

# Tendências evolutivas do parasito isópodo *Livoneca redmanni* Leach, 1818 (Crustacea, Isopoda, Cymothoidae) em duas espécies de peixes marinhos do Rio Grande do Norte, Brasil.

José Ticiano Arruda Ximenes de Lima<sup>1</sup>, Eudriano Florêncio dos Santos Costa<sup>2</sup>, Wallace Silva do Nascimento<sup>3</sup>, Sathyabama Chellappa<sup>3</sup>

1. BIoSTRA (Biologia, Sanidade e Tecnologia de Recursos Aquáticos), Departamento de Ciências Animais, Universidade Federal Rural do Semiárido, BR 110, Km 47, Bairro Pres. Costa e Silva, CEP 59625-900, Mossoró, Rio Grande do Norte, Brasil.

E-mail: [ticiano.ximenes@ufersa.edu.br](mailto:ticiano.ximenes@ufersa.edu.br)

2. Programa de Pós-graduação em Oceanografia Biológica, Universidade de São Paulo, Praça do Oceanográfico, São Paulo-SP, Brasil. E-mail: [eudriano@usp.br](mailto:eudriano@usp.br)

3. Departamento de Oceanografia e Limnologia, Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Avenida Salgado Filho, 3000, Lagoa Nova, Natal, Rio Grande do Norte, CEP 59.072-970 Brasil. E-mail: [wallacesnbio@hotmail.com](mailto:wallacesnbio@hotmail.com), [chellappa.sathyabama63@gmail.com](mailto:chellappa.sathyabama63@gmail.com)

**RESUMO:** O presente trabalho investigou o ciclo reprodutivo dos ectoparasitos isópodos em duas espécies de peixes marinhos *Choloroscombrus chrysurus* e *Scomberomorus brasiliensis*. Foram enfatizados os índices ecológicos parasitários, o tamanho e fecundidade dos isópodos em peixes-hospedeiros com tamanhos corporais diferentes. O isópodo *Livoneca redmanni* Leach, 1818 foi encontrado parasitando as câmaras branquiais dos hospedeiros e apresentou valores diferentes da prevalência, intensidade e abundância média para os dois hospedeiros. *S. brasiliensis* (Lt média 314,2 ± SD 97,1 mm) apresentou tamanho corporal superior em relação a *C. chrysurus* (124,2 ± 25,1 mm), disponibilizando relativamente maior espaço na câmara branquial para os parasitos. Foram registrados *L. redmanni* com tamanhos maiores (Lt média 16,3 ± SD 5,5 mm) em *S. brasiliensis* e tamanhos menores em *C. chrysurus* (10,8 ± 4,5 mm). As fêmeas dos Isópodos tiveram fecundidade relacionada positivamente com o seu tamanho corporal. Durante a época chuvosa ocorreram maiores números de isópodos fêmeas em reprodução. O tamanho corporal dos hospedeiros determina o espaço da câmara branquial, porém, não influenciou o espaço ocupado pelo isópodo, uma vez que eles ocuparam um espaço entre 35 - 36% a câmara branquial independente do tamanho corporal verificados dos hospedeiros. O isópodo *L. redmanni* mostrou uma tendência evolutiva diferente para ambos hospedeiros, onde a espécie hospedeira *C. chrysurus* teve menor tamanho corporal que o hospedeiro *S. brasiliensis*.

**Palavras-chave:** Isópodo ectoparasito, *Choloroscombrus chrysurus*, *Scomberomorus brasiliensis*, índices ecológicos parasitários.

**ABSTRACT:** Evolutionary trends of the isopod parasite *Livoneca redmanni* Leach, 1818 (Isopoda: Cymothoidae) in two marine fish species of Rio Grande do Norte, Brazil. The present study investigated the reproductive cycle of the ectoparasitic isopods in two marine fish species, *Choloroscombrus chrysurus* and *Scomberomorus brasiliensis*. Emphasis was given to ecological parasitic indices, the size and fecundity of isopods in fish-hosts of different body sizes. The isopod *Livoneca redmanni* Leach, 1818 was found parasitizing the gill chambers of the hosts and showed different values of prevalence, intensity and mean abundance for the two hosts. *S. brasiliensis* (mean Lt 31.42 ± SD 9.71 cm) had a larger body size than *C. chrysurus* (12.42 ± 2.51 cm), providing relatively more space for the parasites in the gill chamber. Big sized *L. redmanni* were registered (Lt média 16.3 ± SD 5.5 mm) on *S. brasiliensis* whereas smaller sized *L. redmanni* were observed in *C. chrysurus* (10.8 ± 4.5 mm). The fecundity of female isopods were positively related to their body size. During the rainy season many isopod females were found to be in the reproductive stage. The body size of the hosts determines the space of the gill chamber. However, it does not influence the space occupied by the isopod, since the parasites always occupied approximately 35 to 36% of the gill chamber independent of the body size of hosts. The isopod parasite *L. redmanni* showed different evolutionary trends for both hosts, wherein *C. chrysurus* had a smaller body size than *S. brasiliensis*.

