

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**INFLUÊNCIA DA INFECÇÃO POR
PATÓGENOS NA ESCOLHA QUÍMICA DE
PARCEIROS EM TILÁPIA-DO-NILO**

Vanessa Stramantinoli Rossi

Jaboticabal, São Paulo
2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**INFLUÊNCIA DA INFECÇÃO POR
PATÓGENOS NA ESCOLHA QUÍMICA DE
PARCEIROS EM TILÁPIA-DO-NILO**

Vanessa Stramantinoli Rossi

Orientadora: Dr^a. Percília Cardoso Giaquinto

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP – CAUNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Jaboticabal, São Paulo
2015

R833i Rossi, Vanessa Stramantinoli
Influência da infecção por patógenos na escolha química de
parceiros em tilápia-do-Nilo / Vanessa Stramantinoli Rossi. --
Jaboticabal, 2015
v, 19 f. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro
de Aquicultura, 2015
Orientadora: Percília Cardoso Giaquinto
Banca examinadora: Fábio Sabbadin Zanuzzo, Graziela Valença
da Silva
Bibliografia

1. Sinais químicos. 2. Infecção. 3. Escolha de parceiros. I. Título.
II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 639.3.034



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

REITORIA

CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

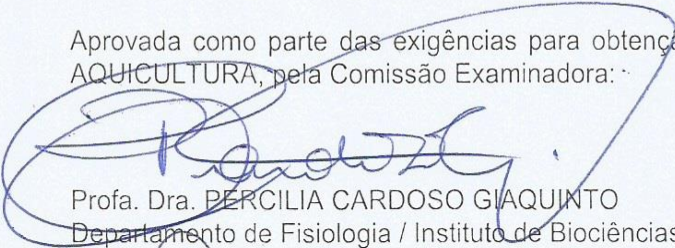
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Influência da infecção por patógenos na escolha química de parceiros em tilápia-do-Nilo

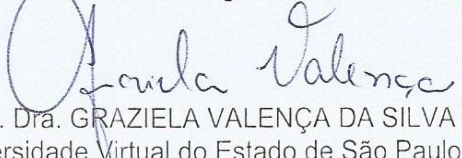
AUTORA: VANESSA STRAMANTINOLI ROSSI

ORIENTADORA: Profa. Dra. PERCILIA CARDOSO GIAQUINTO

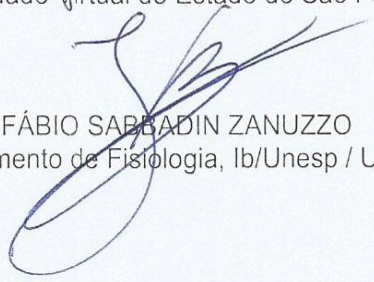
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Aqüicultura , Área:
AQUICULTURA, pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. PERCILIA CARDOSO GIAQUINTO
Departamento de Fisiologia / Instituto de Biociências de Botucatu



Profa. Dra. GRAZIELA VALENÇA DA SILVA
Universidade Virtual do Estado de São Paulo, UNIVESP/USP, Jaú-SP



Prof. Dr. FÁBIO SABBADIN ZANUZZO
Departamento de Fisiologia, Ib/Unesp / Unesp - Universidade Estadual Paulista "Julio Mesquita Filho"

Data da realização: 24 de julho de 2015.

SUMÁRIO

Dedicatória	v
Agradecimentos	6
Apoio Financeiro	7
Resumo	8
Abstract	9
Introdução	10
Material e Métodos	12
1 - Animais e condição de estoque	12
2 - Ética	12
3 - Delineamento experimental	12
3.1 - Procedimentos específicos	13
3.1.1 - Preparação do Inóculo	13
3.1.2 - Inoculação do Patógeno	13
3.1.3 - Testes de Escolha	13
3.1.4 - Análise de Dados	14
Resultados	15
Discussão	18
Referências	20

Aos peixes utilizados no estudo que, sem livre escolha, sofreram de alguma forma ou deram sua vida para que este fosse realizado.

Agradecimentos

Aos meus pais por terem me dado à vida, me criando com muito amor e carinho, apoiando as minhas decisões e me incentivando a sempre buscar e lutar pelos meus sonhos.

Aos meus irmãos que, apesar das brigas e discussões, a união e o amor que temos uns pelos outros sempre prevalecerá acima de tudo.

Ao meu companheiro Rafael pelos incentivos, lições, carinho e todo amor que sempre me proporcionou ao longo desses anos.

À Profa. Dra. Percília Cardoso Giaquinto pelos ensinamentos que contribuíram para meu crescimento profissional ao longo desses dois anos.

Aos Professores do Departamento de Comportamento e Bem-estar de peixes, Prof. Gilson, Prof. Helton e Prof. Rodrigo por estarem sempre dispostos a ajudar, seja em teoria ou em prática, acrescentando muito na minha formação.

Aos colegas de laboratório Adriana, Bruno, Clarissa, Fábio, Fernanda, Graziela, Isabela, Juliane, Marciano e Rafaela pelas risadas, conversas, ajudas e discussões intermináveis sobre a vida.

