

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS

PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ZOOLOGIA

**Perfil de personalidade e suscetibilidade a doenças em
tilápia do Nilo**

Isabela Maria de Mello

Botucatu – São Paulo

2018

Isabela Maria de Mello

Perfil de personalidade e suscetibilidade a doenças em tilápia do Nilo

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, Campus de Botucatu, SP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas - Área de concentração: Zoologia.

Orientadora: Profa. Adj. Percilia Cardoso Giaquinto

Botucatu – São Paulo

2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Mello, Isabela Maria de.

Perfil de personalidade e suscetibilidade a doenças em
tilápia do Nilo / Isabela Maria de Mello. - Botucatu, 2018

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de
Botucatu

Orientador: Percília Cardoso Giaquinto
Capes: 20404000

1. Peixe - Doenças. 2. Infecção. 3. *Aeromonas hydrophila*.
4. Personalidade. 5. Tilápia-do-Nilo.

Palavras-chave: *Aeromonas hydrophila*; *Oreochromis
niloticus*; Peixe; infecção; personalidade.

DEDICATÓRIA

À minha família.

Aos meus pais, Izabel e Leonardo, por todos os sacrifícios realizados em prol da minha educação, pela oportunidade de realizar um sonho que eles nunca puderam sonhar para si e por permanecerem ao meu lado durante os percalços, lutando para a minha vitória.

Aos meus irmãos Álvaro e Leonardo, e à minha madrinha Adriana, pelo apoio e motivação durante essa jornada. Sempre foram meus exemplos e não pouparam esforços para que eu trilhasse o caminho do conhecimento.

Aos meus primos Sophia e Matheus, por me inspirarem a educar. Espero que, quando for a vez deles, nosso país valorize um pouco mais a ciência e o papel dos professores na educação.

AGRADECIMENTOS

Às professoras Percília Cardoso Giaquinto e Marianna Vaz Rodrigues, por toda ajuda para a realização desse projeto, pelas trocas de conhecimento e opiniões, pelos conselhos e por toda contribuição na minha formação profissional e no meu crescimento pessoal.

Aos amigos do Laboratório de Comportamento e Fisiologia de Animais Aquáticos, por me proporcionarem momentos memoráveis, que vão desde crises de risos a reflexões filosóficas. Um agradecimento especial à Renata e Jurandir, que se tornam mais que amigos, são a minha família em Botucatu. Sempre serei grata por todo o carinho e apoio que recebi esses anos.

Aos meus colegas de casa, por me ensinarem que pessoas tão diferentes podem sonhar o mesmo sonho. Gratidão pelo suporte, por aturarem meu mal humor, pelas refeições compartilhadas e pelas confabulações madrugada adentro.

A todos os amigos que fiz, principalmente aqueles que permaneceram ao meu lado, sem o apoio de vocês nada disso seria possível. Gratidão aos amigos de Marília e aqueles que fiz durante a graduação, sei que mesmo longe vocês torcem pelo meu sucesso.

Aos professores do departamento de Fisiologia, por todo conhecimento compartilhado. Agradeço principalmente a professora Mirela Barros Dias e ao professor José Buratini Junior pela disponibilização de equipamentos para a realização desse projeto.

À técnica do laboratório do departamento de Microbiologia e Imunologia, Ivana Giovannetti Castilho e ao aluno de pós-graduação Thiago Fernandes (CAUNESP), por toda paciência e dedicação em preparar a solução bacteriana usada. Pela possibilidade de realizar as técnicas de biologia molecular, sou grata ao professor João Pessoa Araújo Junior (IBTEC). Ao professor José Eurico Possebon Cyrino e ao técnico Sérgio Vanderlei Pena, pela doação dos animais utilizados ao longo desse projeto.

Aos funcionários do Instituto de Biociências, sejam eles concursados ou terceirizados, pois sem o trabalho de cada um de vocês nada disso seria possível. Agradeço a todas as moças responsáveis pela limpeza, em especial a Janete, por sempre melhorar meu dia com seu humor.

Aos colegas e alunos do Curso de férias – Reprodução de A a Z, por me lembrar como a educação é transformadora e o porquê eu escolhi ser professora. Gratidão a todas as vezes que meu experimento deu errado, pela oportunidade de fazer de novo e fazer melhor. São nas adversidades que mais aprendemos e crescemos.

A todos aqueles que de alguma maneira, mesmo que indiretamente, contribuíram com esta pesquisa e a conclusão do mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pela bolsa concedida.

*“Feliz daquele que transfere o que sabe e
aprende o que ensina”*

Cora Coralina

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO DA DISSERTAÇÃO	10
CAPÍTULO 1	11
CONSIDERAÇÕES INICIAIS	12
Imunocompetência em peixes	12
Aeromonas hydrophila	17
Personalidade e suscetibilidade a doenças	20
OBJETIVO	24
REFERÊNCIAS	25
CAPÍTULO 2	30
RESUMO	31
ABSTRACT	32
INTRUDUÇÃO	33
Hipótese:	35
MATERIAL E MÉTODOS	35
Animais:	35
Delineamento:	35
Procedimentos específicos:	37
Seleção das personalidades:	37
Infecção do ambiente aquático:	39
Parâmetros comportamentais:	40
Constatação da infecção	40
Análise dos dados	43
RESULTADOS	44
DISCUSSÃO	48
CONSIDERAÇÕES FINAIS	50
REFERÊNCIAS	51
ANEXO A	57

APRESENTAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Esta dissertação é composta por dois capítulos: o primeiro capítulo busca, através de uma introdução geral, esclarecer e contextualizar conceitos fundamentais para a compreensão do objeto desta dissertação, como personalidade, suscetibilidade a doenças e imunidade em peixes. Já o segundo capítulo é composto pelo estudo realizado, no qual procuramos compreender como o sistema imune dos diferentes perfis de personalidade responde a infecção por bactéria patogênica.

CAPÍTULO 1

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Imunocompetência em peixes

A piscicultura vem se expandindo no mundo todo e na última década apresentou um crescimento cinco vezes maior do que outras atividades do setor, como a bovinocultura e avicultura (SILVA et al., 2012). Os avanços na produtividade também se estendem ao Brasil (BRISTOT, 2008; MOURÃO, 2013), que se encontra na 4ª posição na criação de tilápia do Nilo (PEIXE, BR, 2018). No último ano, ocorreu um aumento de 8% na produção em relação ao ano de 2016 (PEIXE BR, 2018). A intensificação pode gerar problemas sanitários, os quais ocasionam mortalidade nas pisciculturas decorrentes das enfermidades nos animais (HIRSCH et al., 2006). Por isso a imunidade natural tem uma importante função para resistência a doenças (MELO, 2008).

A avaliação das condições fisiológicas e bioquímicas dos animais é feita através dos componentes sanguíneos dos animais (TAVARES-DIAS, 2003). Os teleósteos possuem sistema de defesa inato e humoral, e dependendo da espécie, existem variações morfológicas e fisiológicas em suas células sanguíneas (RANZARI-PAIVA et al., 2013).

A pele é a primeira barreira de proteção. A epiderme produz secreções lubrificantes para a proteção, que impedem a invasão, instalação e proliferação de microrganismos patogênicos (BOIJINK & BRANDÃO, 2001). O sistema imunológico do animal é o responsável por combater microrganismos que ultrapassaram essa barreira de proteção, por meio de componentes humorais e celulares, que funcionam juntos na tentativa de evitar o surto de doenças (BILLER-TAKAHASHI & URBINATI, 2014).

O sistema imune inato é o primeiro a responder quando corpo é invadido por um patógeno e age de forma mais rápida devido a sua falta de especificidade. Este sistema é composto por uma combinação de células (macrófagos, monócitos e células NK), mediadores solúveis (citocinas pró-inflamatórias, incluindo interleucinas (IL-1, IL-6...), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a barreira epitelial. Estas células são responsáveis por inflamação, fagocitose e citotoxicidade não específica (YANO, 1996).

O sistema humoral é responsável por criar a memória imune, agindo através de anticorpos e linfócitos T, que devido a sua especificidade torna-se mais lento (ELLIS, 1999; LOPES, 2017). Por exemplo, quando uma bactéria é fagocitada pelo macrófago, as frações resultantes da fagocitose (epítomos) são apresentas aos linfócitos T, que ao se ligarem estimulam a proliferação desta célula (SWAIN et al., 2006).

Os eritrócitos são as células sanguíneas encontradas em maior número. Diferentemente dos mamíferos, eles são nucleados. Têm formato elíptico, com núcleo central que acompanha o formato da célula. São as células que contêm a hemoglobina (pigmento respiratório com de função transporte de O₂ e CO₂ no sangue). (RANZANI-PAIVA et al., 2004; PETRY, 2008; RANZANI-PAIVA et al., 2013).

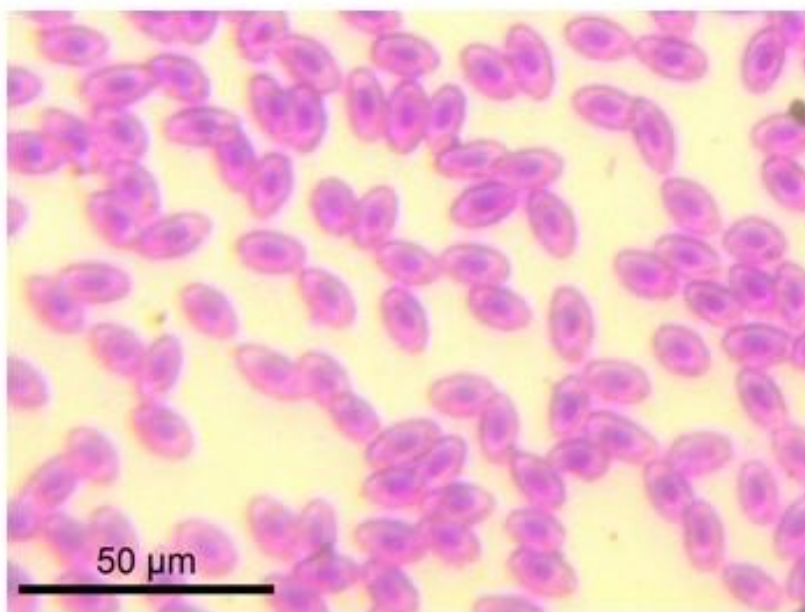


Figura 1: Extensão sanguínea com eritrócitos de tilápia (*Oreochromis niloticus*) coradas com Giemsa (Fonte: Isabela Mello).

Os linfócitos são similares e abundantes nas diferentes espécies de peixes. Produzidos nos órgãos linfoides (baço e timo), são responsáveis pelo reconhecimento do antígeno e deflagração da resposta imune. Eles são caracterizados por serem células esféricas que podem ter tamanhos variados, mas que em geral são arredondadas. Seu núcleo é arredondado e a relação núcleo-citoplasma é elevada,

com citoplasma basofílico e sem granulações visíveis (RANZANI-PAIVA et al., 2004, RANZANI-PAIVA et al., 2013).