**Keywords:** Isopod ectoparasite, *Choloroscombrus chrysurus*, *Scomberomorus brasiliensis*, ecological parasitic indices.

## 1. Introdução

Os isópodos Cymothoides são parasitos hermafroditas protândricos. Durante sua fase

juvenil natatória eles dispersam e fixam em peixes. Os Cymothoides habitam a cavidade bucal, câmara branquial ou o tegumento do

corpo dos peixes (THATCHER, 2006). Estes parasitos são hematofágos e completam seu ciclo de vida em um hospedeiro (ciclo holoxeno) (RAMDANE et al, 2007). Os Cymothoides Flabelifera do gênero *Livoneca* (Leach, 1818) inclui ectoparasitos que ocorrem em regiões como Gulf de Eliat no Mar Vermelho (COLORNI et al, 1997), Kuwait (MATHEWS; SAMUEL, 1987), América do Norte (BRUSCA, 1981) e Brasil (THATCHER, 2002; LIMA et al, 2005).

O hospedeiro é o habitat para os parasitos e as pequenas áreas deste hospedeiro são consideradas micro habitats (SASAL et al, 2004). O parasito e sua interação resultam em efeitos negativos no hospedeiro (PRENTER et al. 2004). O parasito e o hospedeiro apresentam co-evolução ecológica interespecífica. O parasito em geral não causa a morte do hospedeiro, porém tentar equilibrar a interação parasitária para prolongar a vida do hospedeiro (KURTZ et al, 2002).

Os peixes marinhos *Choloroscombrus chrysurus* (Linnaeus, 1766) pertence à família Carangidae, são distribuídos desde os Estados Unidos da América até a Argentina. *Scomberomorus brasiliensis* (Collette, Russo & Zavala-Camin, 1978) pertence à família Scombridae, são distribuídos no Atlântico Ocidental ao longo do Caribe e das costas atlântica da América central e do Sul (CARPENTER, 2002).

O presente trabalho investigou a estratégia reprodutiva de um ectoparasito isópodo em duas espécies de peixes marinhos, *C. chrysurus* e *S. brasiliensis*, enfatizando os índices ecológicos parasitários, o tamanho e fecundidade dos isópodos em hospedeiros com tamanhos corporais diferentes.

## 2. Material e Métodos

Entre o período de setembro de 2005 a agosto de 2006, exemplares dos peixes marinhos *C. chrysurus* e *S. brasiliensis*, foram coletados mensalmente em águas costeiras situadas entre latitudes 0°00' e 10°00'S, longitudes 32°00' e 40°00'W na região Sudoeste do Oceano Atlântico, Rio Grande do Norte, Nordeste do Brasil (Figura1).



**Figura 1.** Área de coleta dos peixes marinhos nas águas costeiras do Sudoeste do Oceano Atlântico, Rio Grande do Norte, Brasil.

Os peixes foram capturados através da pesca artesanal com uso de redes de arrasto-de-praia. Os peixes capturados foram numerados, medidos, pesados e examinados para a separação dos sexos (VAZZOLER, 1996). A taxonomia das espécies foi confirmada (CARPENTER, 2002). Os isópodos foram cuidadosamente removidos do hospedeiro, registrados, medidos e preservados em álcool a 70% (LIMA et al, 2005; THATCHER et al, 2007).

Para calcular a área das câmaras branquiais do hospedeiro foi adotado o seguinte: para *C. chrysurus*, a câmara branquial foi considerada como uma área de meio círculo para cada lado do peixe (direito e esquerdo) ( $A = \pi r^2$ ) e para *S. brasiliensis*, o triângulo retângulo para cada lado ( $A = bxh$ ), onde: h = altura, r = metade da altura e b = a base da brânquia.

Os índices ecológicos parasitários, tais como, prevalência, intensidade média e abundância média, foram calculados conforme Margolis et al (1982) e Bush et al (1997).

Os ovos do marsúpio das fêmeas isópodos fecundas, foram tirados e a fecundidade foi calculada através da contagem absoluta destes ovos.