Ao técnico do departamento de Fisiologia, Tardivo, por toda assistência, esclarecimentos e boa vontade, sempre salvando nossos experimentos.

À Profa. Dra. Vera Lúcia Mores Rall e, à técnica do departamento de microbiologia do IB, Ivana Giovannetti Castilho pelos auxílios ao experimento e por toda paciência e disposição que tiveram comigo.

À Profa. Fabiana Pilarski pelo auxílio durante o experimento.

Apoio Financeiro

CNPq, bolsa de mestrado, Processo nº 130095/2014-1.

Resumo

Na seleção sexual, a escolha de parceiros é baseada nas características exibidas pelos indivíduos, como exibições de corte, tamanho do corpo, coloração, ornamentos nupciais, qualidade de território e feromônios. Em espécies das quais a fêmea é o sexo que possui maior gasto energético no cuidado da prole, é ela quem escolhe o parceiro. Tais fêmeas preferem acasalar com machos que possuem um display sexual chamativo, pois são mais saudáveis e mais resistentes a parasitas. Machos com algum tipo de doença, como por exemplo bacteriana, exibem características não atrativas visualmente, como hemorragias ao longo do corpo, despigmentação e necroses na pele. Apesar da visão ser uma importante via de transferência de informação para a escolha, a comunicação química também é utilizada amplamente para aquisição de informações relacionadas ao possível parceiro. Assim, testamos se fêmeas são capazes de perceber, por meio de pistas químicas, a presença de patógenos em machos. Para isso, transferimos água de dois aquários contendo peixes machos isolados para um aquário de escolha, contendo uma fêmea. Anteriormente aos experimentos, um dos machos foi inoculado com o patógeno e o macho controle com solução salina (veículo). A maioria fêmeas (81,25%) visitou inicialmente e em menor tempo ($p=0,007$) o compartimento com o odor de machos saudáveis. Entretanto não houve diferença no tempo de permanência total entre os compartimentos ($p=0,9348$). Concluímos que há indícios que há percepção inicial, mas ela não é consistente durante a escolha.

Palavras-chave: Sinais químicos, infecção, escolha de parceiros.

Abstract

In sexual selection, mate choice is based on the characteristics exhibited by individuals such as courtship displays, body size, coloration, bridal ornaments, quality territory and pheromones. In species in which the female is the sex that has higher energy expenditure in offspring care, it chooses the partner. Studies show that females prefer to mate with males that have a showy sexual display because they are healthier and more resistant to parasites. Males with some kind of disease exhibit unattractive display such as bleeding throughout the body, depigmentation and skin necrosis. Despite the vision to be an important means of information transfer for choice, chemical communication is also widely used to acquire information related to fitness and status of potential partners. This study tested whether females are able to perceive, through chemical cues, the presence of pathogens in males, choosing free pathogens mates. Thus, we transfer water from two aquariums containing isolated male fish to an aquarium of choice, containing a female. Prior to the experiments, one of males were inoculated with bacterium and the control male with saline solution (vehicle). Most females (81.25%) visited faster ($p=0.007$) the compartment with the odor of healthy males. However there was no difference in the time of total stay between compartments ($p = 0.9348$). We conclude that there is evidence that there are initial perception, but it does not hold for the choice.

Key-words: Chemical signals, infection, mate choice.

Introdução

Na seleção sexual, segundo Darwin (1896), machos e fêmeas escolhem seus parceiros com base em características associadas ao aumento do “fitness” individual. Barbosa & Magurran (2006) explicam que as características associadas ao aumento do número de prole ou ao aumento das chances de sobrevivência da prole, aumentam o sucesso reprodutivo da espécie.

A contribuição genética de machos e fêmeas ocorre de forma igualitária para sua prole, de acordo com a lei fundamental da genética (Alberts *et al.*, 2009). Entretanto, o gasto energético da fêmea no investimento parental é bem maior que o do macho, sendo assim, é a fêmea quem escolhe seu parceiro, já modulando o “fitness” da sua prole (Trivers, 1974). A escolha da fêmea pode ser muito influenciada pelas características sexuais apresentadas pelos machos (Noonan, 1983). Tais características podem incluir as exibições de corte, coloração, tamanho do corpo, ornamentos nupciais, qualidade de território e até mesmo feromônios (Asensio *et al.*, 2008).

Diversas espécies de peixes usam o odor para discriminar indivíduos coespecíficos e heteroespecíficos e até para se comunicarem entre si (McKinnon & Liley, 1987; Strecker & Kodric-Brown, 1999). Karlson & Luscher (1959) nomearam como “feromônios” tais agentes de comunicação, definindo-os como substâncias que são secretadas por um indivíduo e recebidas por um outro indivíduo da mesma espécie, resultando em uma reação específica, como um determinado comportamento. A maioria dos “sistemas de feromônios” foram estudados em insetos, entretanto, também há implicações em vários aspectos do comportamento de peixes, incluindo formação de território, de cardumes, pareamento e reprodução (Solomon, 1977).