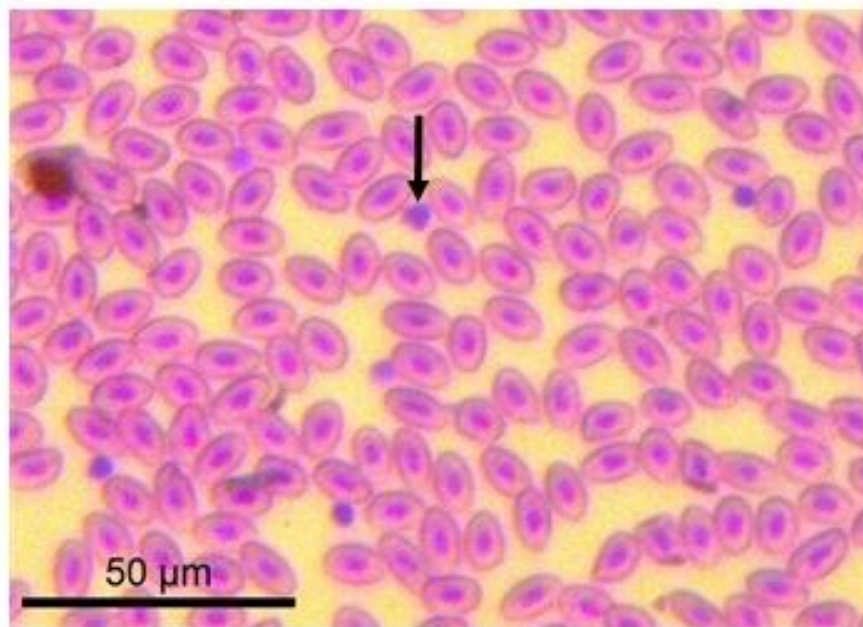


Figura 2: Extensão sanguínea com linfócitos (seta) de tilápia (*Oreochromis niloticus*) coradas com Giemsa (Fonte: Isabela Mello).

Os monócitos são os maiores leucócitos presentes no sangue periférico dos peixes, e podem ter até o dobro do tamanho dos eritrócitos. Possui formato arredondado, com citoplasma basofílico fracamente corado por corante e cromatina nuclear púrpura. A elevação do número dessas células pode ser explicada como uma reação do animal à susceptibilidade de adquirir alguma doença, isso porque, elas estão ligadas a atividade fagocitária e possuem a capacidade de migração entre os vasos sanguíneos (diapedese) durante o processo infeccioso (RANZANI-PAIVA et al, 2004; PETRY, 2008; RANZANI-PAIVA et al 2013).

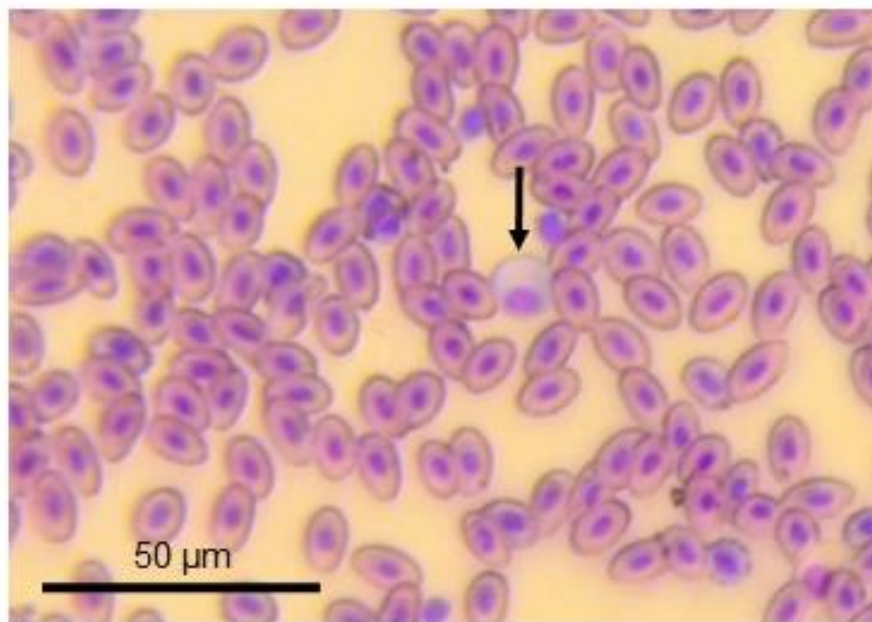


Figura 3: Extensão sanguínea com monócito (seta) em tilápia (*Oreochromis niloticus*) coradas com Giemsa (Fonte: Isabela Mello).

Os neutrófilos são as células de defesa mais importantes contra infecção bacteriana, uma vez que realizam fagocitose. Em geral, são arredondados com citoplasma basofílico e grânulos acidófilos fracamente corados por corante. São chamadas de polimorfonucleares, pela variedade de formas que seu núcleo pode assumir. Além disso, alguns podem apresentar granulações eosinofílicas. (TAVARES-DIAS et al., 2002; RANZANI-PAIVA et al., 2004; RANZANI-PAIVA et al., 2013).

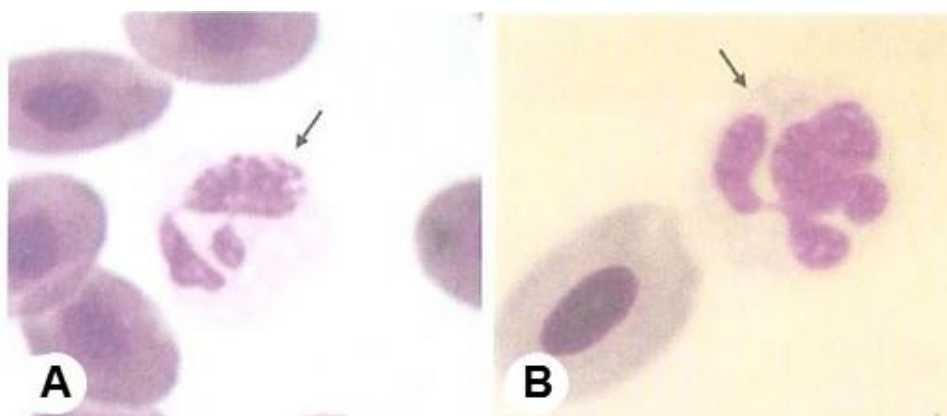


Figura 4: Extensões sanguíneas com neutrófilos (seta) de (A) tilápia (*Oreochromis niloticus*) e (B) truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) corados com Rosenfeld em aumento de 1000x (Fonte: RANZANI-PAIVA, 2013).

Não se sabe ao certo qual a função dos eosinófilos, e embora existam evidências de sua presença na defesa contra parasitas, nem sempre seu aumento ocorre em peixes parasitados. O seu tamanho é variado, e se diversificam de acordo com a quantidade e o tamanho de grânulos no citoplasma. O núcleo possui coloração purpura e pode ser arredondado ou ovalado. O citoplasma tem coloração rosada (hialina) rico em granulações eosinofílicas, característica determinante para a sua identificação (TAVARES-DIAS et al, 2002; RANZANI-PAIVA et al, 2004; RANZANI-PAIVA et al 2013).

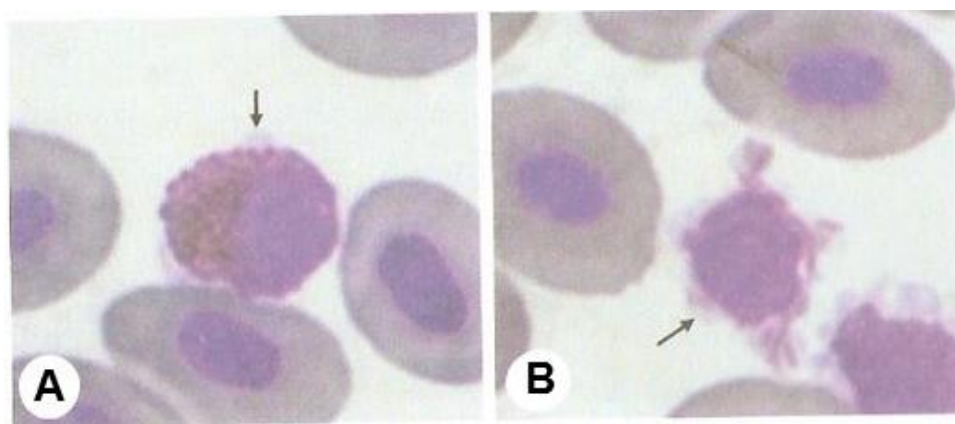


Figura 5: Extensões sanguíneas de eosinófilos (seta) de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) corados com MGGW em aumento de 1000x (Fonte: RANZANI-PAIVA, 2013).

Os basófilos são leucócitos raramente observados em peixes, sendo mais comuns em bagres do gênero *Pseudoplatystoma*. São células menores que os neutrófilos, podem assumir formato arredondado ou contorno irregular. O núcleo possui coloração purpura que acompanha o formato da célula. O citoplasma apresenta granulações basofílicas, que pode recobrir o núcleo, dificultando assim sua visualização (RANZANI-PAIVA et al, 2004; RANZANI-PAIVA et al 2013). Não há um consenso sobre sua função em peixes, no entanto, há indícios de que esteja ligada aos processos alérgicos, uma vez que possuem histaminas em seus grânulos (PETRY, 2008).

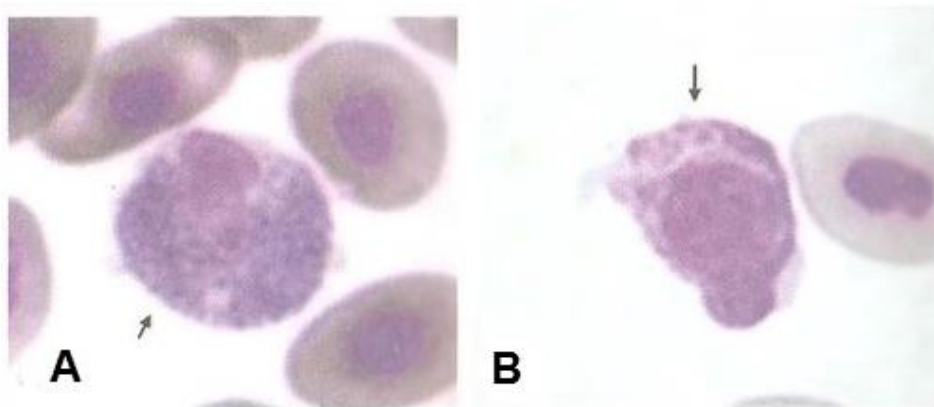


Figura 6: Extensões sanguíneas de basófilos (seta) de (A) tilápia (*Oreochromis niloticus*) e (B) bagre de canal (*Ictalurus punctatus*) corados com MGGW em aumento de 1000x (Fonte: RANZANI-PAIVA, 2013).