### Análise de dados

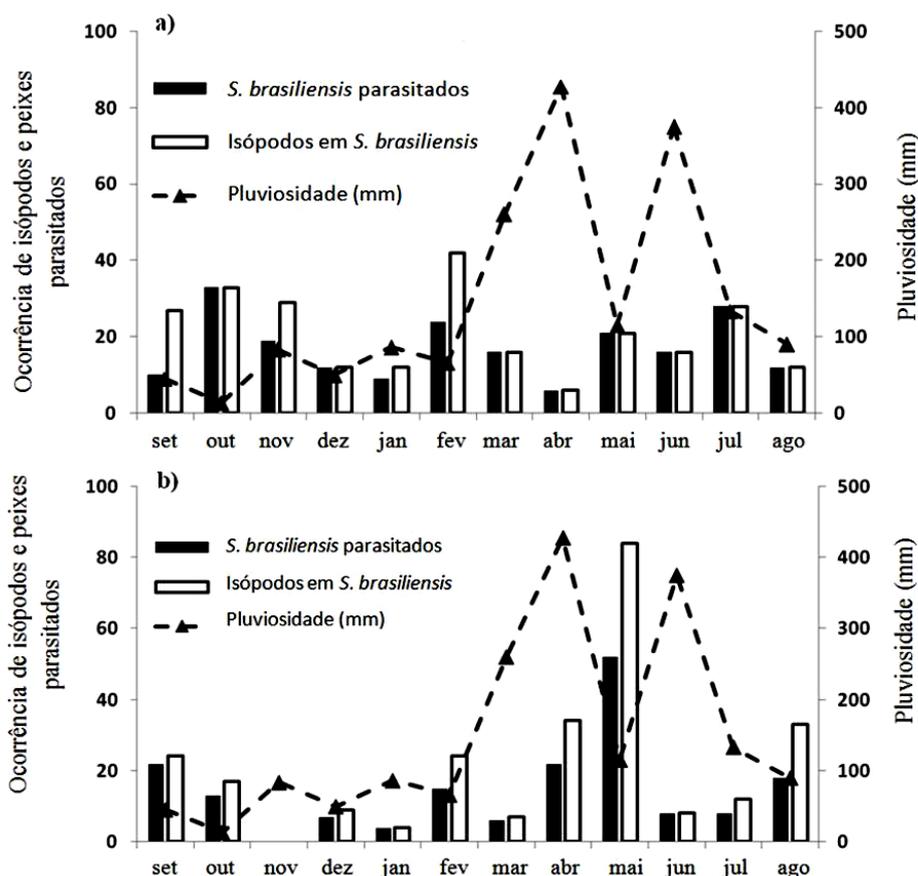
Foi realizado o teste  $\chi^2$  (Qui-quadrado,  $p \leq 0,05$ ) para testar se houve diferenças significativas na proporção entre machos e fêmeas parasitados. O tamanho do parasito e o tamanho do hospedeiro foram testados com o

teste t. A correlação entre o tamanho do isópodo e sua fecundidade foi determinada através do teste da correlação de Pearson. Os testes foram realizados com nível de significância de 5%. As análises estatísticas foram realizadas com o uso do Programa *STATISTIC 7.0*.

### 3. Resultados

O parasito isópodo *Livoneca redmanni* foi encontrado parasitando as câmaras branquiais de ambos os hospedeiros *C. chrysurus* e *S. brasiliensis*. Entre os 1258 exemplares de *C. chrysurus* capturados, 206 foram infectados por 221 isópodos *L. redmanni*. Peixes-hospedeiros