Em várias espécies de peixes os sinais químicos são importantes apenas nos primeiros dias de vida (Giaquinto & Volpato, 1997). Foi relatado por Solomon (1977) que em algumas espécies de ciclídeos, os pais reconhecem sua prole apenas nos três primeiros dias de vida através de sinais químicos. A comunicação química é uma via importante para a reprodução em ciclídeos (Stacey, 2003) e em muitas outras espécies de animais há uma dependência desses sinais para atrair parceiros (Agosta, 1992). Em tilápia-do-Nilo, a comunicação química

permite que a fêmea reconheça o estado nutricional do macho, escolhendo como parceiro reprodutivo os melhores nutridos (Giaquinto, 2010). Tais estudos mostram a grande capacidade de distinção por meio de comunicação química.

Os sinais químicos emitidos por machos podem ainda advertir sobre a qualidade genética dos possíveis parceiros (Coblentz, 1976). Kavaliers *et al.* (2003) mostra que fêmeas de camundongos são capazes de reconhecer, através do odor da urina, a presença de parasitas em machos da mesma espécie e isso afeta a escolha de parceiros, selecionando preferencialmente machos sem patógenos.

Segundo Charnov (2001), a presença de doenças causadas por parasitas ou patógenos nos peixes tem um efeito direto na fecundidade, fertilidade, crescimento e mortalidade dos mesmos. Isso poderia alterar o odor de machos com fêmeas escolhendo indivíduos saudáveis. Além disso, em peixes, a doença bacteriana é transmitida horizontalmente a partir das excretas ou lesões da pele (Aoki, 1999) e isso poderia afetar na escolha de parceiros através de pistas químicas. Portanto, neste estudo testamos se a fêmea de tilápia-do-Nilo consegue perceber, através de pistas químicas, a presença de patógenos em machos, evitando-os ou escolhendo preferencialmente machos saudáveis. Segundo Penn & Potts (1998) as fêmeas que evitariam machos infectados, reduziriam as chances de contrair doenças, obter maior investimento parental e ainda aumentar a resistência da sua prole a patógenos.

Para testar se a fêmea é capaz de tal percepção, utilizamos a tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), que é a espécie de ciclídeo mais cultivada no Brasil, cujos machos que estabelecem territórios, constroem ninhos e cortejam as fêmeas possuem maiores chances de escolha pelas mesmas (Gonçalves-de-Freitas & Nishida, 1998). Além disso, a tilápia-do-Nilo é uma espécie que não possui dimorfismo sexual entre machos e fêmeas e, para a escolha de parceiros, o sinal químico poderia ter maior importância quando comparado ao sinal visual. O patógeno utilizado foi a bactéria *Aeromonas hydrophila*, da qual tal gênero é um dos principais agentes com potencial patogênico que causam perdas consideráveis em pisciculturas (Lee *et al.*, 1997). É causadora da septicemia hemorrágica bacteriana e os sinais clínicos podem variar de pequenas lesões ao

longo do corpo a úlceras internas ou externas com exposição da musculatura e alterações no comportamento (Aoki, 1999).

Material e Métodos

1 - Animais e condição de estoque

Adultos de tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*, provenientes de piscicultura, permaneceram em tanques de 500 L; 6 peixes/L antes dos procedimentos experimentais. Mantemos machos e fêmeas em tanques separados, com aeração contínua, biofiltros, tubos de PVC usados como tocas pelos animais, temperatura (28-30° C) e o fotoperíodo (12C:12E) constantes e níveis de nitrito e amônia mantidos abaixo de 0,05 mg/L e 0,5 mg/L, respectivamente, para manutenção da qualidade da água. Alimentamos os peixes uma vez ao dia (3% de biomassa) com ração extrusada para peixes tropicais.

2 - Ética

O protocolo para experimentos com uso de animais nº 712 foi aprovado com finalidade de pesquisa pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), do Instituto de Biociências da Unesp de Botucatu.

3 - Delineamento experimental

A estratégia para testar se há percepção da presença de patógeno através da escolha química consistiu em transferir água de dois aquários contendo peixes machos isolados para um aquário de escolha, contendo uma fêmea. Para isso, isolamos 32 machos ($26,1 \pm 5,5$ g; $10,1 \pm 2,3$ cm) e 16 fêmeas ($26,1 \pm 4$ g; $9,7 \pm 0,6$ cm) ($\pm dp$) em aquários individuais (40 x 20 x 25 cm). Após 24 h de aclimação injetamos, intraperitonealmente, em metade dos machos, concentrações bacterianas vivas e, na outra metade, a solução salina, retornando-os, em seguida, em seus respectivos aquários. Dispusemos machos infectados com *A. hydrophila* e não infectados de forma aleatória para evitar que houvesse resultados tendenciosos de preferência pelo lado direito ou esquerdo pela fêmea. Após 72 h transferimos as fêmeas para os aquários de escolha em que realizamos os testes de escolha.

3.1 - Procedimentos específicos

3.1.1 - Preparação do Inóculo

Utilizamos como patógeno a bactéria *Aeromonas hydrophila*, que é responsável por causar uma das doenças bacterianas mais comuns em peixes de água doce (Noga, 2000). A cepa utilizada foi a A114, isolada de Pintado (*Pseudoplatystoma* sp.)

