam diferenças entre
 996 médias em cada linha (ANOVA, Tukey, P <0.05).

| Parâmetros | Antes | Após transporte | | |
|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| | transporte | 28g/L | 45g/L | 64g/L |
| T (°C) | 21,17 \pm 0,73 ^a | 21,32 \pm 0,10 ^a | 21,34 \pm 0,10 ^a | 21,36 \pm 0,08 ^a |
| OD (mg O ₂ /L) | 6,39 \pm 0,04 ^c | 16,76 \pm 0,30 ^a | 13,19 \pm 0,75 ^b | 8,47 \pm 0,35 ^c |
| pH | 8,21 \pm 0,01 ^a | 7,09 \pm 0,03 ^b | 6,68 \pm 0,04 ^c | 6,38 \pm 0,01 ^d |
| CO ₂ (mg/L) | 1,00 \pm 0,00 ^d | 11,22 \pm 0,91 ^c | 31,11 \pm 4,57 ^b | 61,22 \pm 2,34 ^a |
| Alc (mg CaCO ₃ /L) | 171,67 \pm 3,33 ^a | 152,78 \pm 4,34 ^a | 141,11 \pm 5,57 ^a | 157,22 \pm 3,55 ^a |

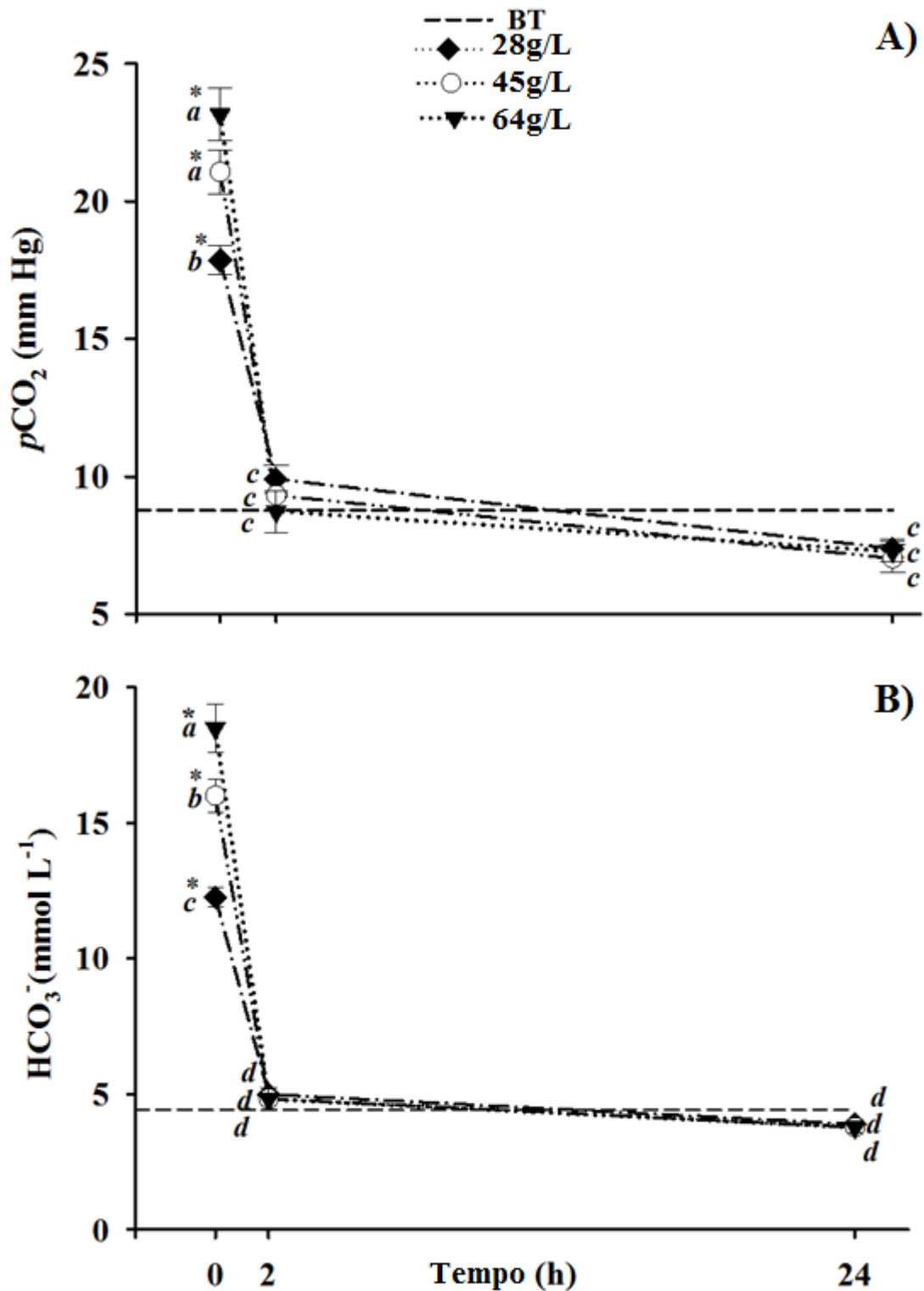
997

998



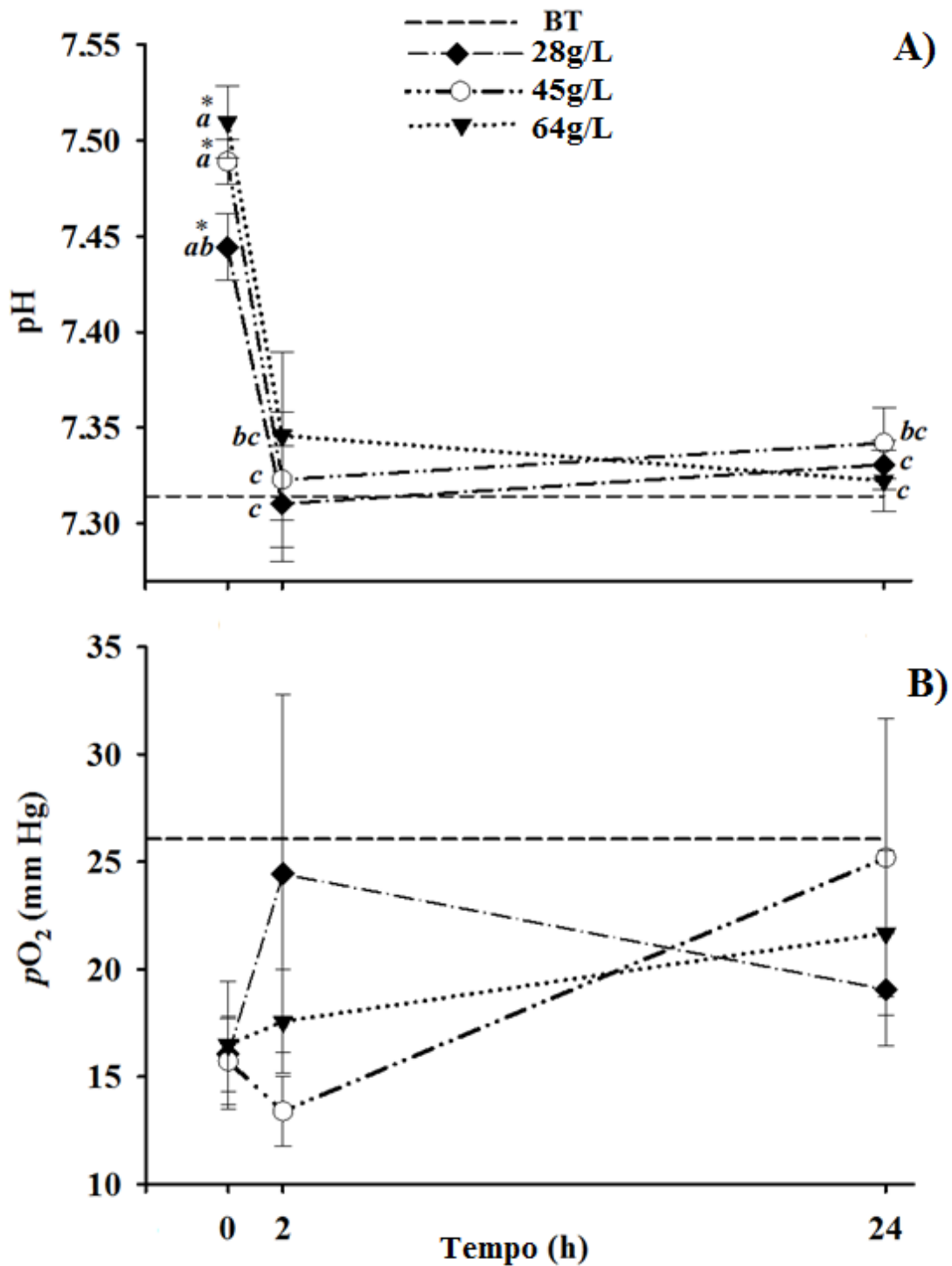
999

Figura 1. Mudanças em: A) cortisol plasmático e B) glicose no sangue de *Epinephelus marginatus* transportadas durante 8h em diferentes densidades de estocagem. Letras distintas indicam diferenças entre as amostras (ANOVA-duas vias, Tukey, $P < 0.05$). * Indica diferenças significativas entre cada amostra com a condição inicial antes do transporte (BT, linha tracejada) (Teste de Dunnett, $P < 0.05$). 0h-Imediatamente após o transporte, 2 e 24h após transporte (n = 9). Ausência de letras representa não diferenças entre as amostras. Dados apresentados como médias \pm E.S