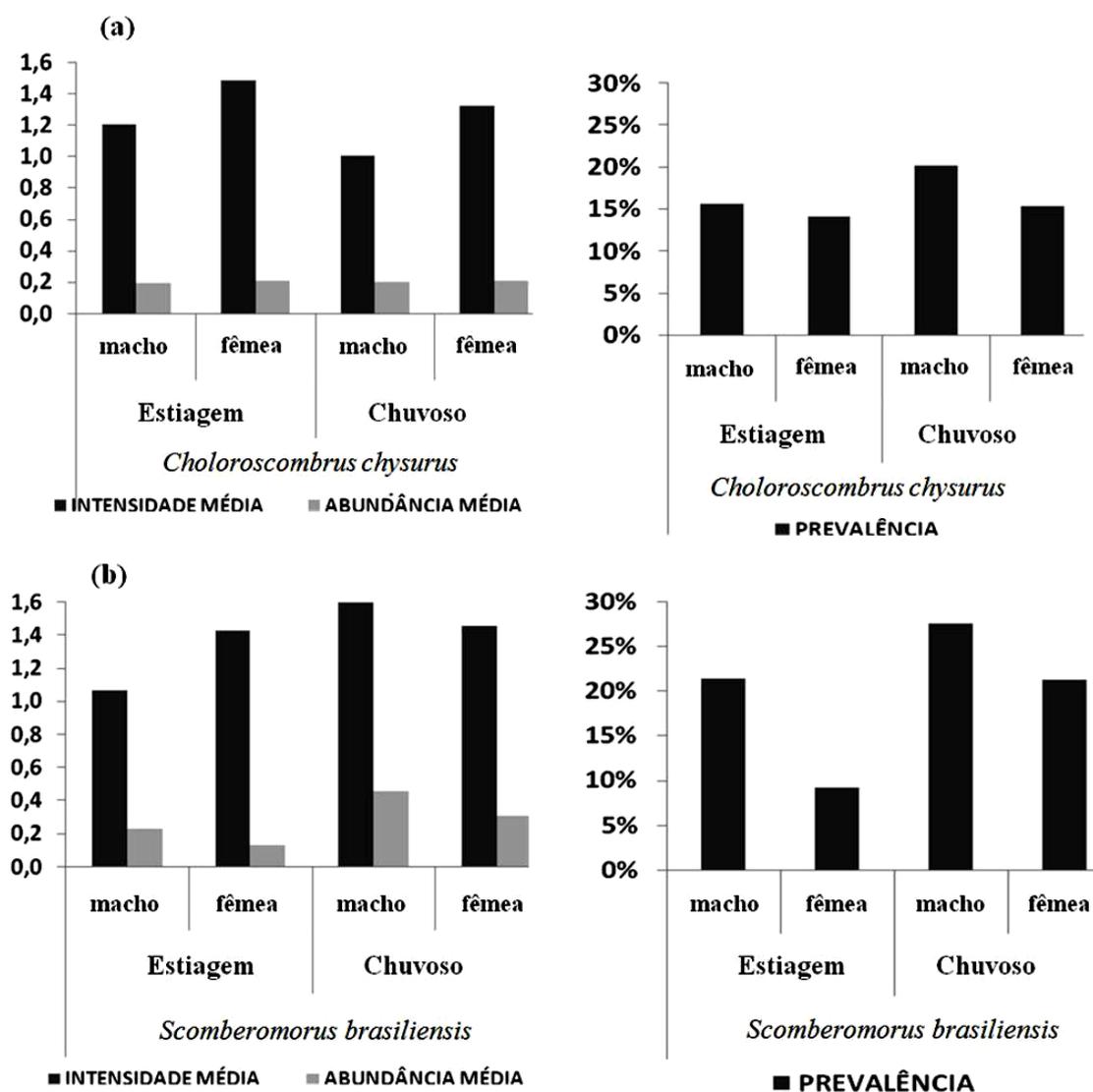
*C. chrysurus* atingiram tamanho entre 78 e 212 mm (média  $124,2 \pm SD 25,1$  mm). Foi registrado um pico de ocorrência dos isópodos no mês de fevereiro, que coincidiu com o iniciou as chuvas (Figura 2a). Os índices parasitários de *C. chrysurus* foram 16,4 % de prevalência com intensidade média de 1,1 e abundância média de 0,2. Foi observada maior prevalência no período das chuvas. Não houve diferença significativa na proporção de hospedeiros machos e fêmeas *C. chrysurus* parasitados ( $p > 0,05$ ), indicando que *L. redmanni* apresentou uma prevalência sem especificidade ao sexo deste hospedeiro (Figura 3a).



**Figura 2.** Número de isópodos e peixes capturados mensalmente em relação ao índice pluviométrico mensal da área de coleta. **a)** *Choloroscombrus chrysurus* e **b)** *Scomberomorus brasiliensis*.

De 826 exemplares de *S. brasiliensis* capturados, 175 estavam infectados com 256 *L. redmanni*. Peixes-hospedeiros *S. brasiliensis* parasitados mediram entre 160 e 525 mm ( $314,2 \pm 97,1$  mm). Os índices parasitários de *S. brasiliensis* calculados foram prevalência de 21,2%, intensidade média de 1,5 e abundância média de 0,3. Também para este hospedeiro se

observou maior prevalência no período das chuvas. Houve diferença significativa na proporção de hospedeiros machos e fêmeas *S. brasiliensis* parasitados ( $p < 0,05$ ), indicando que *L. redmanni* apresentou especificidade ao sexo macho do hospedeiro *S. brasiliensis* (Figura 2b e 3b).