Semeamos a cepa em placa de Petri contendo meio de cultura TSA. Em seguida foi semeada uma colônia da bactéria no meio de cultura caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) e foi incubada a 28° C por 18 horas. Após o crescimento, a cultura foi diluída em série até a concentração de 10⁸ UFC/mL de acordo com a escala de Macfarland, sendo semeadas em TSA para contagem total de unidades formadoras de colônia (UFC) do inóculo para confirmação da concentração.

3.1.2 - Inoculação do Patógeno

Previamente a infecção anestesiávamos os peixes machos com uma solução de benzocaína a uma concentração de 80 mg/L. Após isso, inoculamos, intraperitonealmente no peixe, uma dose de 5 µL/g de uma concentração bacteriana de 10⁸ UFC (unidades formadoras de colônias) por mL de solução salina pura (0,65%). Segundo Oliveira *et al.* (2013), essa concentração é suficiente para que ocorra a infecção e aparecimento de alguns sinais clínicos. Apesar disso, realizamos testes prévios para confirmar o surgimento de sinais clínicos para o experimento. Como controle inoculamos nos outros machos a mesma dose de solução salina pura.

3.1.3 - Testes de Escolha

O teste de escolha foi realizado por meio de dois aquários doadores, com os machos e um aquário receptor com a fêmea (Figura 1). Os testes de escolha foram feitos em aquários de 60 x 60 x 30 cm, divididos verticalmente em três partes iguais por duas placas acrílicas opacas contendo passagens que permitiam a fêmea visitar todos os compartimentos. Em um primeiro momento, a fêmea se encontrava no compartimento central, o qual permanecia fechado por 30 minutos. Após isso, as portas das placas acrílicas eram levantadas por um sistema de roldanas controlado à distância de 2 metros do aquário teste. Cada par de aquário

doador possuía um sistema de transferência de água localizado no canto do aquário, que escoava a água do aquário doador para o aquário teste por gravidade. Os aquários doadores estavam localizados acima do aquário teste em que auxiliavam no fluxo do estímulo até o aquário teste. O sistema de transferência de água consistiu em um tubo de silicone de 2.5 mm de diâmetro que saía do aquário doador e chegava até abaixo da linha da água no aquário teste. Uma válvula acoplada a cada tubo permitiu o controle do fluxo em 6 ml/min. Um teste realizado com corante mostrou que a água leva 10 min para se misturar com os três compartimentos. Observamos as variáveis: (1) número de compartimentos visitados primeiramente; (2) latência: tempo para o primeiro movimento da fêmea após o início do fluxo de água; (3) tempo total de permanência das fêmeas em cada compartimento. As fêmeas que não responderam em até 300 segundos ou que visitaram apenas um compartimento foram descartadas das análises.

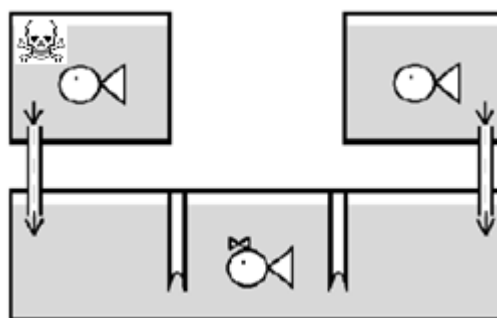


Fig. 1: Teste de escolha (sistema de transferência de água). Caveira – macho infectado pelo patógeno *Aeromonas hydrophila*.

3.1.4 - Análise de Dados

Os dados de frequência (1) foram testados através do teste de proporção de Goodman (Goodman, 1965). Os demais (2 e 3) dados foram inicialmente testados quanto à normalidade (Kolmogorov-Smirnov) e homocedasticidade (Levene) para escolhermos os testes estatísticos adequados para cada variável. Os dados de latência foram não-paramétricos e, comparamos as variáveis através do teste de Wilcoxon. Já o tempo total de permanência foi normal e homocedástico e então, foi comparado entre compartimentos por Teste t pareado. Sempre consideramos $\alpha=0,05$.

Resultados

Os peixes infectados com *Aeromonas hydrophila* apresentaram após 24 h da inoculação sinais clínicos como perda de apetite e “apatia” (diminuição da atividade). Após 48 h da inoculação, já apresentaram lesões iniciais na pele, como leve descamação cutânea. Já os peixes inoculados com solução salina não apresentaram sinais clínicos.

Houve diferença entre o número de fêmeas que visitaram primeiramente um dos dois compartimentos: 81,25% (n=13) das fêmeas visitaram primeiro o compartimento com odor de machos não infectados e, 18,75% (n=3) de infectados (figura 2). Além disso, também houve diferença estatística entre a latência das fêmeas para visitar os compartimentos de odor de machos infectados e não infectados ($p=0,007$) (figura 3). Apesar disso, não houve diferença entre os tempos de permanência total das fêmeas entre compartimentos, com $p=0,9348$ (figura 4).