Agentes estressores podem desestabilizar o equilíbrio homeostático dos animais e assim, aumentar a susceptibilidade a doenças infecciosas (ANGELIDIS et al., 1987). A família *Aeromonadaceae* se destaca quando analisamos enfermidades em peixes, isso porque possui ampla distribuição, podendo ser identificada na pele, brânquias e intestino e por alterações comportamentais dos peixes (NOGA, 2000; BOIJINK & BRANDÃO, 2001; SILVA, 2010).

Aeromonas hydrophila

No ecossistema aquático, agentes virais, bacterianos, fúngicos e parasitas são considerados patógenos oportunistas aos peixes. Isso porque, quando ingeridos ou em contato com lesões da epiderme se manifestam e provocam infecções (BILLER-TAKAHASHI & URBINATI, 2014). HIRSCH e colaboradores (2006), alertam que a intensificação desorganizada das atividades em aquicultura podem, além de causar danos ambientais, comprometer a saúde dos animais.

As bactérias *Aeromonas* sp. possuem ampla distribuição, são encontradas em ambientes terrestres, água doce e salgada, águas limpas e poluídas, lamas e até águas cloradas, além de fazer parte da flora intestinal de peixes saudáveis (NOGA, 2000; MARTIN-CARNAHAN E JOSEPH, 2005; ZEPEDA-VELÁZQUEZ, 2015). Elas se desenvolvem em diferentes temperaturas, PHs, turbidez e condutividades; apenas em ambientes extremos desses parâmetros que o crescimento da espécie não foi

relatado (HAZEN & FLIERMANS, 1979). Essa distribuição abundante somada ao seu potencial patogênico e sua grande variedade de hospedeiros, contribuem significante para as perdas em aquicultura (TOKAJIAN & HASHWA, 2004; ZEPEDA-VELÁZQUEZ, 2015), principalmente em tilápia do Nilo (BOZZO, 2007; KUBITZA, 2008; MOURÃO, 2013).

A *Aeromonas hydrophila* é descrita na literatura como bacilo gram-negativo, que possui flagelo móvel, sem esporos e sem cápsulas. É considerada aeróbia ou anaeróbia, citocromoxidase positiva e fermentadora de glicose. Cresce em meios simples e as colônias são redondas, brilhantes e de coloração creme. As colônias crescem de um a três milímetros de diâmetro a 25,0°C em 48 horas, podendo crescer a temperaturas de até 37,0°C, em período mais prolongado (CARNEVIA, 1993; ALEXANDRINO et al., 2000).



Figura 7: Colônias de *Aeromonas Hydrophila* em ágar MacConkey (Fonte: Stefan Walkowski, 2015).

É a causadora da septicemia hemorrágica bacteriana, doença responsável por muitas ocorrências de mortalidade em sistemas intensivos de produção de peixes (AUSTIN & AUSTIN, 1988; LEE et al., 1997). O animal doente apresenta mudanças comportamentais, sinais clínicos externos evidentes e órgãos comprometidos. Como características comportamentais temos: apatia ou letargia (natação vagarosa), perda de apetite (anorexia) e perda de equilíbrio. O corpo do animal pode apresentar

hemorragias (brânquias e opérculos, principalmente), lesões epidérmicas como despigmentação, necroses da pele, úlceras com exposição da musculatura, palidez de brânquias e mucosas (indicativo de anemia), perda de escamas, exoftalmia, olhos opacos e hemorrágicos, além de irregularidades nas nadadeiras. Internamente, os órgãos podem estar friáveis e esbranquiçados, com necroses do tecido hematopoiético dos rins e baço, cavidade peritoneal com exsudado, intestino flácido com muco amarelo e sem alimento, (ROBERTS, 1993; PLUMB, 1994; AOKI, 1999; BOIJINK & BRANDÃO, 2001; AUSTIN & AUSTIN, 2007).

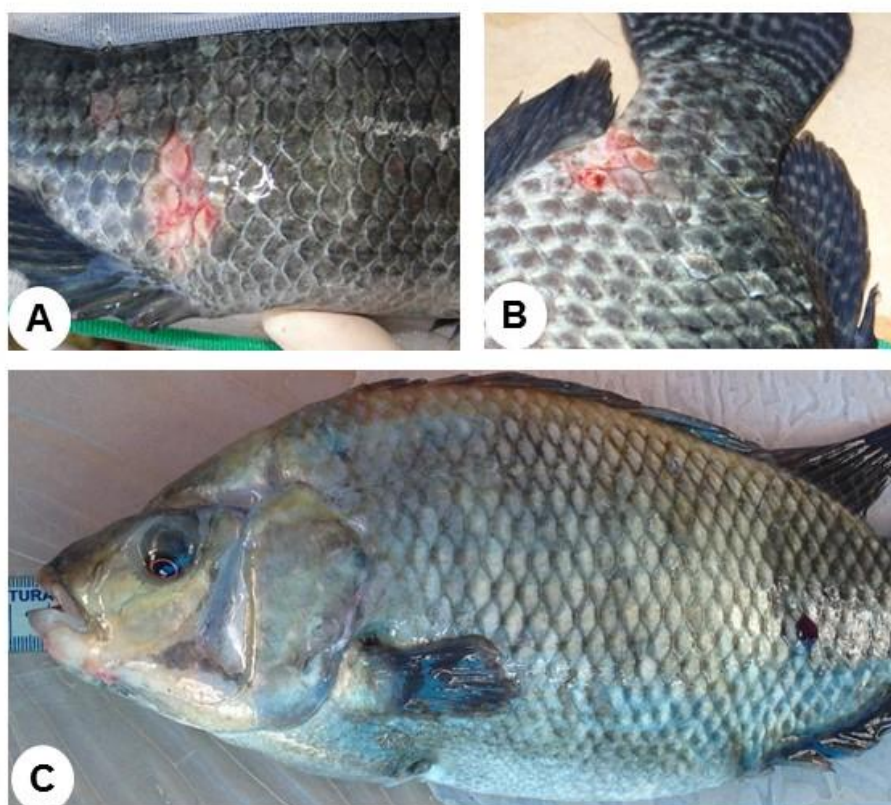


Figura 8: necropsia em tilápia do Nilo, (A-B) presença de úlceras próximas à nadadeira anal e (C) exoftalmia e deformidades na cabeça (Fonte: Marianna Vaz Rodrigues, 2016).

Os modelos de desafio comumente utilizados na aquicultura são inoculação intraperitoneal e banho de imersão. Sendo que o desafio intraperitoneal consiste na introdução forçada de patógenos no peritônio, o que permite acesso rápido ao ambiente sistêmico, reduzindo assim o período de incubação e garantindo que uma dose de desafio idêntica seja dada a cada peixe; no entanto, esse método contorna

as vias naturais da infecção (MUNANG'ANDU & EVENSEN, 2018). O banho de imersão tem a vantagem de expor o peixe a infecção por uma via natural, ou seja, através de superfícies mucosas, mas tem como limitação a dose de desafio por peixe, que não será igual ou uniforme, além de utilizar uma quantidade alta de patógenos (NORMO & RAMSTAD, 1997; MUNANG'ANDU & EVENSEN, 2018).

O modelo de desafio por coabitação também tem a vantagem de imitar a transmissão natural de doenças. Esse método consiste em colocar indivíduos infectados para atuarem como fonte de infecção para os coabitantes (MUNANG'ANDU & EVENSEN, 2018), porém, ainda faltam estudos para padronização do método. Dessa maneira, estudos os quais simulam o ambiente natural de infecção dos animais, seja qual for o método, são de extrema importância.

Personalidade e suscetibilidade a doenças

Os estudos com comportamento animal estão além dos aspectos fisiológicos e morfológicos, relações intra e interespecíficas e das interações com o meio e os recursos essenciais para a sobrevivência (SNOWDON, 1999). Existem diferenças nos aspectos individuais que devem ser levadas em conta. Inúmeros termos são utilizados, como síndromes comportamentais, personalidade, traços, comportamentais, temperamento ou estilo de enfrentamento, mas a verdade é que esses diferentes tipos de padrões de comportamento devem ser considerados, uma vez que estão ligados ao sucesso adaptativo e contribuindo para a aptidão individual (KOOLHAAS, 2008; CONRAD et al, 2011; WOLF & WEISSING, 2012; LOPES, 2017).

Segundo, WOLF e WEISSING (2012), síndrome comportamental é o fenômeno no qual os indivíduos diferem sistematicamente em suas tendências comportamentais e estas diferenças são consistentes ao longo do tempo e correlacionados em diferentes situações e contextos, ou seja, o perfil comportamental pode influenciar a capacidade de um indivíduo para resolver problemas e a se adaptar a ambientes inovadores (WHITEA et al., 2017). Esses padrões são divididos em 5 eixos: (1) ousadia (*Shy-Bold*), é a reação a situações novas a qualquer circunstância de risco (predadores), (2) exploração, reação de um indivíduo frente a uma nova situação (habitat, alimento e objeto), (3) atividade, nada mais é do que a quantidade de

atividade do animal, (4) agressividade, que é a reação agonística a um coespecífico e (5) sociabilidade, a reação a presença ou ausência de coespecíficos (RÉALE et al. 2007; CONRAD et al, 2011; CASTANHEIRA et al, 2013; OSTER et al, 2015; JACQUES-HAMILTON, 2017).

Um dos eixos mais estudados é a timidez-ousadia (*Shy-Bold*), que é descrito como a propensão (ousadia) ou aversão (timidez) para assumir riscos diante de objetos ou situações inovadoras (FABRE et al., 2015). Além dele, como os indivíduos podem não apenas diferir em seus comportamentos, mas essas diferenças podem envolver conjuntos inteiros de comportamento, outro eixo muito comentado é o proativo-reativo (SIH et al., 2004; WHITEA et al., 2017). Indivíduos proativos são ambos agressivos e ousados, exploram ativamente seu meio ambiente, manipulam desafios ambientais e prontamente formam rotinas persistentes. Em contrapartida, indivíduos reativos prestam atenção aos estímulos externos, ajustando-se cautelosamente às mudanças no meio ambiente (SIH et al., 2004; WHITEA et al., 2017). Por exemplo, em muitas populações de esgana-gato (*Gasterosteus aculeatus*), atividade, agressividade, comportamento exploratório e a ousadia estão positivamente correlacionadas entre os indivíduos (DINGEMANSE & WOLF, 2010). Já em guppies (*Poecilia reticulata*) mais ativos, arrojados e exploratórios sobreviveram mais tempo quando expostos a um predador (SMITH & BLUMSTEIN, 2010).

Outra implicação importante dos estilos de enfrentamento é a susceptibilidade exibida por indivíduos proativos e reativos a diferentes doenças (BARBER et al., 2017). Ao longo da vida, todos os animais estarão potencialmente expostos a agentes ambientais estressores, que testarão a capacidade do indivíduo em lidar e enfrentar tais desafios (BUWALDA & KOOLHAAS, 2017). E as diferenças imuno-fisiológicas individuais muitas vezes têm implicações tanto para o comportamento quanto para a personalidade e a probabilidade de estabelecimento de um parasita infeccioso (BARBER et al., 2017).