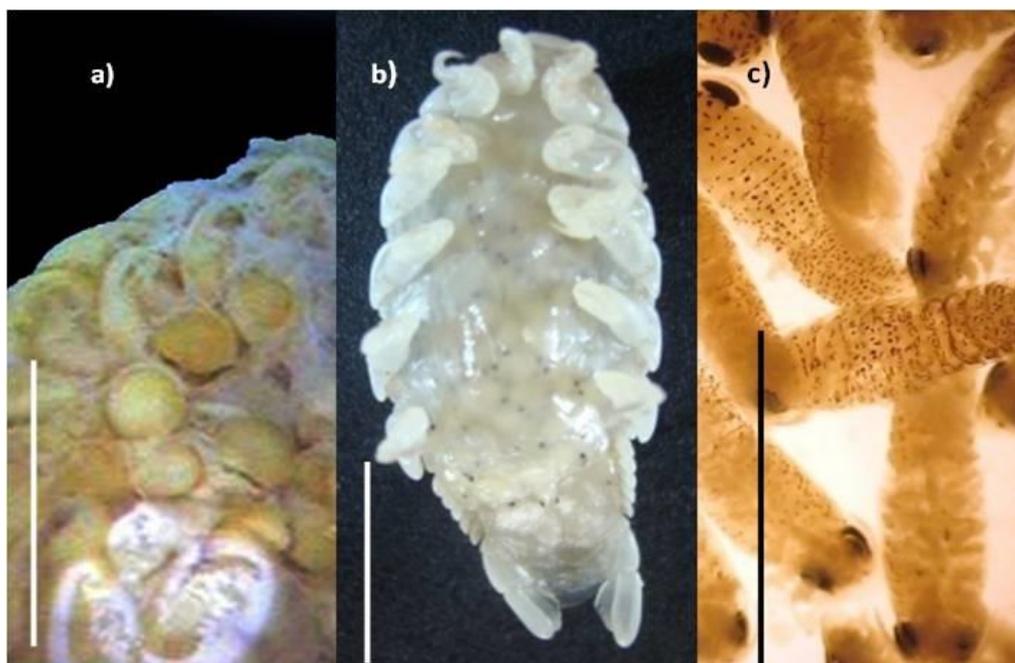


**Figura 3.** Índices parasitários dos peixes hospedeiros de macho e fêmea no período de estiagem e chuvoso: intensidade média e abundância média parasitária, e prevalência parasitária. a) *Choloroscombrus chrysurus* e b) *Scomberomorus brasiliensis*.

Os isópodos em *C. chrysurus* tiveram amplitude de tamanho corporal entre 1 e 20 mm ( $10,8 \pm 4,5$  mm). A câmara branquial de *C. chrysurus* mediu no máximo  $1254 \text{ mm}^2$ , na qual o parasito ocupou aproximadamente 35,3% ( $442 \text{ mm}^2$ ). Amplitude de tamanho de *L. redmanni* em *S. brasiliensis* variou entre 2 e 29 mm ( $16,3 \pm 5,5$  mm). A câmara branquial deste hospedeiro mediu  $6394 \text{ mm}^2$ , na qual o

parasito ocupou aproximadamente 35,6% ( $2278 \text{ mm}^2$ ).

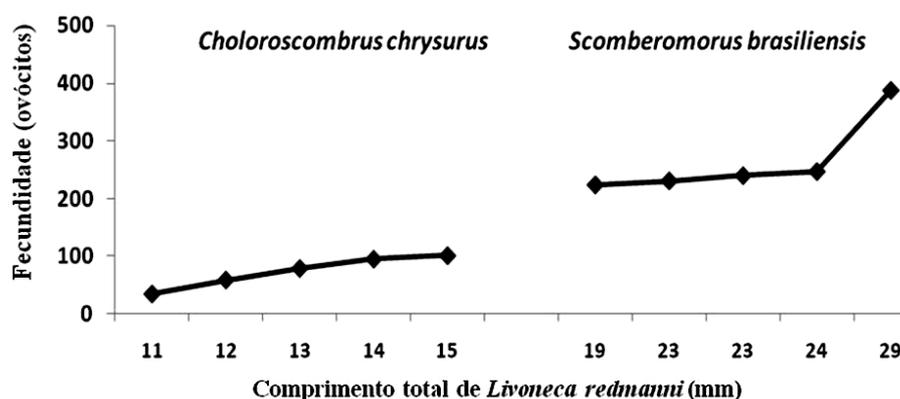
A reprodução de *L. redmanni* ocorreu durante o ano todo, no entanto, 71,43 % das fêmeas maduras com ovos ou larvas no marsúpio (Figura 4) ocorreram no período das chuvas. As larvas (manca) mediram 1 mm em *C. chrysurus* e 2 mm em *S. brasiliensis*.