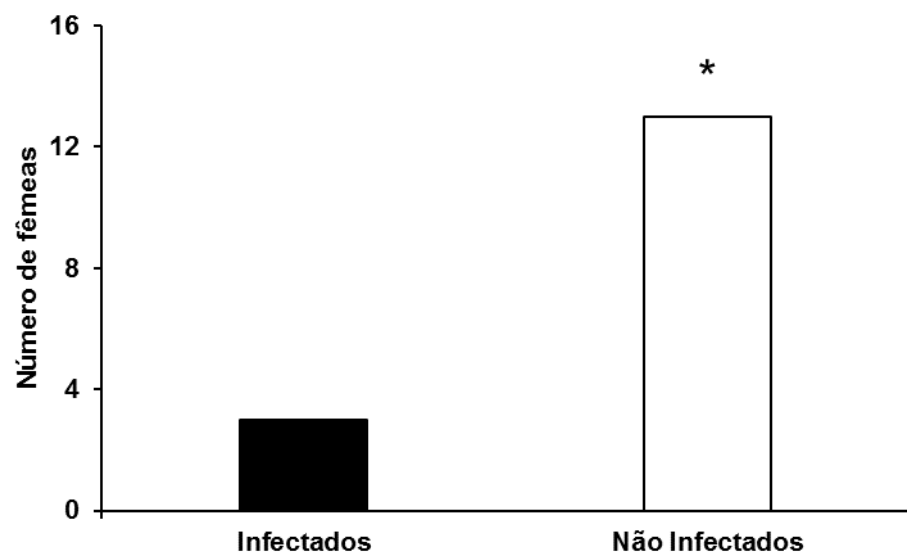


Figura 2 – Número de fêmeas que visitaram primeiro um dos dois compartimentos. N = 3 e 13, respectivamente. Asterisco indica diferença (Teste de Goodman, $p < 0,005$).

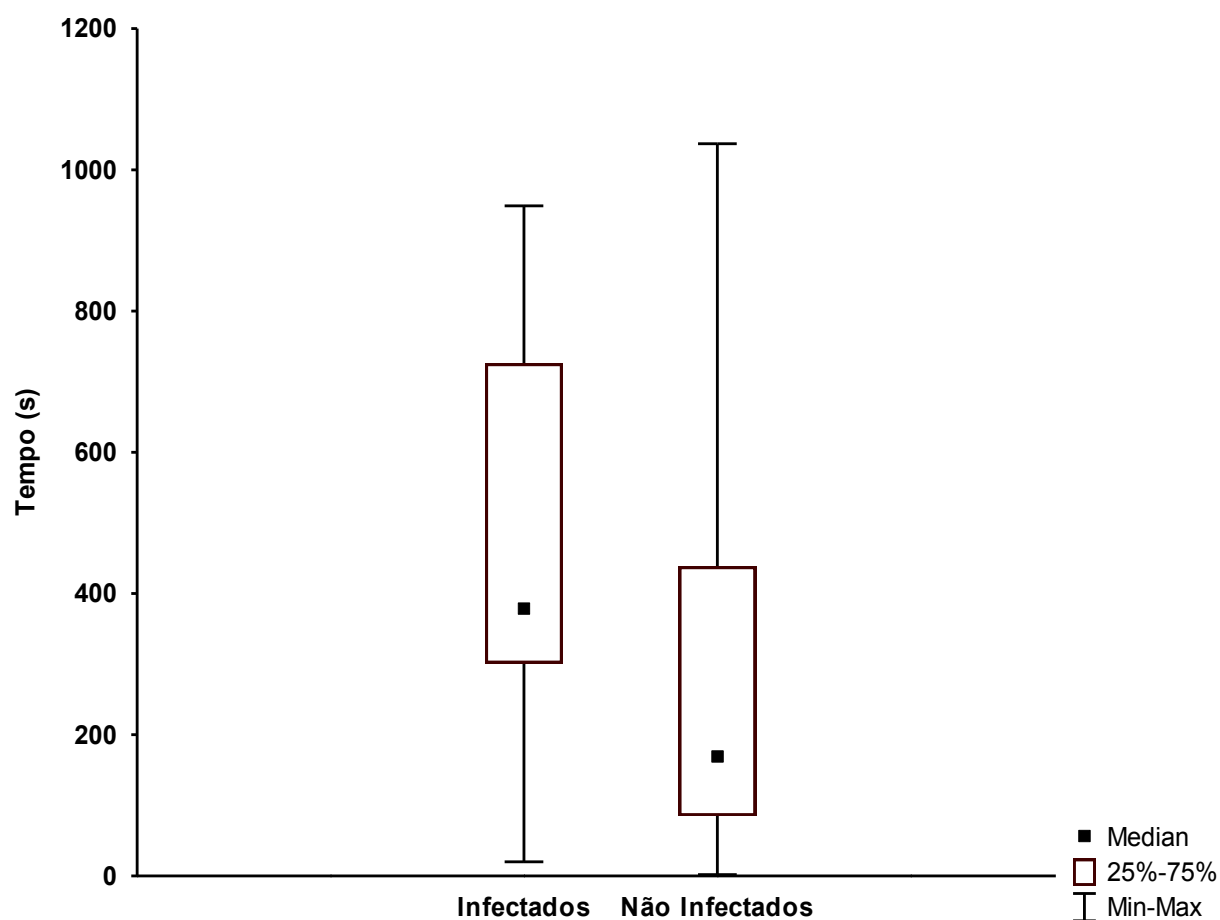


Figura 3 – Tempo para a primeira visita das fêmeas em cada compartimento. N=16. Valores mínimos, primeiros quartis, medianas (segundos quartis), terceiros quartis e valores máximos. Houve diferença estatística (Teste de Wilcoxon, $p = 0,007$).