Existem duas hipóteses sobre a suscetibilidade a doenças e personalidade. Jacques-Hamilton et al (2017) discute que indivíduos proativos por serem mais ousados e mais exploratórios, são mais propensos a explorar situações novas, mais sociais e engajar-se mais em conflitos agressivos e, portanto, tem uma maior probabilidade de se expor a parasitas e patógenos, decorrentes de eventuais lesões

corpóreas. A outra hipótese é que, como o comportamento ousado promove a melhor aquisição de recursos, isso resultaria em um sistema imunológico mais eficiente e assim, sofrendo menos riscos de infecção.

Quando buscamos respostas na literatura, não há um consenso a respeito qual eixo comportamental tem maior suscetibilidade de contrair alguma doença, dependendo da doença e do animal, as respostas dos perfis serão diferentes. Em um estudo feito por TAKAHASHI e colaboradores (2018), macacos cynomolgus mais agressivos tiveram maior número de linfócitos, do que aqueles menos agressivos, quando infectados pelo vírus do herpes e o mesmo é observado em humanos. Já em ratos, o perfil proativo tem maior suscetibilidade a doenças somáticas, doença autoimune e hipertensão. No entanto, quando se trata de fobias sociais, bradiarritmias e o SinNombre vírus, o perfil reativo é mais suscetível (BUWALDA & KOOLHAAS, 2017; LOPES, 2017). Além disso, existe maior prevalência em perfis ousados de gatos selvagens (*Felis catus*) ao vírus da imunodeficiência e a esquilos da Sibéria (*Tamias sibiricus*) adquirirem carrapatos (LOPES, 2017). SCHRAMA e colaboradores (1997), demonstraram que porcos proativos parecem predominantemente depender da resposta imune inata, enquanto porcos reativos dependem da resposta imune humoral.

Nos Verdilhões selvagens (*Carduelis chloris*) capturados e levados ao cativeiro, os indivíduos que exploravam menos, foram os que apresentaram altas respostas imunes (LOPES, 2017). No entanto, quando analisamos o rouxinol (*Luscinia megarhynchos*) aqueles que exibiram mais comportamentos de risco, tiveram infecções mais intensas do que aqueles com menos comportamento de risco (MARINOV et al., 2015). Já em girinos do sapo madeira (*Lithobates sylvaticus*) o perfil de alta exploração apresentou menor carga de tremátodo (LOPES, 2017). E respostas imunes mais elevadas foram observadas no hemiptera “Firebugs” (*Pyrrhocoris apterus*) em animais menos ativos (GYURIS et al., 2016).

A respeito de peixes, observamos que quando se trata de parasitismo, a variação natural do comportamento expõe diferencialmente indivíduos a diferentes tipos de parasitas. Como por exemplo, os peixes apanhados em armadilhas (mais exploratórios) apresentaram níveis significativamente maiores de infecção com “mancha negra” (*Neascus* sp.) e níveis significativamente mais baixos de infecção

trematóide (*Posthodiplostomum mínimo*) quando comparado com o restante da população (BARBER et al., 2017). Osten et al (2015) encontrou quantidades semelhantes de glóbulos vermelhos e brancos, e plaquetas em porcos ousados e porcos tímidos, ao invés de alterações na distribuição de células sanguíneas, houve um padrão específico entre os perfis, o que sugere que o sangue pode ser um tecido adequado para obter marcadores moleculares para estilos de enfrentamento distintos. Eles podem ser usados para direcionar as decisões de seleção genética, para otimizar o gerenciamento de animais e para a fenotipagem molecular detalhada de animais para pesquisas futuras sobre as relações de comportamento e traços imunológicos.

Devido as diferentes conclusões encontradas na literatura e a vasta possibilidade de ensaios que podem ser realizados, estudos que relacionem perfis de personalidade e suscetibilidade a doenças são de grande importância para pesquisa de base, bem como para aplicação na aquicultura.

OBJETIVO

Estudos que relacionam personalidade com imunidade são crescentes, mas ainda não existe nenhum trabalho que relacione os perfis a doenças comuns encontradas na piscicultura, como a septicemia hemorrágica bacteriana. Dessa maneira, testaremos a suscetibilidade das personalidades tímido e ousado, a infecção causada pela bactéria *Aeromonas hydrophila* em tilápia do Nilo, a fim de investigar:

- Ocorrência de mudanças comportamentais.
- Diferença no número de eritrócitos e linfócitos.
- Alterações na morfologia das células.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDRINO, A. C.; OKUMURA, M. P. M.; BALDASSI, L.; ARAUJO, A. P.; KURODA, C. K. & WAKASA, Y. S. (2000). Ocorrência de *Aeromonas hydrophila* em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) em cultivo intensivo - Relato de caso. *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo, v. 26, n.1, p 117-119.
- ANGELIDIS, P., BAUDIN-LAURENCIN, F. & YOUINOU, P. (1987). Stress in rainbow trout, *Salmo gairdneri*: effects upon phagocyte chemiluminescence, circulating leucocytes and susceptibility to *Aeromonas salmonicida*. *Journal of Fish Biology*, 31, p.113-122.
- AOKI, T. (1999). Motile Aeromonads (*Aeromonas hydrophila*). In: WOO, P. T. K. & BRUNO, D. W. *Fish Disease*, v.3, p 427-453.
- AUSTIN, B. & AUSTIN, D. A. (1988). Patologia en acuicultura. In: Barja, J.L.; Esteves, A. T. *Enfermedades bacterianas*, Madrid, Caicy, 550p.
- AUSTIN, B. & AUSTIN, D. A. (2007). Bacterial fish pathogens, diseases of farmed and wild fish. *Praxis Publishing Ltd*, Chichester, UK, 81-99.
- BILLER-TAKAHASHI, J.D & URBINATI, E.C. (2014). Fish Immunology. The modification and manipulation of the innate immune system: Brazilian studies. *Academia Brasileira de Ciências*, vol.86, no.3, 1483-1495.
- BARBER, I., MORA, A.B., PAYNE, E.M., WEINERSMITH, K.L. & SIH, A. (2017). Parasitism, personality and cognition in fish. *Behavioural Processes*, 141, p 205–219.
- BRISTOT, P. P. (2008). Mapeamento e análise da cadeia produtiva da criação de tilápia em Santa Catarina. Florianópolis. Disponível em: <<http://tcc.bu.ufsc.br/Economia291929>>.
- BOIJINK, C. L. & BRANDÃO, D. L. (2001). Alterações histológicas e comportamentais provocadas pela inoculação de suspensão bacteriana (*Aeromonas hydrophila*) em juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*). *Ciência Rural*, Santa Maria, v.31, n.4, p 687-690.
- BOZZO, F.R. (2007). Inflamação por *Aeromonas hydrophila* inativada e tioglicolato em *Piaractus mesopotamicus* suplementados com vitamina c, e ou sua associação.

Tese (Doutorado em Patologia Veterinária). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp. Jaboticabal, 78 f. 2007.

CARNEVIA, D. (1993). Enfermedades de los peces ornamentales. Buenos Aires: Agrivet. 319p.

ELLIS, A.E. (1999). Immunity to bacteria in fish. *Fish Shellfish Immunol* 9: 291-308.

FABRE, N., GARCÍA-GALEA, E. & VINYOLÉS, D. (2015). Boldness is related to the development of the cephalic crest in the male of the river blenny *Salaria fluviatilis* (Asso, 1801) *Current Zoology*, 60, 3, p 373–380.

GYURIS, E., HANKÓ, J.F., FERÓ, O. & BARTA, Z. (2016). Personality and ectoparasitic mites (*Hemipteroseius adleri*) in firebugs (*Pyrrhocoris apterus*). *Behavioural Processes*. 122, 67–74.

HAZEN, T. C. & FLIERMANS, C. B. (1979). Distribution of *Aeromonas hydrophila* in natural and man-made thermal effluents. *Applied and environmental microbiology*, v. 38, n. 1, p. 166-168.

HIRSCH, D., PEREIRA JÚNIOR, D. J., LOGATO, P. V. R., PICCOLI, R. H. & FIGUEIREDO, H. C. P. (2006). Identificação e resistência antimicrobiana de espécies móveis de *Aeromonas* isoladas de peixes e ambientes aquáticos. *Ciência e Agrotecnologia*, v.30, n.6, p.1211-1217.

JACNES-HAMILTON, R., HALL, M.L., BUTTEMER, W.A., MATSON, K.D., SILVA, A.G., MULDER, R.A. & PETERS, A. (2017). Personality and innate immune defenses in a wild bird: Evidence for the pace-of-life hypothesis. *Hormones and Behavior*, 88, p 31–40.

KUBITZA, F. (2008). Tilápias na mira dos patógenos. *Panorama da aquicultura*, v.18, n.107, p. 28-37.

KOOLHAAS J. M. (2008). Coping style and immunity in animals: making sense of individual variation. *Brain, Behavior, and Immunity*. 22, p 662–66.

LEE, S. Y., YIN, Z., GE, R. & SIN, Y. M. (1997). Isolation and characterization of fish *Aeromonas hydrophila* adhesins important for in vitro epithelial cell invasion. *Journal Fish Diseases*, v.120, p169-175.

LOPES, P.C. (2017). Why are behavioral and immune traits linked? *Hormones and Behavior*, 88, p 52–59.

MARINOV, M.P., ZEHTINDJIEV, P., DIMITROV, D., ILIEVA, M., BOBEVA, A. & MARCHETTI, C. (2015). Haemosporidian infections and host behavioural variation: a case study on wild-caught nightingales (*Luscinia megarhynchos*). *Ethology Ecology & Evolution*. 1–12.

MARTIN-CARNAHAN, A. & JOSEPH, S. W. (2005) Aeromonadaceae. In: Brenner, D. J., KRIEG, N. R., STALEY, J. T. and GARRITY, G. M. (eds). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edition. Springer-Verlag, New York, pp.556-578.

MELO, D.C. (2008). Indicadores hematológicos e imunológicos após estresse crônico por hipóxia em tilápia (*Oreochromis niloticus*), linhagem chitralada. 38f. Tese (Doutorado em Zootecnia – Melhoramento Animal) Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

MOURÃO, L.C. (2013). Doenças bacterianas em tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*) cultivadas em sistema intensivo. Trabalho de conclusão de curso (Monografia) - Bacharel em Medicina Veterinária, Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Betim, Minas Gerais.

MPA MDPEA (2010) Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura - Brasil 2008-2009.

MUNANG'ANDU, H. M. and EVENSEN, O. (2018). Correlates of protective immunity for fish vaccines. *Fish & Shellfish Immunology*. doi: 10.1016/j.fsi.2018.03.060

NOGA, E.J. (2000). Diagnoses made by affected organs. *Fish diseases: diagnosis and treatment*, Ames: Iowa State University, p139-162.