**Figura 4.** Fêmeas de isópodos *Livoneca redmanni* em reprodução: a) ovos na bolsa marsupial da fêmea isópodo (escala: 5 mm); b) pontos pretos no abdômen do isópodo, são os olhos das larvas dentro do marsúpio da fêmea (escala: 5 mm) e c) detalhe das larvas extraídas do marsúpio, aptas a natação (escala: 2 mm).

Os ovos dos isópodos no marsúpio foram contados e sua fecundidade variou de acordo com o tamanho do isópodo fêmea. A fecundidade de *L. redmanni* mostrou uma correlação positiva com o tamanho do seu corpo ( $r^2 = 0,84$ ) resultando em uma

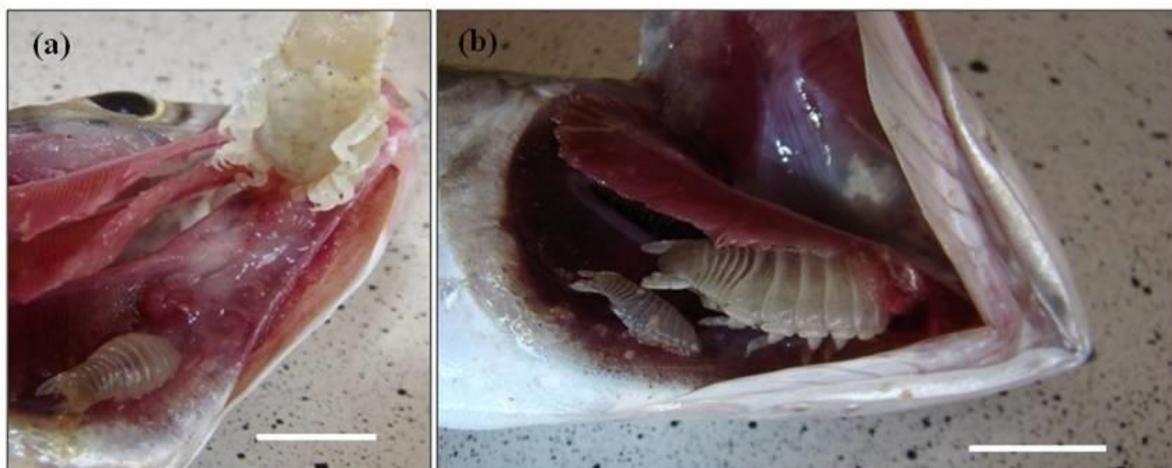
fecundidade do *L. redmanni* menor no hospedeiro *C. chrysurus* que em *S. brasiliensis*. As fêmeas de *L. redmanni* foram observadas a partir de 11 mm de tamanho em *C. chrysurus* e em *S. brasiliensis* foram identificadas as fêmeas a partir de 19 mm (Figura 5).



**Figura 5.** Fecundidade e tamanho do isópodo parasito *Livoneca redmanni*.

As garras dos parasitos isópodos são adaptações para fixação em tecidos do hospedeiro e *L. redmanni* foi encontrado fixado na musculatura mandibular do hospedeiro (Figura 6a), ocasionando macroscopicamente uma área isquêmica, e histologicamente se verifica infiltrados inflamatórios. O maior tamanho da fêmea

prejudica o desenvolvimento normal dos filamentos brânquias do hospedeiro, uma vez que foram observados filamentos branquiais atrofiados e escassos nos quatro arcos branquiais. Os machos atrofiam os filamentos brânquias do segundo ao quarto arco branquial, devido a seu tamanho (Figura 6b).



**Figura 6.** Casal de isópodos *Livoneca redmanni* na câmara branquial do hospedeiro. a) área isquêmica por fixação das garras do isopodo no tecido muscular da mandíbula; b) brânquia com filamentos atrofiados e escassos na área de fixação da fêmea do isopodo de maior tamanho (escala 10 mm).

#### 4. Discussão

O isópodo *L. redmanni* mostrou uma tendência evolutiva para ambos os hospedeiros de peixes marinhos. *L. redmanni* foi encontrado no micro habitat câmara branquial dos dois hospedeiros, ocupando no máximo 1/3 das câmaras branquiais. Os índices ecológicos parasitários de *L. redmanni* foram diferentes para as duas espécies, onde o hospedeiro de tamanho maior teve índices parasitários superior ao hospedeiro de tamanho menor. Os hospedeiros machos tiveram índices parasitários superiores aos das fêmeas, tanto no período de estiagem como no período das chuvas para ambos os sexos. Madi & Silva (2005) pesquisando o parasito Anisakidae observou índices parasitários diferentes para três espécies de peixes em um mesmo reservatório.