1000

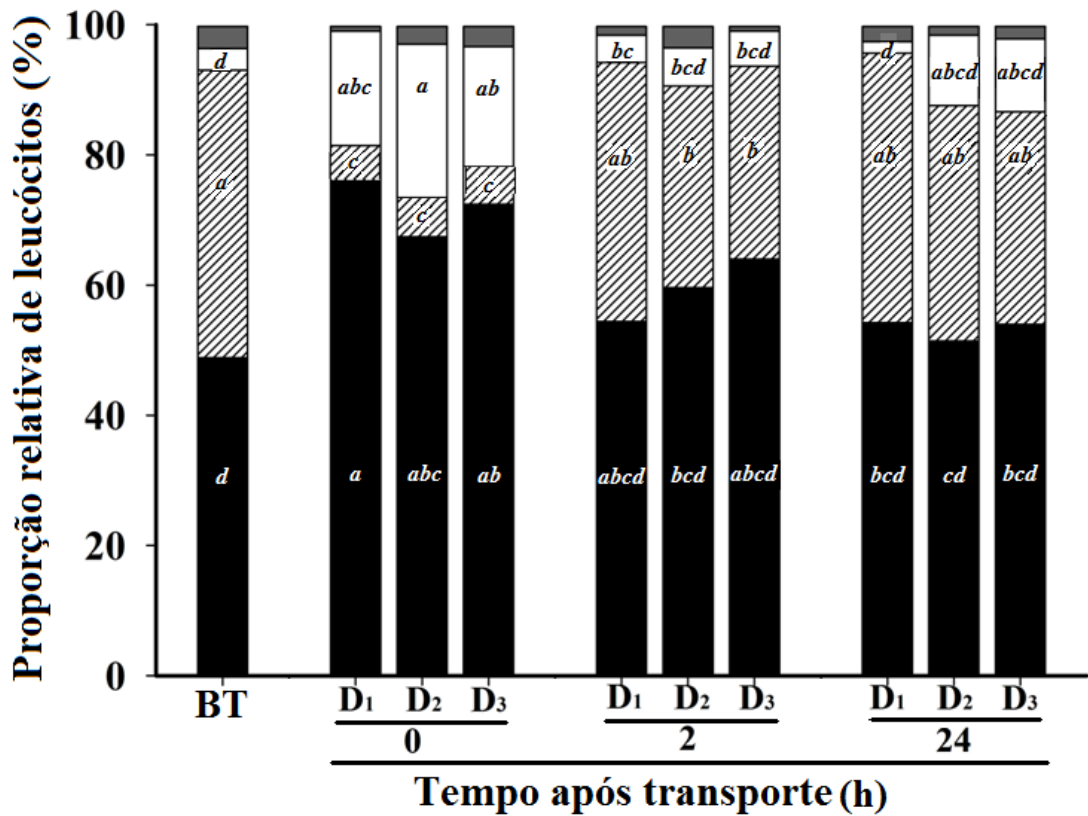
Figura 2. Mudanças em: A) pressão parcial de dióxido de carbono ($p\text{CO}_2$) e B) concentração de bicarbonato (HCO_3^-) de *Epinephelus marginatus* transportados durante 8h em diferentes densidades de estocagem. Letras distintas indicam diferenças entre as amostras (ANOVA-duas vias, Tukey, $P < 0.05$). * Indica diferenças significativas entre cada amostra com a condição inicial antes do transporte (BT, linha tracejada) (Teste de Dunnet, $P < 0.05$). 0h-Imediatamente após o transporte, 2 e 24h após transporte ($n = 9$). Dados apresentados como médias \pm E.S.