NORDMO, R. & A. RAMSTAD. (1997). Comparison of different challenge methods to evaluate the efficacy of furunculosis vaccines in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases* 20(2): 119 - 126.

OSTER, M., SCHEEL, M., MURÁNI, E., PONSUKSILI, S., ZEBUNKE, M., PUPPE, B. & WIMMERS, K. (2015) The Fight-Or-Flight Response Is Associated with PBMC Expression Profiles Related to Immune Defence and Recovery in Swine. *PLOS ONE*, (1-15). doi:10.1371/journal.pone.0120153.

PEIXE BR. (2018). Anuário Peixe BR da Piscicultura. *Associação Brasileira da Piscicultura*, p 13-15. São Paulo, São Paulo.

PETRY, A. (2008). Comparação entre as características hematológicas de tilápia do Nilo em propriedades de Joinville e Chapecó, Santa Catarina. Trabalho de conclusão de curso (Monografia) - Engenharia de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina.

PLUMB, J.A. (1994). Health maintenance of cultured fish. *Principal microbial diseases*, 254p.

ROBERTS, R. T. (1993). Motile Aeromonas Septicaemia. In: INGLIS, V., Roberts, R. J. & Bromage, N. R. Bacterial diseases of fish. Oxford: *Blackwell Science*. Cap.8, p 143-155.

SIH, A., BELL, A. & JOHNSON, J. C. (2004). Behavioral syndromes: an ecological and evolutionary overview. *Trends in Ecology & Evolution*, 19(7):372-8.

SILVA, R. M. L. (2010). Bactérias do gênero *Aeromonas* e indicadores de qualidade da água em pisciculturas da região da baixada ocidental maranhense. (Tese) - Medicina Veterinária (Medicina Veterinária Preventiva), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Jaboticabal, São Paulo.

SILVA, R. D., ROCHA, L. O., FONTES, B. D. A. & FIORAVANTI, M. C. S. (2012). Parâmetros hematológicos e bioquímicos da tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus* L.) sob estresse por exposição ao ar. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 32(Supl.1), 99-107.

SMITH, B. R. & BLUMSTEIN, D. T. (2010). Behavioral types as predictors of survival in Trinidadian guppies (*Poecilia reticulata*). *Behavioral Ecology*, 21, 5, p 919–926.

SNOWDON, C. T. (1999). O significado da pesquisa em Comportamento Animal. *Estudos de Psicologia*, 4(2), 365-373.

SWAIN, P., SAHOO, P. K. & AYYAPPAN, S. (2006). Fish and shellfish immunology: na introduction. Delhi, India: Narendra *Publishing House*, p 296.

TAVARES-DIAS, M., MELO, J. F. B., MORAES, G. & MORAES, F. R. (2002). Características hematológicas de teleósteos brasileiros. IV. variáveis do jundiá *Rhamdia quelen* (Pimelodidae). *Ciência Rural*, vol.32, no.4, p.693-698.

TAVARES-DIAS, M. (2003). Variáveis hematológicas de teleósteos brasileiros de importância zootécnica. Tese (Doutorado em Aqüicultura) - Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 209 f, 2003.

TOKAJIAN, S. & HASHWA, F. (2004). Phenotypic and genotypic identification of *Aeromonas* spp. Isolated from a chlorinated intermittent water distribution system in Lebanon. *Journal of Water and Health*, v.2, p.115-122.

WHITEA, S. L., WAGNERC, T., GOWAND, C., & BRAITHWAITEB, V. A. (2017). Can personality predict individual differences in brook trout spatial learning ability? *Behavioural Processes*, 141, 220-228.

YANO, T. The nonspecific immune system: Humoral defense. In: IWANA, G.; NAKANISHI, T. *The Fish Immune System*. San Diego: Academic Press, 1996. p. 207-243.

ZEPEDA-VELÁZQUEZ, A. P. (2015). *Aeromonas* spp.: la infección en la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y su aislamiento en México. *Revista científica de la Sociedad Española de Acuicultura*, nº 42, pp. 01-16.

CAPÍTULO 2

Perfil de personalidade e suscetibilidade a doenças em tilápia do Nilo

RESUMO

Pesquisas recentes têm considerado aspectos individuais de personalidade em seus resultados. As personalidades podem explicar o sucesso adaptativo e aptidões individuais, além de outros fatores, como a variação imunológica. Estudos realizados em mamíferos comprovam a existência de variação em fatores imunológicos, dependendo do tipo de personalidade. Em peixes, os estudos em relação à personalidade são incipientes e são poucos os estudos que correlacionem perfil de personalidade e predisposição a doenças nesses animais. Assim, testamos a suscetibilidade dos perfis de personalidade tímido e ousado em tilápia do Nilo infectando o ambiente aquático com a bactéria *Aeromonas hydrophila*. Como resultados obtivemos que as lâminas histológicas com esfregaços sanguíneos apresentaram hifas fungicas e alterações nas membranas dos eritrócitos dos indivíduos com perfil tímido. A infecção bacteriana interferiu no comportamento alimentar de ambos os perfis, com diminuição da ingestão. Por outro lado, a infecção não afetou os demais parâmetros comportamentais e nem o número de células sanguíneas.

Palavras Chaves: peixe; infecção; *Aeromonas hydrophila*; personalidade; *Oreochromis niloticus*.

Profile of personality and susceptibility to diseases in Nile tilapia

ABSTRACT

Recent studies have considered individual aspects of personality in their results. Personalities can explain the adaptive success and individual fitness, and other factors, such as immune variation. Studies in mammals prove the existence of variation in immune factors, depending on type of character. In fishes, the studies on personality are incipient and there isn't study that correlates personality profile and susceptibility to disease in these animals. Thus, we tested the susceptibility of “*shy-bold*” personality profiles in Nile tilapia infecting the aquatic environment with the bacterium *Aeromonas hydrophila*. As a result we found that the histological slides with blood scrub showed fungal hyphae and alterations in the erythrocyte membranes of individuals with a shy profile. The bacterial infection interfered in the feeding behavior of both profiles, with decreased ingestion. Still, the infection did not affect the other behavioral parameters nor the number of blood cells.

Keywords: fish; infection; *Aeromonas hydrophila*; personality; *Oreochromis niloticus*.

INTRUDUÇÃO

A pesquisa sobre personalidade começou a ser investigada no reino animal à medida que os psicólogos necessitaram de modelos animais para investigar vários aspectos da individualidade (TONS, et al, 2010). Da mesma forma, ecologistas comportamentais começaram a explorar a ideia de que a variação individual pode explicar muitos comportamentos na população ou grupo de interesse (DINGEMANSE & WOLF, 2010; TONS, et al, 2010) e então recorreram as questões relacionadas à personalidade para explicar as diferenças individuais no comportamento animal (KOOLHAS, 2008; TONS, et al, 2010). Etólogos e ecologistas comportamentais já documentaram personalidade em uma ampla gama organismos, como mamíferos, aves, lagartos, anfíbios, peixes, moluscos e artrópodes (SIH et al., 2004).

Inúmeros termos são utilizados, como síndromes comportamentais, personalidade, traços, comportamentais, temperamento ou estilo de enfrentamento, mas a verdade é que esses diferentes tipos de padrões de comportamento devem ser considerados, uma vez que estão ligados ao sucesso adaptativo e contribuindo para a aptidão individual, porque implicam que a plasticidade nos traços comportamentais pode ser limitada, restringindo assim a capacidade dos animais de se comportar de forma ótima em todas as situações (CONRAD et al, 2011; WOLF & WEISSING, 2012). Ela pode ser dividida em 5 eixos: (1) ousadia (*Shy-Bold*), (2) exploração, (3) atividade, (4) agressividade e (5) sociabilidade (RÉALE et al. 2007; CONRAD et al, 2011; CASTANHEIRA et al, 2013). Sendo que o eixo mais estudado, inclusive em peixes, é o ousado-tímido, que descreve a propensão de um animal em assumir riscos (RÉALE et al. 2007; WILSON & GODIN, 2010; RUIZ-GOMES & HUNTINGFORD, 2012).

Em humanos, os fatores psicossociais e a susceptibilidade a doenças infecciosas, estão relacionados à modulação da resposta imunológica, tanto no aspecto humoral, quanto no mediado por células (JEMMOTT & LOCKE, 1984). Além disso, é possível estimar o processo de imunocompetência de um animal, a fim de correlaciona-los com a capacidade de resistir à doença (MARSLANDA et al, 2002; ADAMO, 2004; LOCATELLO et al., 2012).

Quando analisamos a literatura, encontramos uma hipótese que prediz que os indivíduos que apresentam comportamentos mais arriscados devem ter maior níveis de anticorpos e parâmetros de imunidade inata mais relevante para detecção precoce

e neutralização de novos parasitas (JACNES-HAMILTON et al, 2017). Em seu estudo com carpas (*Cyprinus carpio*), Rey e colaboradores (2016) encontraram que indivíduos reativos apresentam respostas ao estímulo inflamatórios (IL1 β) consistentemente e fortemente regulados quando comparados com proativos. Em contrapartida, no peixe-sol (*Lepomis gibbosus*), animais mais ousados apresentaram maior prevalência de trematóides do que os peixes classificados como tímidos (LOPES, 2017). Já quando analisamos os animais em contexto social, descobriu que os indivíduos tímidos, que formaram cardumes mais apertados, mostraram níveis maiores de infecção e maiores aumentos na carga de infecção (BARBER et al, 2017). Para peixes, a incapacidade de acomodar estilos de enfrentamento nas condições de cultivo, podem levar a problemas na produção, como a suscetibilidade a doenças (CASTANHEIRA et al., 2017).

No Brasil, a aquicultura vem se desenvolvendo, superando até mesmo a pecuária e isso se deve ao seu clima favorável, seus recursos hídricos e a mão de obra relativamente barata e crescente (SILVA et al, 2012). Porém, sua prática é dificultada devido a ampla gama de microrganismos causadores de doenças, entre eles a *Aeromonas hydrophila*, que está presente naturalmente em ecossistemas aquáticos, tropicais e temperados, e fazem parte da microbiota da água de rios e tanques, o que pode aumentar seu potencial patogênico quando as condições físicas e químicas do ambiente estiverem alteradas (PLUMB, 1980; CAMUS et al., 1998; ALYAHYA et al., 2018).

Dessa maneira, testamos a suscetibilidade das personalidades tímido e ousado a infecção causada pela bactéria *Aeromonas hydrophila*. A tilápia do Nilo é um ciclídio muito utilizado nas pisciculturas por características como rusticidade, rápido crescimento, adaptação climática e resistência ao manejo. Infelizmente, há uma limitada quantidade de provas que sustentam a ideia de que a variação da personalidade do indivíduo está ligada a susceptibilidade a doenças, principalmente em peixes, por isso a importância de tais estudos.