A espécie hospedeira *C. chrysurus* tem menor tamanho em relação ao hospedeiro *S. brasiliensis*. O isópodo *L. redmanni* desenvolveu distintamente nas duas espécies de hospedeiros, sendo maior em relação ao tamanho no hospedeiro *S. brasiliensis*. O tamanho corporal dos hospedeiros determinou o espaço das câmaras branquiais, porém não influenciou no espaço ocupado pelo isopodo, uma vez que eles ocuparam entre 35 - 36% da câmara branquial independente do tamanho corporal do hospedeiro. Verificou-se uma tendência evolutiva da espécie *L. redmanni*, que ocupou valor menor que 36% da câmara branquial, possivelmente para preservar o

equilíbrio parasito-hospedeiro. Tsai et al (2001) descrevem que o isópodo é capaz de adaptar sua estrutura corpórea de acordo com a área de exploração no hospedeiro.

A época da reprodução de *L. redmanni* ocorreu entre fevereiro a agosto, época de chuvas, coincidindo com a época da reprodução dos peixes marinhos da região. A fecundidade da espécie *L. redmanni* teve relação positiva com o tamanho do isópodo, onde o número de ovos aumentou com o tamanho do isópodo. Desta forma, a fecundidade, o tamanho dos isópodos adultos e das manca (larvas) de *L. redmanni* no hospedeiro *C. chrysurus* foi menor. Para a espécie de isopodo *Elthusa alvaradoensis*, Chávez-Lopez et al, (2005) relataram que os valores da fecundidade não teve relação com o tamanho das fêmeas.

Observou que a presença de *L. redmanni* fêmeas na câmara branquial atrofiou os filamentos branquiais dos quatro arcos branquiais, e *L. redmanni* machos atrofiou os filamentos branquiais do segundo ao quarto arco branquial. As garras causaram lesões mecânicas que deixam a área isquêmica e histologicamente com infiltrados inflamatórios na musculatura mandibular do hospedeiro. Thatcher et al (2003) e Carvallho et al (2004) observaram que o isópodo causa destruição extensa dos filamentos branquiais e que reduz a capacidade metabólica do hospedeiro.

## 5. Conclusões

O isópodo *L. redmanni* parasitou o mesmo micro habitat a câmara branquial nos dois hospedeiros, mas mostrou uma tendência evolutiva diferente para ambos hospedeiros, onde a espécie hospedeira *C. chrysurus* teve menor tamanho corporal que o hospedeiro *S. brasiliensis*. Isópodo *L. redmanni* apresentou índices parasitários maior para *S. brasiliensis* e teve tamanho maior em *S. brasiliensis* que em *C. chrysurus*.

As fêmeas dos isópodos reproduziram durante todo ano, porém, na época chuvosa teve o maior número de isópodos fêmeas em reprodução. Isópodos fêmeas de *L. redmanni* tiveram sua fecundidade relacionada positivamente com o seu tamanho corporal, tendo uma fecundidade menor em *C. chrysurus* que em *S. brasiliensis*.

O tamanho corporal do hospedeiro determina o espaço da câmara branquial, porém, não influenciou o espaço ocupado pelo isópodos, uma vez que *L. redmanni* ocupou no máximo um espaço da câmara branquial entre 35-36%, independente do tamanho corporal dos hospedeiros.

## 6. Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Brasil (CNPq) por o apoio financeiro durante o período de estudo.

## 7. Referências Bibliográficas

BRUSCA, R. C. A monograph on the Isopoda: Cymothoidae (Crustacea) of the eastern Pacific. **Zool. J. Linn. Soc.**, v. 73, p.117-199, 1981.

BUSH, A. O., LAFFERTY, K. D., LOTZ, J. M. & SHOSTAK, A. W. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. **J. Parasitol.**, v. 83, n. 4, p. 575-583, 1997.

CARPENTER, K. E. **The living marine resources of the Western Central Atlantic**. Volume 2: Bony fishes. Part 1 (Acipenseridae to Grammatidae). FAO Species Identification Guide for Fishery Purposes and American Society of Ichthyologists and Herpetologists Special Publication No. 5. Rome: FAO. p. 601-1374, 2002.

CARVALHO, L. N., ARRUDA, R. & DEL-CLARO, K. Host-parasit actions between the piranha *Pygocentrus*

nattereri (Characiformes: Characidae) and isopods and branchiurans (Crustacea) in the rio Araguaia basin, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 2, n. 2, p. 93-98, 2004.