1001

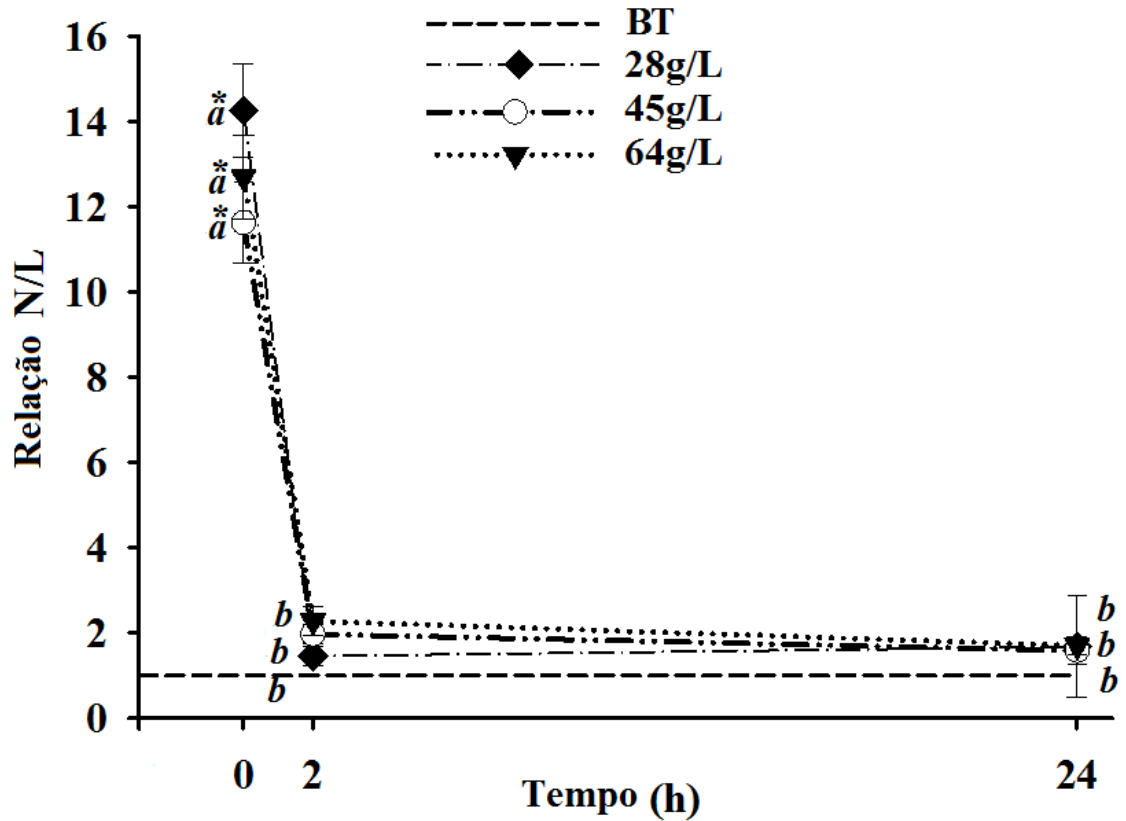
1002

Figura 3. Mudanças em: A) pH no sangue e B) pressão parcial de oxigênio (pO_2) de *Epinephelus marginatus* transportados durante 8h em diferentes densidades de estocagem. Letras distintas indicam diferenças entre as amostras (ANOVA-duas vias, Tukey, $P < 0.05$). * Indica diferenças significativas entre cada amostra com a condição inicial antes do transporte (BT, linha tracejada) (Teste de Dunnett, $P < 0.05$). 0h-Imediatamente após o transporte, 2 e 24h após transporte ($n = 9$). Ausência de letras representa não diferenças entre as amostras. Dados apresentados como médias \pm E.S.



1004
 1005
 1006
 1007
 1008
 1009
 1010
 1011

Figura 4. Proporção relativa (média) de leucócitos circulantes (■ neutrófilos, ▨ linfócitos, □ eosinófilos e ■ monócitos) no sangue de juvenis de *Epinephelus marginatus*, antes e após 8h de transporte em diferentes densidades de estocagem (D₁= 28g/L, D₂= 45 g/L e D₃= 64 g/L). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre a média de cada tipo leucocitário (ANOVA duas vias, Tukey, $P < 0.05$). Ausência de letras representa não diferenças entre as amostras. BT- antes do transporte, 0h-Imediatamente após transporte, 2 e 24h após transporte (n = 9).



1013
 1014
 1015
 1016
 1017
 1018
 1019
 1020

Figura 6. Mudanças na relação (média \pm E.S) de neutrófilos a linfócitos (N/L) através do período experimental no sangue de juvenis de *Epinephelus marginatus*, antes e após 8h de transporte em diferentes densidades de estocagem. Letras distintas indicam diferenças entre as amostras (ANOVA- duas vias, Tukey, $P < 0.05$). * Indica diferenças significativas entre cada amostra com a condição inicial antes do transporte (BT, linha tracejada) (Teste de Dunnet, $P < 0.05$). 0h-Imediatamente após o transporte, 2 e 24h após transporte (n = 9). Dados apresentados como médias \pm E.S.

1021 **REFÊRENCIAS BIBLIOGRAFICAS**

1022

1023 Ainsworth, A.J, Dexiang, C., Waterstrat, P.R., 1991. Changes in peripheral blood
1024 leucocyte percentages and function of neutrophils in stressed channel catfish.
1025 Journal of Aquatic Animal Health 3, 41-47.

1026 APHA, 1998. Standard Methods for the Examination of the Water and Wastewater,
1027 22nd ed. American Public Health Association, Washington, United States.

1028 Barton, B.A., Iwama, G.K., 1991. Physiological changes in fish from stress in
1029 aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. Annual
1030 Review of Fish Diseases 1, 3-26.

1031 Barton, B.A., 2002. Stress in Fishes: a diversity of responses with particular reference
1032 to changes in circulating corticosteroids. Integrative and Comparative Biology 42,
1033 517-525.

1034 Begg, K., Pankhurst, N.W., 2004. Endocrine and metabolic responses to stress in a
1035 laboratory population of the tropical damselfish *Acanthochromis polyacanthus*. J.
1036 Journal of Fish Biology. 64, 133-145.

1037 Butts, C.L., Sternberg, E.M., 2008. Neuroendocrine factors alter host defense by
1038 modulating immune function. Cell Immunology 252, 7-15.

1039 Cabagna, M.C., Lajmanovich, R.C., Stringhini, G., Sanchez-Hernandez, J.C., Peltzer,
1040 P.M., 2005. Hematological parameters of health status in the common toad *Bufo*
1041 *arenarum* in agroecosystems of Santa Fe Province, Argentina. Applied
1042 Herpetology 2, 373-380.