Hipótese:

- Animais *Shy* são mais suscetíveis a *Aeromonas hydrophila* (septicemia hemorrágica bacteriana).

MATERIAL E MÉTODOS**Animais:**

Foram utilizados adultos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), provenientes do biotério da Universidade de São Paulo (USP-Esalq), os quais foram aclimatados em tanques de 500L; 6 peixes/L antes dos procedimentos experimentais. A temperatura (28-30°C) e fotoperíodo (12C:12E) mantidos constantes. Os tanques eram providos com aeração contínua e com biofiltros. Os animais foram alimentados uma vez ao dia (ração comercial para peixes) com ração à vontade. Os níveis de nitrito e amônia foram mantidos abaixo de 0,05 mg/L e 0,5 mg/L, respectivamente, para manutenção da qualidade da água. Além disso, o tanque foi sifonado diariamente para remoção de restos de alimento e fezes.

Essa pesquisa encontra-se de acordo com Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CEUA) no protocolo número 963-CEAU (Anexo A).

Delineamento:

O delineamento consistiu em avaliar a susceptibilidade das personalidades tímido e ousado quando o ambiente é infectado com a bactéria *Aeromonas hydrophila* em indivíduos isolados.

Primeiramente, selecionamos aleatoriamente 40 animais do biotério. Os indivíduos foram individualizados em aquários de vidro por 7 dias para aclimação. Após esse período, os animais foram submetidos ao teste do objeto novo, por dois dias consecutivos e logo depois ao teste com predador, para que assim as personalidades tímido e ousado fossem selecionadas através de um ranqueamento.

Com as personalidades estabelecidas, alguns parâmetros comportamentais foram analisados por 5 dias seguidos. No 6º dia, cada peixe foi anestesiado e o sangue foi coletado assepticamente em tubos tratados com EDTA e armazenaremos a – 20°C para posterior análise. Além disso, foi realizado um corte superficial de 0,5 cm na base da nadadeira esquerda dos indivíduos e lâminas histológicas foram confeccionadas. Ao retornarem ao aquário, 3ml de solução bacteriana de *Aeromonas Hydrophila* foram pipetados na parte central do aquário.

Durante 5 dias após a infecção do ambiente aquático, os mesmos parâmetros comportamentais foram analisados e no 6º dia, uma nova coleta de sangue foi realizada, para que assim, cada animal fosse considerado controle dele mesmo. Lâminas histológicas foram confeccionadas mais uma vez.

As amostras sanguíneas desses animais foram submetidas ao PCR para verificação da amplificação do DNA bacteriano. Uma nova repetição, com 38 animais, foi realizada da mesma maneira, no entanto, as amostras sanguíneas foram submetidas a contagem de células sanguíneas (eritrócitos e linfócitos). Até o fim da escrita dessa dissertação não foi realizado o PCR dessas amostras de sangue.

Dos animais que apresentaram perfil definido, utilizamos 22 animais, sendo 11 tímidos ($10,5 \pm 1,2$ cm; $36,6 \pm 3,9$ g) e 11 ousados ($10,8 \pm 1,5$ cm; $39,3 \pm 5,2$ g). Dos quais, 10 amostras de sangue (5 tímidos e 5 ousados) foram submetidas ao PCR para a bactéria *Aeromonas*. Para as outras 12 amostras de sangue (6 tímido e 6 ousados) foi realizada a contagem de células em Câmara de Neubauer.

Em sua totalidade, foram realizadas 7 repetições, com um total de 198 animas. Esse número foi necessário para adequar a metodologia e para obtermos um número amostral suficiente, uma vez que, muitos desses animais obtinham o perfil intermediário.

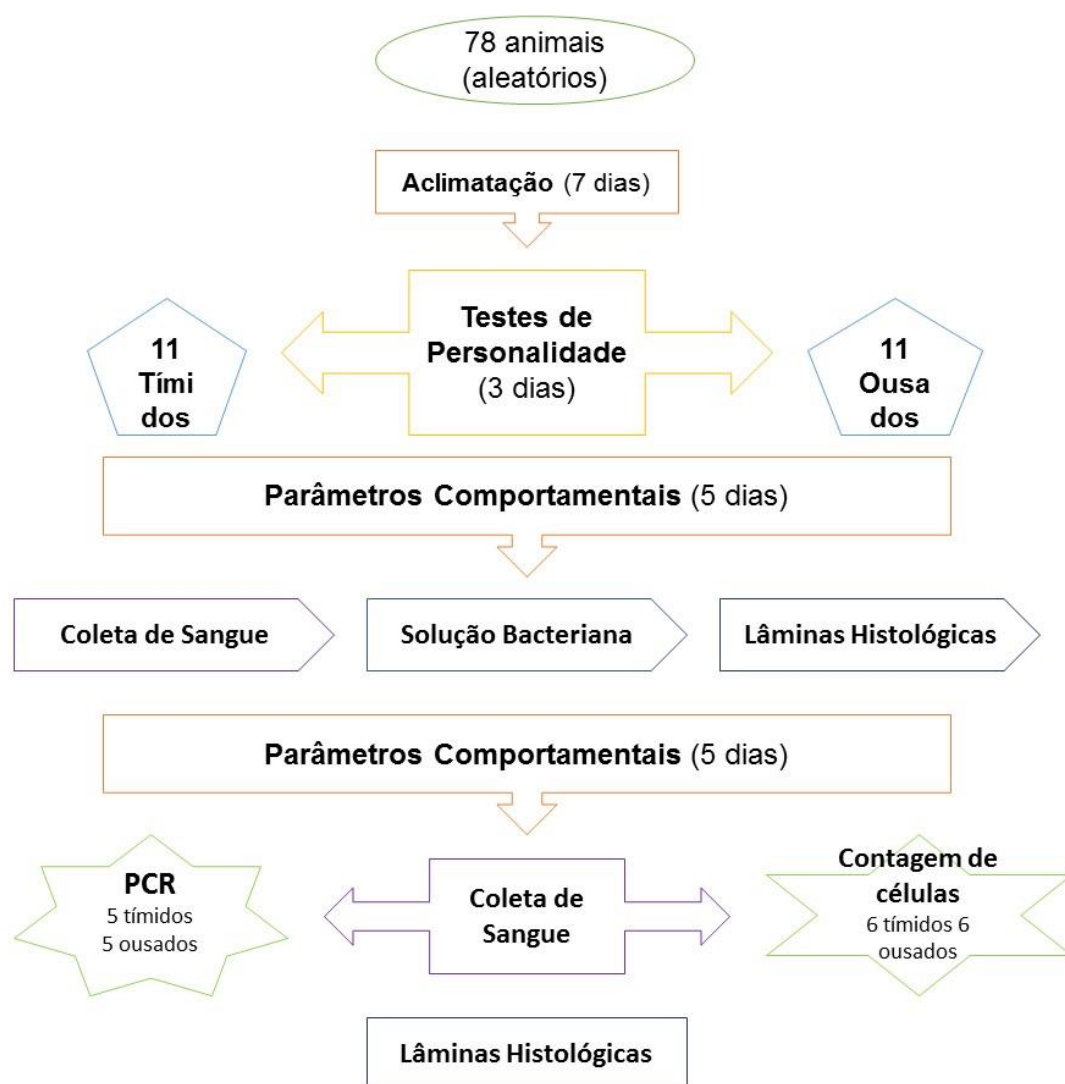


Figura 9: Esquema do delineamento experimental.

Procedimentos específicos:

Seleção das personalidades:

Os animais foram individualizados em aquários de vidros (40 cm x 20 cm x 25 cm), os quais possuíam 6 regiões de igual tamanho delimitadas por linhas verticais e horizontais. Após o período de aclimação de 7 dias, começaram os testes para a determinação da personalidade:

Dia 0 – Objeto novo (FROST et al., 2007; KIRSTEN et al., 2018): um tubo circular na cor vermelha de PVC ($\varnothing = 3$ cm) foi introduzido ao lado oposto ao que o

peixe se encontrava (aproximadamente 30 cm). Esse dia foi considerado dia zero, pois serviu como uma preparação para os testes de personalidade, por isso os dados coletados não foram utilizados para o ranqueamento.

Dia 1 – Objeto novo (FROST et al., 2007; KIRSTEN et al., 2018): passadas 24 horas, um retângulo de plástico amarelo (10 cm x 4 cm x 2 cm) introduzido ao lado oposto ao que o peixe se encontrava (aproximadamente 30 cm). Dados coletados utilizados para o ranqueamento.

Dia 2 – Predador: passadas 24 horas, um tablet de 7 polegadas, foi colocado ao lado oposto ao que o animal se encontrava, do lado de fora do aquário (GERLAI et al, 2009 - adaptado). Para fim de simular o predador, foi exibido um vídeo de 5 minutos de um aquário contendo bagres africanos (*Clarias gariepinus*), que são considerados uns dos predadores da tilápia do Nilo (DE GRAAF et al., 1996). Dados coletados utilizados para o ranqueamento.

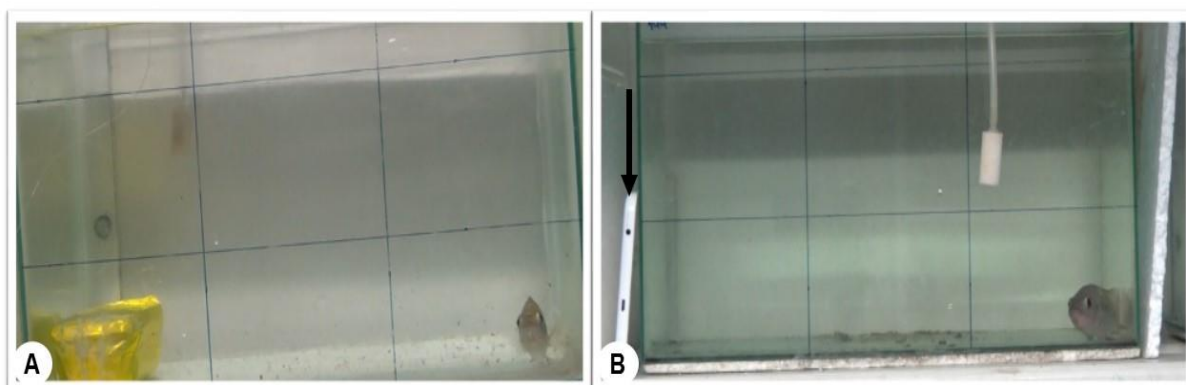


Figura 10: Fotos da seleção de personalidade (A) dia 1 e (B) dia 2 (seta: tablet) (Fonte: Isabela Mello).

Em cada um dos experimentos foi registrado por 5 minutos e a partir dela anotamos as seguintes variáveis: a latência do animal até o objeto/tablet, o tempo total que o peixe passou próximo ao objeto/tablet (pelo menos 50% do corpo dentro do quadrante) e sua movimentação entre os quadrantes (6 regiões delimitadas no aquário).