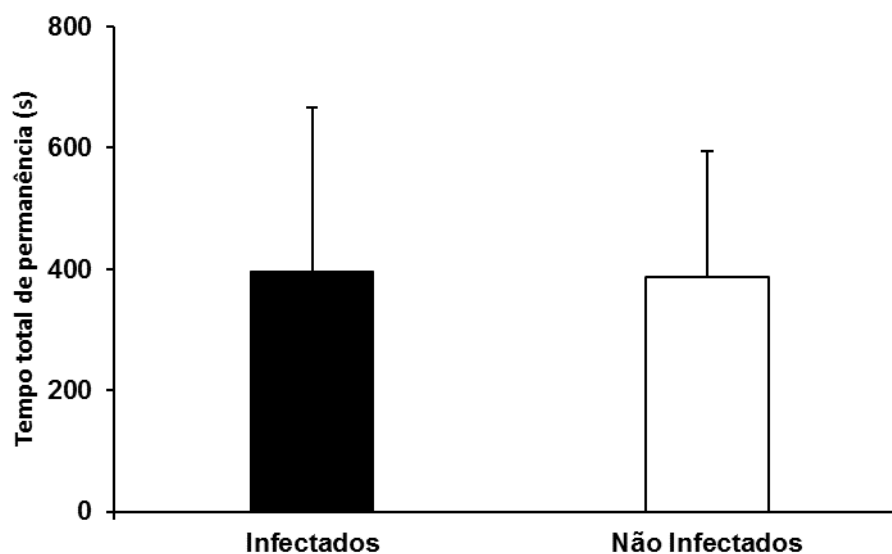


Figura 4 – Tempo total de permanência das fêmeas em cada compartimento. N=16. Dados médios ($\pm dp$). Não houve diferença entre os tempos (Teste t pareado, $p = 0,9348$).

Discussão

Este é o primeiro estudo que testou a percepção de infecção por patógeno entre coespecíficos através de sinais químicos em peixes, baseando-se na escolha da fêmea, ou seja, considerando a escolha por pistas químicas de machos infectados com a bactéria *Aeromonas hydrophila* e machos saudáveis. Nossos resultados sugerem que a pista química não é suficiente para que a fêmea perceba a condição de infecção a ponto de evitar o macho, entretanto, há indícios que há percepção inicial, mas ela não é consistente durante a escolha.

As fêmeas analisadas visitaram os dois compartimentos e, portanto, entende-se que perceberam odores de ambos os machos. Além disso, a maioria das fêmeas visitou primeiro e em menor tempo o compartimento com odor de machos saudáveis. Isso nos dá indícios de que o odor pode ser alterado pela infecção, tornando os machos saudáveis mais atrativos inicialmente. Essa escolha inicial pode ter ocorrido pelo fato da água dos dois compartimentos se misturarem rapidamente. A escolha poderia se efetivar, ao longo do tempo, caso essa mistura fosse mais tardia. Em diversas espécies de vertebrados, como por exemplo em aves (Hamilton & Zuk, 1982), uma infecção parasitária intervém nas pistas emitidas, influenciando a escolha de parceiros, com fêmeas escolhendo preferencialmente machos livre de patógenos ou que sejam resistentes aos mesmos (Read, 1990; Clayton, 1991; Zuk, 1992). Em roedores a urina e outras pistas químicas são importantes para a escolha de parceiro. Kavaliers & Colwell (1995) mostraram que fêmeas de roedores passaram menos tempo investigando odores de camundongos machos infectados por patógeno do que não infectados.

A escolha em peixes, como em outros vertebrados, pode envolver múltiplas pistas, como a visual mais a química (Candolin, 2003). Em algumas aves o sinal visual possui grande importância na decisão de escolha, já que percebem sinais visuais de infecção e, consequentemente evitam coespecíficos (Hamilton & Zuk, 1982). O comportamento de evitar interações com indivíduos com odores associados a infecções (*sickness avoidance*) possui importância evolutiva na questão de evitar possíveis contaminações (Thomas et al. 2005), já que o passo inicial para evitar um patógeno é a identificação da “ameaça”. Na tilápia-do-Nilo, talvez os sinais visuais assumam maior importância (que os sinais químicos) na

identificação de sinais clínicos, por ser uma espécie diurna. Neste estudo os animais apresentaram descamação, despigmentação e alteração do comportamento, como baixa atividade e diminuição de apetite. Em geral, os sinais clínicos podem variar de lesões de pele superficiais, como descamação da pele ou profundas com exposição do tecido muscular. Podem se apresentar como áreas de hemorragia, necrose de extensão variada e progredir para úlceras. Nos quadros de infecção sistêmica, é observada a exoftalmia, abdômen distendido, contendo líquido de aspecto opaco e/ou ligeiramente sanguinolento (Kubtiza & Kubtiza, 2004).