1043 Carneiro. P.C.F., Urbinati, E.C., 2002. Transport stress in matrinxã, *Brycon cephalus*
1044 (Teleostei: Characidae), at different densities. Aquaculture International 10, 221-
1045 229.

1046 Carneiro, P.C.F., Kaiseler, P.H.S., Swarofsky, E.A.C., Baldisserotto, B., 2009.
1047 Transport of jundiá *Rhamdia quelen* juveniles at different loading densities: water
1048 quality and blood parameters. Neotropical Ichthyology 7, 283-288.

- 1049 Case, B.C., Lewbart, G.A., Doerr, P.D., 2005. The physiological and behavioural
1050 impacts of and preference for an enriched environment in the eastern box turtle
1051 (*Terrapene carolina carolina*). *Applied Animal Behaviour Science* 92, 353-365.
- 1052 Castillo, J., Teles, M., Mackenzie, S., Tort, L., 2009. Stress-related hormones modulate
1053 cytokine expression in the head kidney of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish*
1054 *and Shellfish Immunology* 27, 493-499.
- 1055 Clauss, T.M., Dove, A.D.M., Arnold, J.E., 2008. Hematologic disorders of fish.
1056 *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice* 11, 445-462.
- 1057 Crocker, C.E., Cech, J.J., 1998. Effects of hypercapnia on blood-gas and acid-base
1058 status in the white sturgeon, *Acipenser transmontanus*. *Journal of Comparative*
1059 *Physiology B* 168, 50-60.
- 1060 Davis, A.K., Maney, D.L., Maerz, J.C., 2008. The use of leukocyte profiles to measure
1061 stress in vertebrates: a review for ecologists. *Functional Ecology* 22, 760-772.
- 1062 Dhabhar, F.S., Miller, A.H., McEwen, B.S., Spencer, R.L., 1996. Stress induced
1063 changes in blood leukocyte distribution—role of adrenal steroid hormones. *Journal*
1064 *of Immunology* 157, 1638-1644.
- 1065 Elenkov, I.J., Chrousos, G.P., 2006. Stress system-organization, physiology and
1066 immunoregulation. *Neuroimmunomodulation* 13, 257-267.
- 1067 Ellsaesser, C.F., Cle, L.W., 1986. Hematological and immunological changes in
1068 channel catfish stressed by handling and transport. *Journal of Fish Biology* 28,
1069 511-521.
- 1070 Engelsma, M.Y., Houge, S., Nap, D., Hofenkm, M., Rombout, H.W.M., van
1071 Muiwinkel, WB., Verburg-van Kemenade, B.M., 2003. Multiple acute
1072 temperature stress affects leukocyte populations and antibody responses in
1073 common carp, *Cyprinus carpio* L. *Fish and Shellfish Immunology* 15, 397-410.
- 1074 Fanouraki, E., Mylonas, C.C., Papandroulakis, N., Pavlidis, M., 2011. Species
1075 specificity in the magnitude and duration of the acute stress response in

- 1076 Mediterranean marine fish in culture. *General and Comparative Endocrinology*
1077 173, 313-322.
- 1078 Fast, M.D., Hosoya, S., Johnson, S.C., Afonso, L.O.B., 2007. Cortisol respons and
1079 immune-related effects of Atlantic salmon (*Salmo salar* Linnaeus) subjected to
1080 short- and long-term stress. *Fish and Shellfish Immunol* 24, 194-204.
- 1081 Fivelstad, S., Haavik, H., Lovik, G., Olsen, A.B., 1998. Sublethal effects and safe levels
1082 of carbon dioxide in seawater for Atlantic salmon postsmolts (*Salmo salar* L.): ion
1083 regulation and growth. *Aquaculture* 160, 305-316.
- 1084 Foss, A., Røsnes, B.A., Øiestad, V., 2003. Graded environmental hypercapnia in
1085 juvenile spotted wolffish (*Anarhichas minor* Olafsen): effects on growth, food
1086 conversion efficiency and nephrocalcinosis. *Aquaculture* 220, 607-617.
- 1087 Frank, D., Gauthier, A., Bergeron, R., 2006. Placebo-controlled double-blind
1088 clomipramine trial for the treatment of anxiety or fear in beagles during ground
1089 transport. *Canadian Veterinary Journal–Revue Veterinaire Canadienne* 47, 1102-
1090 1108.
- 1091 Gomes, L.C., 2003. Effect of fish density during transportation on stress and mortality
1092 of juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*. *Journal of the World Aquaculture*
1093 *Society* 34, 76-84.
- 1094 Gross, W.B., Siegel, H.S., 1983. Evaluation of the heterophil/lymphocyte ratio as a
1095 measure of stress in chickens. *Avian Diseases* 27, 972-979.
- 1096 Hanley, C.S., Clyde, V.L., Wallace, R.S., Paul-Murphy, J., Patterson, T.A., Keuler,
1097 N.S., Sladky, K.K., 2010. Effects of anesthesia and surgery on serial blood gas
1098 values and lactate concentrations in yellow perch (*Perca flavescens*), walleye pike
1099 (*Sander vitreus*), and koi (*Cyprinus carpio*). *Journal of the American Veterinary*
1100 *Medical Association* 236, 1104-1108.
- 1101 Harrenstien, L.A., Tornquist, S.J., Miller-Morgan, T.J., Fodness, B.G., Clifford, K.E.,
1102 2005. Evaluation of a point-of-care blood analyzer and determination of reference
1103 ranges for blood parameters in rockfish. *Journal of the American Veterinary*
1104 *Medical Association* 226, 255-265.