Para o ranqueamento, cada animal recebeu uma pontuação referente a soma das variáveis. Isto é, indivíduos com maior tempo próximo ao objeto/tablet receberam um valor maior do que aqueles que passaram tempo menor próximos ao objeto/tablet.

Foi atribuído zero para aqueles que não apresentaram tempo. O mesmo foi feito para a movimentação. Já para a latência ocorreu o inverso, ou seja, animais que apresentaram maior latência até o objeto/tablet receberam um valor menor do que aqueles que levaram menos tempo. Foi atribuído zero para aqueles que não apresentaram latência durante 5 minutos. Essa metodologia foi aplicada no dia 1 e dia 2 e com a soma dos dois dias, os peixes foram organizados em ordem decrescente de valores. Os animais com as maiores pontuações foram considerados ousados e aqueles com as menos pontuações foram considerados tímidos. Os indivíduos que não foram consistentes ao longo dos dois dias, obtiveram pontuações intermediárias (entre os valores extremos) e não foram utilizados nesse estudo. Como ocorreram 2 repetições, os animais do primeiro experimento receberam novas pontuações, quando foram acrescidos os animais da segunda repetição ao ranqueamento, o que garante que apenas indivíduos com comportamentos extremos foram utilizados nesse projeto.

Infecção do ambiente aquático:

Foi utilizada a cepa 231413 isolada de pintado (*Pseudoplatystoma* sp). Essa cepa foi inicialmente semeada em placa de Petri contendo meio de cultura ágar MacConkey incubadas a $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. Após esse tempo, as colônias foram semeadas em meio de cultura BHI (Brain-heart infusion) e incubada em estufa a 28°C por 24 horas, com a concentração de 10^8UFC acertada pela escala de MacFarland. Foram pipetados 3ml contendo a solução bacteriana no centro do aquário. Chegamos ao volume pipetado de 3ml após testarmos os valores 1ml, 2ml, 3ml, 4ml e 5ml. Com a extração do DNA bacteriano proveniente das amostras de sangue dos animais, constatou-se que ambos estavam infectados, por isso escolhemos o valor intermediário.

Posteriormente, para atestarmos que a concentração foi adequada, realizamos uma regra de três (RANZANI-PAIVA et al., 2013) baseada no valor da contagem de bactérias em Câmara de Neubauer (1712nm) e no CL_{50} ($3,5 \cdot 10^8 \text{UFC}$), que apresentou o valor de 2,04ml, confirmando que a quantia de 3ml foi suficiente.

Parâmetros comportamentais:

Para se avaliar o efeito da infecção nos diferentes perfis de personalidade, analisamos os parâmetros, alimentar, frequência ventilatória e locomotor. Para tanto, registramos e analisamos tais parâmetros ao longo dos 10 dias, 5 dias antes e 5 após a contaminação. Tais parâmetros foram selecionados uma vez que a bactéria *Aeromonas Hydrophila* possui como característica a mudança no apetite do animal, além de apatia e perda de equilíbrio dos indivíduos (AUSTIN & AUSTIN, 1988). Em relação à frequência ventilatória, esta pode ser um referencial de resposta a agente estressor (SILVA, 2010), assim aqui inferimos estresse como resposta a infecção e uma possível correlação entre a doença e aumento da frequência ventilatória.

A locomoção dos animais, foi filmada sempre entre as 12 horas e 14 horas, durante 5 minutos. Ao analisarmos os vídeos, as mudanças entre os 6 quadrantes foram anotadas (adaptado de MERIGHE et al., 2004). A frequência ventilatória foi registrada sempre entre as 14 horas e 16 horas. Com o auxílio de um contador manual, foi anotada a quantidade de batimentos operculares em 20 segundos (adaptado de ALVARENGA & VOLPATO, 1995). Já a taxa alimentar foi analisada sempre entre as 16 horas e 17 horas. Oferecemos cerca de 10% da massa corpórea dos animais em ração, uma vez ao dia (± 30 pellets). Os peixes não conseguiam comer toda ração oferecida, mas essa técnica garantiu que eles obtivessem à saciedade. Os pellets eram retirados após 10 minutos e esses valores eram anotados (adaptado de BARRETO e VOLPATO, 2011).

Constatação da infecção

A identificação da infecção dos animais foi feita pela coleta e análise do sangue dos animais. Na confecção das lâminas histológicas e na Câmara de Neubauer procuramos pela presença de linfócitos, enquanto no PCR esperávamos pela amplificação do DNA plasmidial.

Coleta e análise do sangue:

Para analisar se houve a infecção bacteriana, coletamos sangue dos peixes. O indivíduo capturado foi então anestesiado em solução de benzocaína (80 mg/L). Após anestesia parcial (GONTIJO et al., 2003), o sangue foi coletado por punção caudal, utilizando-se seringas heparinizadas de 1 ml para evitar que o sangue coagulasse. As punções foram realizadas antes da contaminação do ambiente (controle) e 5 dias após a contaminação do ambiente. O sangue coletado foi transferido para tubos de 4ml tratados com EDTA e armazenados – 20°C.

Após a primeira coleta de sangue, isto é, no controle, foi realizado um corte de 0,5 cm na base da nadadeira esquerda dos animais. Esta lesão é uma importante porta de entrada para bactérias e simula o que ocorre frequentemente no ambiente natural (ROMERO et al., 2016).



Figura 11: Foto de uma punção caudal em tilápia do Nilo (Fonte: Isabela Mello).

Confecção das lâminas histológicas:

Para constatação da infecção, analisamos a morfologia das células sanguíneas dos indivíduos foi avaliada a partir de lâminas de esfregaço sanguíneo. Em lâmina devidamente limpas e identificadas, colocamos uma gota de sangue do animal e com o auxílio de uma lâmina extensora, executamos o esfregaço correndo de maneira uniforme por toda a lâmina (RANZANI-PAIVA et al., 2013). As lâminas secaram naturalmente e depois de 24 horas foram coradas com o corante Giemsa. Primeiramente, as lâminas foram fixadas em metanol por 5 minutos. O corante foi diluído em água destilada até a homogeneização na proporção 3:1. As lâminas foram cobertas com essa mistura de corante e deixamos agir por 30 minutos. As extensões sanguíneas foram lavadas em água corrente e secadas naturalmente (RANZANI-PAIVA et al., 2013).

PCR (Reação em cadeia de polimerase):

Foram selecionadas 10 amostras de sangue para extração de DNA e amplificação do DNA plasmidial para a bactéria *Aeromonas hydrophila* pela técnica de PCR.

Para tal, utilizamos um mix contendo: 5,3 µL de água livre de ácidos nucléicos, 10 µL de GoTaq Green 1x (Promega®), 0,6 µL do primer ascV sense (10 pmol/µL), 0,6 µL do primer ascV antisense (10 pmol/µL), 0,5 µL de DMSO e 3 µL de DNA extraído. A reação foi realizada como descrito por CARVALHO-CASTRO e colaboradores (2010): desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguidos de 35 ciclos a 95°C por 1 minuto, 58°C por 1:30 minuto, 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 5 minutos. A visualização da amplificação ocorreu em gel de agarose a 1,5% sob a luz ultravioleta.

Contagem de células em Câmara de Neubauer:

Utilizamos a Câmara de Neubauer para a contagem de hemácias e eritrócitos antes e depois da infecção. As amostras foram descongeladas, diluídas (1:100) em solução salina a 0,65% e acrescentamos 0,001µl de corante Giemsa. Após a

homogeneização, a amostra diluída foi pipetada nos dois retículos da Câmara de Neubauer até o seu preenchimento total (sem bolhas) e após 5 minutos a leitura foi realizada em microscópio óptico (40x). Escolhemos 5 quadrantes pequenos (Figura 12) e a contagem foi feita nos dois retículos, sempre de cima para baixo e da esquerda para a direita. As diferenças entre as duas contagens foram inferiores a 25% (RANZANI-PAIVA et al., 2013).

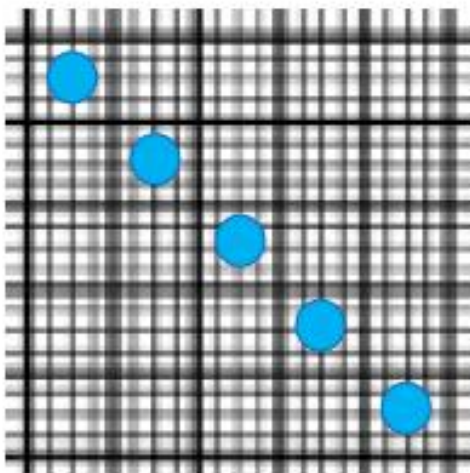


Figura 12: Esquema utilizado para a contagem de células na Câmara de Neubauer.

O número total de células é dado pela expressão:

$$\text{Nº de células/ml} = \frac{\text{nº total de células}}{\text{nº de quadrantes contados}} \times 10.000$$

Análise dos dados

O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para testar a normalidade e Levene para a homocedasticidade. Para os parâmetros comportamentais, utilizamos o teste não paramétrico de Wilcoxon para avaliarmos se houve diferença antes e depois da infecção. Já para sabermos se a infecção era diferente para as personalidades, aplicamos a ANOVA Two-way. O mesmo fizemos para o número de eritrócitos. Para o número de linfócitos, aplicamos o teste não paramétrico de Mann-Whitney. A análise da morfologia dos esfregaços sanguíneos foi qualitativa.

RESULTADOS

Em relação os dados dos parâmetros comportamentais, não houve diferença significativa da ingestão entre os perfis tímido e ousado ($p=0,13$), porém houve diferença entre pré- e pós-infecção em relação à alimentação, onde ambos os perfis diminuíram a ingestão alimentar após a infecção ($p=0,004$) (Figura 13).