Neste experimento a doença bacteriana se manifestou com sinais clínicos superficiais, em menores proporções. Apesar disso, seria evolutivamente importante que os peixes percebessem estes sinais químicos iniciais, ou superficiais de infecção para evitar contaminação e, dessa forma, preservar seu *fitness*, gerando uma prole saudável.

No entanto, a fêmea poderia identificar a doença mas escolhe correr o risco e se acasalar também com machos infectados. Zala et al. (2015) mostraram que fêmeas de camundongos são capazes de discriminar machos infectados de não infectados, preferindo machos saudáveis, entretanto, elas não evitam acasalar com os machos infectados. Além disso, uma segunda exposição ao odor de machos infectados poderia ser testada. James et al. (2008) mostraram que o peixe *Pimephales promelas* aprendeu a reconhecer e evitar o risco de parasitismo após o segundo contato com o odor de cercaria, que parasita a espécie.

Por fim, concluímos que as pistas químicas são suficientes para que fêmeas evitem inicialmente parceiros infectados por patógeno na tilápia-do-Nilo. As pistas visuais parecem assumir grande importância no processo de escolha, pela evidência dos sinais clínicos associados a doenças.

Referências

- Agosta, W.C. Chemical Communication: The Language of Pheromones, *Scientif. Americ. Lib.*, (1992).
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. *Biologia Molecular da Célula*. 5 ed. Porto Alegre: Artmed. p 1396 (2009).
- Aoki, T. Motile Aeromonads (*Aeromonas hydrophila*). In: Woo, P. T. K. & Bruno, D. W. *Fish Dis. Diso.*, **3**, 427-453 (1999).
- Asensio, N., Korstjens, A. H., Schaffner, C. M. & Aureli, F. Intragroup aggression, fission-fusion dynamics and feeding competition in spider monkeys. *Behaviour*, **145**, 983–1001 (2008).
- Babosa, M. & Magurran, A. E. Female mating decisions: maximizing fitness? *J. of Fish Biol.*, **68**, 1636–1661 (2006).
- Candolin, U. The use of multiple cues in mate choice. *Biol. Rev.*, **78**, 575–595 (2003).
- Candolin U. & Wong B. B. M. Mate choice. In: Maghagen C, Braithwaite V, Forsgren E, Kapoor BG (Editors), *Fish behaviour*. New Hampshire: Science Publishers; p 337-376 (2008).
- Castro, A. L. S., Gonçalves-de-Freitas, E., Volpato, G. L. & Oliveira, C. Visual communication stimulates reproduction in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **42**, 368-374 (2009).
- Charnov, E. L. Reproductive efficiencies in the evolution of life histories. *Evol. Ecol. Res.*, **3**, 873–876 (2001).
- Clayton, D. H. The influence of parasites on host sexual selection. *Parasitol. Today*, **7**, 329-334 (1991).
- Coblentz, B. E. Functions of scent-urination in ungulates with special reference to feral goats (*Capra hircus* L.). *The Americ. Natural.*, **110**, 549-557 (1976).

Coopersmith, C. B. & Lenington, S. Female preferences based on male quality in house mice: interactions between male dominance rank and t-complex genotype. *Ethology*, **90**, 1-16 (1992).

Darwin, C. (1896). *The Descent of Man and Selection in Relation to Sex*. New York: Appleton.

Drickamer, L. C. Odor preferences of wild stock female house mice (*Musdomesticus*) tested at three ages using urine and other cues from conspecific males and females. *J. chem. Ecol.*, **15**, 1971-1987 (1987).

Giaquinto, P. C., Berbert, C. M. S., Delicio, H. C. Female preferences based on male nutritional chemical traits. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, **64**, 1029-1035 (2010).

Giaquinto P. C. Female pintado catfish choose well-fed males. *Behaviour.*, **147**, 319–332. (2010).

Giaquinto, P. C. & Volpato G. L. Chemical communication, aggression and conspecific recognition in the fish Nile tilapia. *Physiol. & Behav.*, **62**, 1333–1338 (1997).

Gonçalves-de-freitas, E. & Nishida, S. M. Sneaking behaviour of the Nile tilapia. *Bolet. Téc. do Cepta.*, **11**, 71-79 (1998).

Goodman, L. A. On simultaneous confidence intervals for multinomial proportions. *Americ. Statist. Assoc. and Americ. Soc. for Qual.*, **7**, 247-254 (1965).

Hamilton, W. D. & Zuk, M. Heritable true fitness and bright birds: a role for parasites. *Science*, **218**, 384-387 (1982).

Huck, U. V. & Banks, E. M. Differential attraction of females to dominant males: olfactory discrimination and mating preference in the brown lemming (*Lemmus trimucronatus*). *Behav. Ecol. Sociobiol.*, **11**, 217-222 (1982).