- 1105 Harris, J., Bird, D.J., 2000. Modulation of the fish immune system by hormones.
1106 Veterinary Immunology and Immunopathology 77, 163-76.
- 1107 Hayashi, M., Kita, J., Ishimatsu, A., 2004a. Acid-base responses to lethal aquatic
1108 hypercapnia in three marine fishes. Marine Biology 144, 153-160.
- 1109 Hayashi, M., Kita, J., Ishimatsu, A., 2004b. Comparison of the acid-base responses to
1110 CO₂ and acidification in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). Marine
1111 Pollution Bulletin 49, 1062-1065.
- 1112 Heemstra, P.C., Randall, J.E., 1993. Groupers of the world (Family Serranidae,
1113 Subfamily Epinephelinae). An annotated and illustrated catalogue of the grouper,
1114 rockcod, hind, coral grouper and lyretail species known to date. In: FAO Species
1115 Catalogue (ed.): FAO Fisheries Synopsis, Rome, pp.125.
- 1116 Heisler, N., 1993. Acid–base regulation. In: Evans, D.H. (Ed.), The Physiology of
1117 Fishes, pp. 343–378.
- 1118 Hosfeld, C.D., Engevik, A., Mollan, T., Lunde, T.M., Waagbø, R., Olsen, A.B., Breck,
1119 O., Stefansson, S., Fivelstad, S., 2008. Long-term separate and combined effects
1120 of environmental hypercapnia and hyperoxia in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)
1121 smolts. Aquaculture 280, 146-153.
- 1122 Iversen, M., Eliassen, R.A., Finstad, B., 2009. Potential benefit of clove oil sedation on
1123 animal welfare during salmon smolt, *Salmo salar* L. transport and transfer to sea.
1124 Aquaculture Research 40, 233-241.
- 1125 Jacobs, E., Vadasdi, E., Sarkozi, L., Coman, N., 1993. Analytical evaluation of i-
1126 STAT[®] portable clinical analyzer and use by nonlaboratory health-care
1127 professionals. Clinical Chemistry 39, 1069-1074.
- 1128 Kepka, M., Verburg-van Kemenade, B.M.L., Chadzinska, M., 2013. Neuroendocrine
1129 modulation of the inflammatory response in common carp: Adrenaline regulates
1130 leukocyte profile and activity. General and Comparative Endocrinology 188, 102-
1131 109.

- 1132 Kerber, C.E., Silva, H.K., dos Santos, P.A., Sanches, E.G., 2012. Reproduction and
1133 Larviculture of Dusky Grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe 1834) in Brazil.
1134 Journal of Agricultural Science and Technology B 2, 229-234.
- 1135 Khangarot, BS., Rathore, RS., Tripathi, DM., 1999. Effects of chromium on humoral
1136 and cell-mediated immune responses and host resistance to disease in a freshwater
1137 catfish, *Saccobranchus fossilis* (Bloch). Ecotoxicology and Environmental Safety
1138 43, 11-20.
- 1139 King, H.R., 2009. Fish transport in the aquaculture sector: An overview of the road
1140 transport of Atlantic salmon in Tasmania. Journal of Veterinary Behavior 4, 163-
1141 168.
- 1142 Kristensen, T., Rosseland, B.O., Kiessling, A., Djordevic, B., Massabau, J.C., 2010.
1143 Lack of arterial pO_2 down regulation in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) during
1144 long-term normoxia and hyperoxia. Fish Physiology and Biochemistry 36, 1087-
1145 1095.
- 1146 Lim, L.C., Dhert, P., Sorgeloos, P., 2003. Recent developments and improvements in
1147 ornamental fish packaging systems for air transport. Aquaculture Research 34,
1148 923-935.
- 1149 Marino, G., Mandich, A., 2001. State of the art and cultivation perspectives for the
1150 dusky grouper. In: Workshop on New Species for Aquaculture, organized by
1151 Centre of Marine Sciences (CCMAR) of the University of Algarve, 20-21
1152 November 2000, Faro, Portugal, pp. 49-52.
- 1153 Marshall, W.S., Grosell, M., 2006. Ion transport, osmoregulation, and acid-base
1154 balance. In: Evans, D.H., Claiborne, J.B., (Eds.), The Physiology of Fishes. CRC
1155 Press, Boca Raton, NY, pp. 177-230.
- 1156 Maule, AG., Shreck, CB., 1990. Changes in numbers of leukocytes in immune organs
1157 of juvenile coho salmon after acute stress or cortisol treatment. Journal of Aquatic
1158 Animal Health 2, 298-304.