CHÁVEZ-LÓPEZ, R., ROCHA-RAMÍREZ, A.; ÁLVAREZ, F. & WETZER, R. Elthusa Alvaradoensis Rocha-Ramírez, Chávez-López & Bruce, 2005 (Isopoda, Cymothoidae) parasitizing the inshore lizardfish, *Synodus foetens* (Linnaeus, 1766) on the continental shelf off central Veracruz, México. **Crustaceana**, v. 78, n. 7, p. 865-872, 2005.

COLORNI, A., TRILLES, J. P. & GOLANI, D. *Livoneca* sp. (Flabellifera: Cymothoidae), an isopod parasite in the oral and branchial cavities of the Red Sea silverside *Atherinomorus lacunosus* (Perciformes, Atherinidae). **Diseases of Aquatic Organisms**, n. 31, p. 65-71, 1997.

KURTZ, J., VEEN, I.T.V.D. & RYDER, J. J. Ecological immunity of arthropods – a thread of ariadne? **Trends in ecology & evolution**, v. 17, n. 05, p. 204-205, 2002.

LIMA, J. T. A. X., CHELLAPPA, S., THATCHER, V. E. *Livoneca redmanni* (Isopoda, Cymothoidae) e *Rocinela signata* Schioedte & Meinert (Isopoda, Aegidae), ectoparasitos de *Scomberomorus brasiliensis* Collette, Russo & Zavala-Camin (Osteichthyes, Scombridae) no Rio Grande do Norte, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 22, n. 4, p. 1104-1108, 2005.

MADI, R. R. & SILVA, M. S. R. DA. Contraeacum Railliet & Henry, 1912 (Nematoda, Anisakidae): o parasitismo relacionado à biologia de três espécies de peixes piscívoros no reservatório do Jaguari, SP. **Revista Brasileira de Zoociências**, v. 7, p. 15-24, 2005.

MARGOLIS, L.; ESCH, G. W., HOLMES, J. C., KURIS, A. M. & SCHAD. The use of ecological terms in parasitology (of an ad hoc committee of the American Society of Parasitologists). **Journal of Parasitology**, n. 68, p. 131-133, 1982.

MATHEWS, C. P. & SAMUEL, M. The incidence of *livoneca* sp. (isopoda) on *Helotes sexlineatus* (pisces) in Kuwait waters. **Journal of Applied Ichthyology**, v.3, n.3, p. 142-144, 1987.

PRENTER, J., MACNEIL, C., DICK, J. T. A. & DUNN, A. M. Roles of parasites in animal invasion. **Trends Ecol. Evol.** v19, n7. 2004.

RAMDANE, Z.; BENSOUILAH, M. A.; TRILLES, J. P. The Cymothoidae on marine fishes, from Algerian fauna. **Belg. J. Zool.**, v. 137, n.1, p.67-74, 2007.

SASAL, P., DESDSVISES, Y., DURIEUX, E., LENFANT, P. & ROMANS, P. Parasites in marine protected areas: success and specificity of monogeneans. **Journal of Fish Biology**, v. 64, p. 370-379, 2004.

THATCHER, V. E. . *Anphira guianensis* sp. nv. (Isopoda, Cymothoidae) from the gills of *Acnodon oligacanthus* Eigenmann (Pisces, Serrasalmidae) of French Guiana.. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 19, p. 53-59, 2002.

THATCHER, V. E., SOUZA-CONCEIÇÃO, J. M. & JOST, G. F. *Livoneca desterroensis* sp. Nov. (Isopoda, Cymothoidae) from the gills of a marine fish, *Cetengraulis edentulus* Cuvier, of Santa Catarina Island,

Brazil. **Rev. Bras. de Zoologia**, v. 20, n. 2, p. 251-255, 2003.

THATCHER, V. E. **Amazon Fish Parasites**. Pensoft Published; Sofia-Moscow. V.1, 2<sup>a</sup> ed.p.508, 2006.

THATCHER, V. E., ARAÚJO, G. S. DE., LIMA, J. T. A. X., CHELLAPPA, S. *Cymothoa spinipalpa* sp. nov. (Isopoda, Cymothoidae) a buccal cavity parasite of the marine fish, *Oligoplites saurus* (Bloch & Schneider) (Osteichthyes: Carangidae) of Rio Grande do Norte State, Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 24, p. 238-245, 2007.

TSAI, M. L.; LI, J. J & DAÍ, C.F. How host size may constrain the evolution of parasite body size and clutch size. The parasitic isopod *Ichthyoxenus fushanensis* and its host fish, *Varicorhinus bacbatulus*, as an example. **Oikos**, v. 92, p. 13-19, 2001.

VAZZOLER, A. E. A. M. **Biologia de reprodução de peixes Teleósteos: Teoria e Prática**. EDUEM, Maringá, p.169. 1996.