James, C. T., Noyes, K. J., Stumbo, A. D., Wisenden, B. D. & Goater, C. P. Cost of exposure to trematode cercariae and learned recognition and avoidance of parasitism risk by fathead minnows *Pimephales promelas*. *J. of Fish Biol.*, **73**, 2238–2248 (2008).

- Karlson, P. & Luscher, M. Pheromones: a new term for a class of biologically active substances. *Nature*, **183**, 55–56 (1959).
- Kavaliers, M. & Colwell, D. Odours of parasitized males induce aversive responses in female mice. *Anim. Behav.*, **50**, 1161–1169 (1995).
- Kavaliers, M., Colwell, D. D., Braun, W. J. & Choleris, E. Brief exposure to the odour of a parasitized male alters the subsequent mate odour responses of female mice. *Anim. Behav.*, **65**, 59–68 (2003).
- Kubitza, F. & Kubitza, L. M. M. Principais parasitoses e doenças dos peixes cultivados. 4. ed. Jundiá (SP), 118p (2004).
- Lee, S. Y., Yin, Z., GE, R. & Sin, Y. M. Isolation and characterization of fish *Aeromonas hydrophila* adhesins important for in vitro epithelial cell invasion. *J. Fish Dis.*, **120**, 169–175 (1997).
- Lenington, S. Social preferences for partners carrying ‘good genes’ in wild house mice. *Anim. Behav.*, **31**, 325–333 (1983).
- Martins, M. L., Myiazaki, D. M. Y., Tavaes-Dias, M., Fenerick Jr., J., Onaka, E. M., Bozzo, F. R., Fujimoto, R. Y. & Moraes, F. R. Characterization of the acute inflammatory response in the hybrid tambacu (*Piaractus mesopotamicus* male × *Colossoma macropomum* female) (Osteichthyes). *Braz. J. Biol.*, **69**, 957–962 (2009).
- McKinnon J. S. & Liley N. R. Asymmetric species specificity in responses to female sexual pheromone by males of two species of *Trichogaster* (Pisces: Belontiidae). *Can. J. Zool.*, **65**, 1129–1134 (1987).
- Milinski, M., & Bakker, T.C.M. Female sticklebacks use male coloration in mate choice and hence avoid parasitized males. *Nature*, **344**, 330–333 (1990).
- Noga, E. J. Fish disease diagnosis and treatment. Ames: Blackwell, 367p (2000).
- Noonan, K. C. Female mate choice in the cichlid fish *Cichlasoma nigrofasciatum*. *Anim. Behav.*, **31**, 1005–1010 (1983).

- Oliveira, S. T. L., Veneroni-Gouveia, G., Santurio, J. M. & Costa, M. M. *Aeromonas hydrophila* in tilapia (*Oreochromis niloticus*) after the intake of aflatoxins. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, **80**, 400-406 (2013).
- Pavanelli, G. C., Eiras, J. C. & Takemoto, R. M. Doenças de Peixes: Profilaxia, Diagnóstico e Tratamento. 1. ed., Maringá, Nupelia, 261p (1998).
- Penn, D. & Potts, W. K. Chemical signals and parasite-mediated sexual selection. *Trend. in Ecol. & Evol.*, **13**, 391–396 (1998).
- Read, A. F. Parasites and the evolution of host sexual behaviour. *Parasit. and Host Behav.* (Ed. by C. J. Barnard & J. M. Behnke), 117-157. London: Taylor & Francis (1990).
- Rey, E. G, Gonzalez, M. A., Rico, L, Bruscher, D. & Delgado, M. Human adult stem cells derived from adipose tissue protect against experimental colitis and sepsis. *Gut On. First*. Published on january 9, as 10.1136/gut.2008.168534 (2009).
- Rutte, C., Taborsky, M. & Brinkhof, M. W. G. What sets the odds of winning and losing? *Trends. Ecol. Evol.*, **21**, 16–21 (2006).
- Stacey N. Hormones, pheromones and reproductive behavior. *Fish. Physiol. Biochem.*, **28**, 229-235 (2003).
- Strecker U. & Kodric-Brown A. Mate recognition systems in a species lock of Mexican pupfish. *J. Evol. Biol.*, **12**, 927–935 (1999).
- Solomon, D. J. A review of chemical communication in freshwater fish. *J. of Fish Biol.*, **11**, 363–376 (1977).
- Thomas, F., Adamo, S., Moore, J. Parasitic manipulation where are we and where should we go? *Behav. Proc.*, **68**, 185–199 (2005).
- Trivers R. L. Parent-offspring conflict. *Americ. Zool.*, **14**, 249-264 (1974).
- Zala, S. M.; Bilak, A.; Perkins, M.; Potts, W. K. & Penn, D. J. Female house mice initially shun infected males, but do not avoid mating with them. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, **69**, 715–722 (2015).

Zuk, M. The role of parasites in sexual selection: current evidence and future directions. *Adv. Study Behav.*, **21**, 39-68 (1992).