- 1159 Metz, J.R., Huising, M.O., Leon, K., Verburg-van Kemenade, B.M.L., Flik, G., 2006
1160 Central and peripheral interleukin-1b and interleukin-1 receptor I expression and
1161 their role in the acute stress response of common carp, *Cyprinus carpio* L. Journal
1162 of Endocrinology 191, 25-35.
- 1163 Mommsen, T.P., Vijayan, M.M., Moon, T.W., 1999. Cortisol in teleosts: dynamics,
1164 mechanisms of action, and metabolic regulation. Reviews in Fish Biology and
1165 Fisheries 9, 211–268.
- 1166 Moran, D., Wells, R.M.G., Pether, S.J., 2008. Low stress response exhibited by juvenile
1167 yellowtail kingfish (*Seriola lalandi* Valenciennes) exposed to hypercapnic
1168 conditions associated with transportation. Aquaculture Research 39, 1399-1407.
- 1169 Noda, K., Akiyoshi, H., Aoki, M., Shimada, T., Ohashi, F., 2007. Relationship between
1170 transportation stress and polymorphonuclear cell functions of bottlenose dolphins,
1171 *Tursiops truncatus*. Journal of Veterinary Medical Science 69, 379-383.
- 1172 Oyoo-okoth, E., Cherop, L., Ngugi, C.C., Chepkirui-boit, V., Manguya-lusega, D., Ani-
1173 sabwa, J., Charo-karisa, H., 2011. Survival and physiological response of *Labeo*
1174 *victorianus* (Pisces: Cyprinidae, Boulenger 1901) juveniles to transport stress
1175 under a salinity gradient. Aquaculture 319, 226–231.
- 1176 Pankhurst, N.W., 2011. The endocrinology of stress in fish: An environmental
1177 perspective. General and Comparative Endocrinology 170, 265-275.
- 1178 Paterson, B.D., Rimmer, M.A., Meikle, G.M., Semmens, G.L., 2003. Physiological
1179 responses of the Asian sea bass, *Lates calcarifer* to water quality deterioration
1180 during simulated live transport: acidosis, red-cell swelling, and levels of ions and
1181 ammonia in the plasma. Aquaculture 218, 717-728.
- 1182 Pavlidis, M., Angellotti, L., Papandroulakis, N., Divanach, P., 2003. Evaluation of
1183 transportation procedures on water quality and fry performance in red porgy
1184 (*Pagrus pagrus*) fry. Aquaculture 218, 187-202.
- 1185 Perry, S.F., Abdallah, S., 2012. Mechanisms and consequences of carbon dioxide
1186 sensing in fish. Respiratory Physiology and Neurobiology 184, 309-315.

- 1187 Perry, S.F., Gilmour, K.M., 2006. Acid–base balance and CO₂ excretion in fish:
1188 unanswered questions and emerging models. *Respiratory Physiology and*
1189 *Neurobiology* 154, 199-215.
- 1190 Pettersen, E.F., Bjorlow, I., Hagland, T.J., Wergeland, H.I., 2005. Effect of seawater
1191 temperature on leucocyte populations in Atlantic salmon post-smolts. *Veterinary*
1192 *Immunology and Immunopathology* 106, 65-76.
- 1193 Petochi, T., Di Marco, P., Priori, A., Finoia, M.G., Mercatali, I., Marino, G., 2011.
1194 Coping strategy and stress response of European sea bass *Dicentrarchus labrax* to
1195 acute and chronic environmental hypercapnia under hyperoxic conditions.
1196 *Aquaculture* 315, 312-320.
- 1197 Pidetcha, P., Ornvichian, S., Chalachiva, S., 2000. Accuracy and precision of the i-
1198 STAT[®] portable clinical analyzer: an analytical point of view. *Journal Medical*
1199 *Association of Thailand* 83, 445-450.
- 1200 Pierre, S., Gaillard, S., Prevot-D'Alvise, N., Aubert, J., Rostaing-Capaillon, O., Leung-
1201 Tack, D., Grillasca, J., 2008. Grouper aquaculture: Asian success and
1202 Mediterranean trials. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*
1203 18, 297-308.
- 1204 Pulsford, A.L., Lemairegony, S., Tomlinson, M., Collingwood, N., Glynn, P.J., 1994.
1205 Effects of acute stress on the immune system of the dab, *Limanda limanda*.
1206 *Comparative Biochemistry and Physiology C – Pharmacology Toxicology and*
1207 *Endocrinology* 109, 129-139.
- 1208 Rimmer, M.A., 1997. Road transport of live fish. In: Rimmer, M.A., Franklin, B. (Eds.),
1209 *Development of Live Fish Transport Techniques*. Queensland Department of
1210 *Primary Industry Publication*, Brisbane, Australia, pp. 109-135.
- 1211 Stieglitz, J.D., Benetti, D.D., Serafy, E.J., 2012. Optimizing transport of live juvenile
1212 cobia (*Rachycentron canadum*): Effects of salinity and shipping biomass.
1213 *Aquaculture* 364, 293-297.

- 1214 Strickland, J.D.H., Parsons, T.R., 1972. A practical handbook of seawater analysis,
1215 Ottawa: Fishery Research Board Canada, 310.
- 1216 Tang, S., Thorarensen, H., Brauner, C.J., Wood, C.M., Farrell, A.P., 2009. Modeling
1217 the accumulation of CO₂ during high density, re-circulating transport of adult
1218 Atlantic salmon, *Salmo salar*, from observations aboard a sea-going commercial
1219 live-haul vessel. *Aquaculture* 296, 102-109.
- 1220 Taylor, E.W., 1992. Nervous control of the heart and cardiorespiratory interactions. In:
1221 Hoar, W.S., Randall, D.J, Farrell, A.P., (Eds.) *Fish Physiology*, New York:
1222 Academic Press., Volum 12, Part B, pp. 343-387.
- 1223 Treasurer, J.W., 2012. Changes in pH during transport of juvenile cod *Gadus morhua* L.
1224 and stabilization using buffering agents. *Aquaculture* 330, 92-99.
- 1225 Tsui, W.C., Chen, J.C., Cheng, S.Y., 2012. The effects of a sudden salinity change on
1226 cortisol, glucose, lactate, and osmolality levels in grouper *Epinephelus*
1227 *malabaricus*. *Fish Physiology and Biochemistry* 38, 1323-1329.
- 1228 Tufts, B.L., S.F, Perry., 1998. Carbon dioxide transport and excretion. In: Perry SF and
1229 Tufts BL (Eds.) *Fish Physiology*, Vol. 17: Fish Respiration, San Diego, CA:
1230 Academic Press, pp. 229-281.
- 1231 Urbinati, E.C., Abreu, J.S., Camargo, A.C.S., Parra, M.A.L., 2004. Loading and
1232 transport stress of juvenile matrinxã (*Brycon cephalus*, Characidae) at various
1233 densities. *Aquaculture* 229, 389-400.
- 1234 Verburg-van Kemenade, B.M.L., Van der Aa, L.M., Chadzinska, M., 2013.
1235 Neuroendocrine-immune interaction: Regulation of inflammation via G-protein
1236 coupled receptors. *General and Comparative Endocrinology* 188, 94-101.
- 1237 Wood, C.M., Jackson, E.B., 1980. Blood acid-base regulation during environmental
1238 hyperoxia in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Respiration Physiology* 42, 351-
1239 372.

- 1240 Wurts, W.A., Durborow, R.M., 1992. Interactions of pH, carbon dioxide, alkalinity and
1241 hardness in fish ponds. Southern Regional Aquaculture Center Publication 464, 1-
1242 4.
- 1243 Wojtaszek, J., Dziewulska-Szwajkowska, D., Lozinska-Gabska, M., Adamowicz, A.,
1244 Dzugaj, A., 2002. Hematological effects of high dose of cortisol on the carp
1245 (*Cyprinus carpio* L.) cortisol effect on the carp blood. General and Comparative
1246 Endocrinology 125, 176-183.
- 1247 Yada, T., Nakanishi, T., 2002. Interaction between endocrine and immune systems in
1248 fish. International Review of Cytology 220, 35-92.
- 1249

1250 **CONCLUSÕES**

1251

1252 • O transporte de juvenis da garoupa verdadeira *E. marginatus*, por 8h em
1253 densidades de estocagem a partir de 28g/L promove hipercarbia e redução do pH da
1254 água;

1255 • Juvenis da garoupa verdadeira toleram hipercarbia de até 60mgCO₂/l,
1256 empregando o sistema de tamponamento sanguíneo do bicarbonato (HCO₃⁻);

1257 • Garoupas toleram a hipercapnia causada por 8h de transporte, sob densidade de
1258 estocagem de até 64g/l, com supressão da resposta de estresse em 2h de recuperação e
1259 restabelecimento dos níveis basais de glicemia e perfil leucocitário em 24h;

1260 • Para juvenis da garoupa verdadeira, após 8h de transporte, cortisol não é um
1261 bom indicador de estresse;

1262 • A proporção entre neutrófilos e linfócitos é um bom indicador da condição de
1263 estresse após o transporte de juvenis da garoupa verdadeira, representando
1264 proporcionalmente o efeito da densidade de estocagem;

1265 • A sobrevivência total, a discreta resposta de estresse e seu reduzido tempo de
1266 recuperação, indicam que juvenis da garoupa verdadeira *Epinephelus marginatus*,
1267 transportadas a 64g/l, apresentam robustez fisiológica à hipercapnia, permitindo seu
1268 transporte em sistema fechado por até 8h.