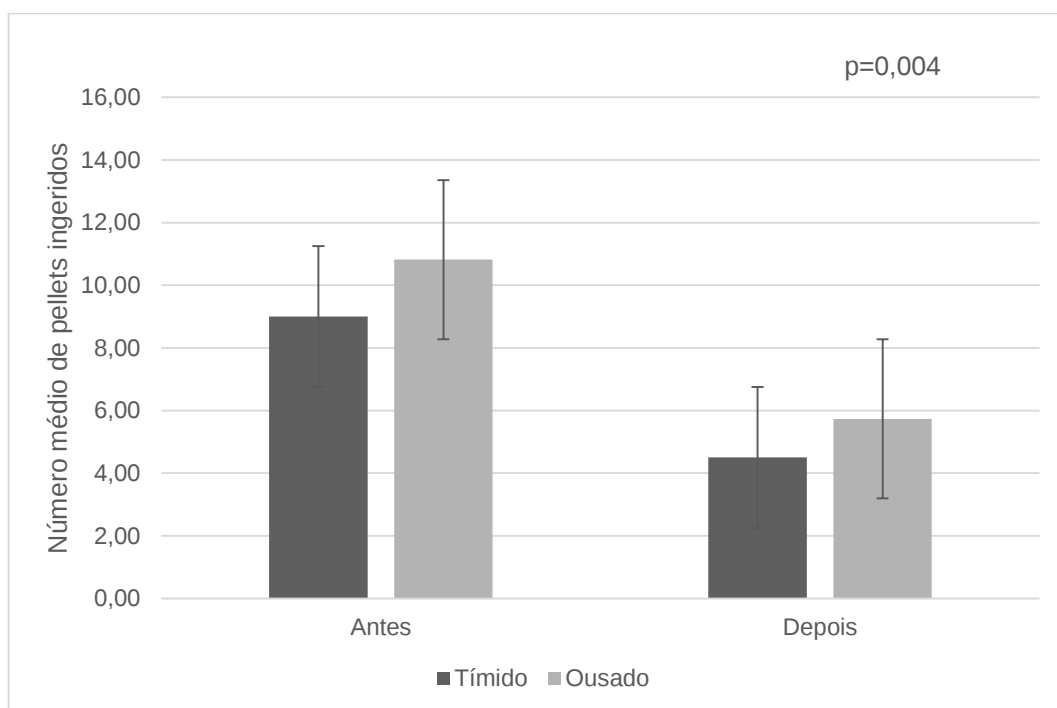


Figura 13: Gráfico com o número médio de pellets ingeridos antes e depois da contaminação por cada perfil de personalidade. Nível de significância $p<0,05$.

Em relação a taxa ventilatória, indivíduos ousados aumentaram o número de batimentos operculares depois da infecção ($p=0,12$), enquanto indivíduos com perfil tímido diminuíram o batimento opercular ($p=0,93$). Quando comparamos antes e depois por Wilcoxon, também não encontramos diferenças significativas ($p=0,51$). (Figura 14), no entanto, observamos que o perfil ousado estava mais reativo do que o normal. Em relação a padrão locomotor não houve diferença entre os perfis de personalidade ($p=0,5$) e nem antes e após a contaminação ($p=0,62$).

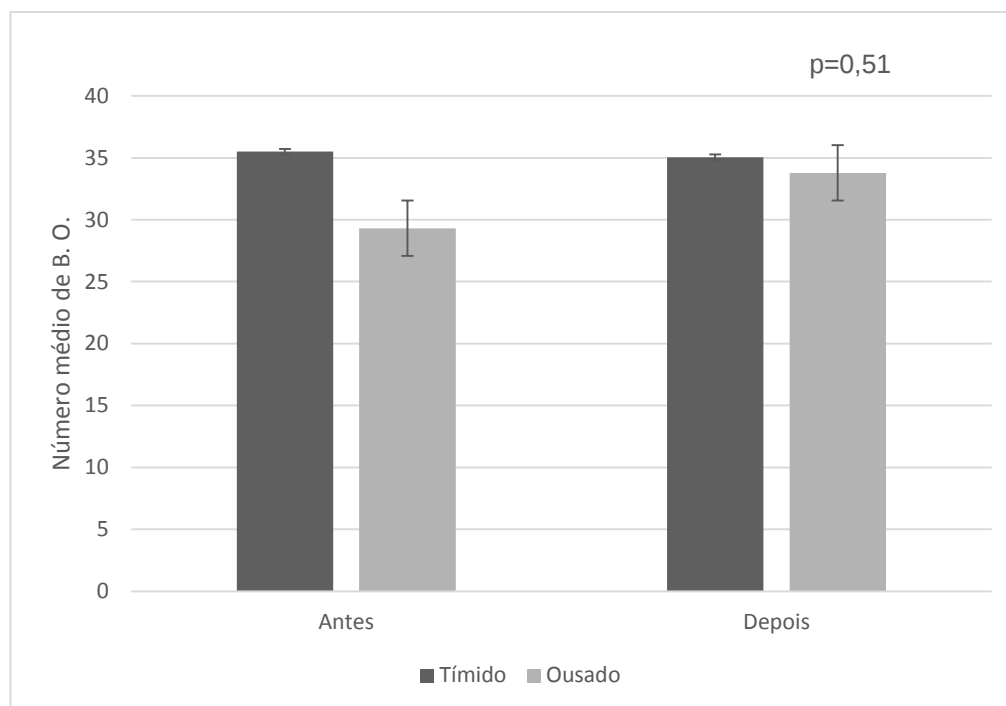


Figura 14: Gráfico com o número médio de batimentos operculares antes e depois da contaminação em cada perfil de personalidade. Nível de significância $p < 0,05$.

Em relação aos parâmetros de infecção, nos esfregaços sanguíneos não encontramos nenhum tipo de células brancas nas lâminas de controle, apenas eritrócitos. No entanto, após a infecção com a bactéria, notamos a presença de linfócitos (Figura 15). Além disso, encontramos diferenças entre o perfil tímido e o perfil ousado, uma vez que, em indivíduos tímidos notamos a presença de fungos e eritrócitos com alterações na membrana (anisocitose) (Figura 16).

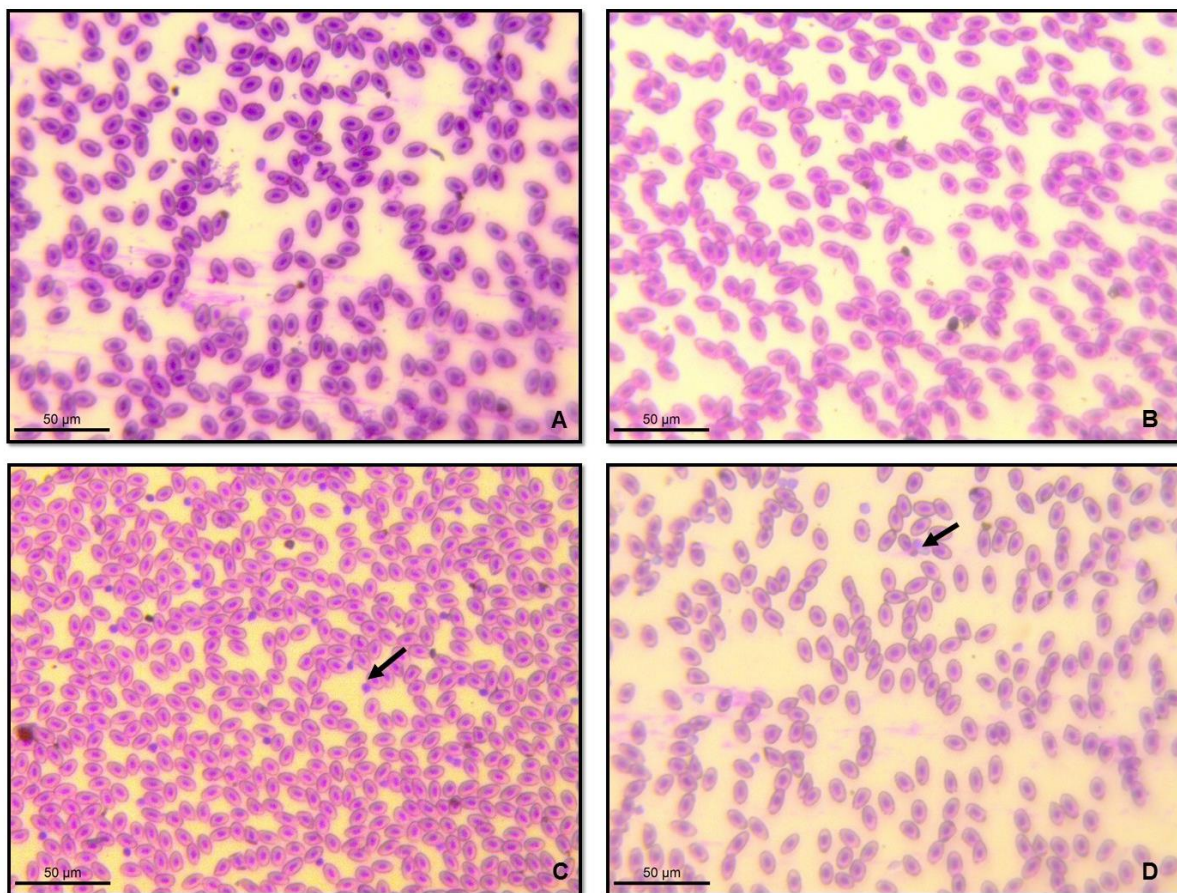


Figura 15: Esfregaço sanguíneo do controle (A) tímido e (B) ousado e depois dos 5 dias (C) tímido e (D) ousado, coradas com Gimsa (setas: linfócitos).

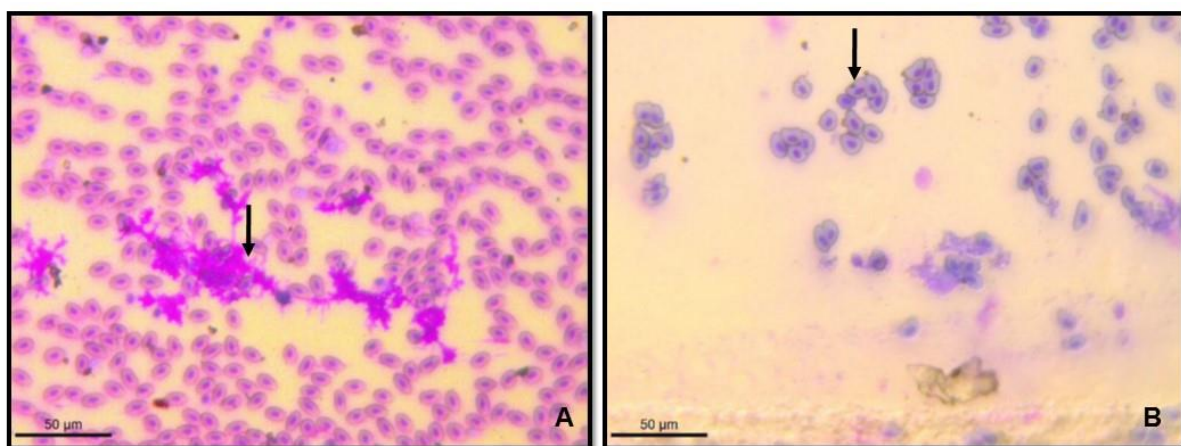


Figura 16: Esfregaços sanguíneos indivíduos tímidos (A) com hifas fungicas (seta) e (B) anisocitose (seta) após contaminação do ambiente. Coradas com Gimsa.

Em relação a contagem de células, não houve diferença estatística no número de eritrócitos entre os perfis de personalidade ($p=0,84$) e nem após a infecção ($p=0,44$). Não encontramos linfócitos suficientes na contagem de células das amostras do controle e não ocorreu diferença entre tímidos e ousados ($0,68$) após a contaminação do ambiente.

As amostras que foram submetidas ao PCR apresentaram amplificação do DNA para *Aeromonas*. Indivíduos tímidos apresentaram bandas maiores do que indivíduos ousados (Figura 17).

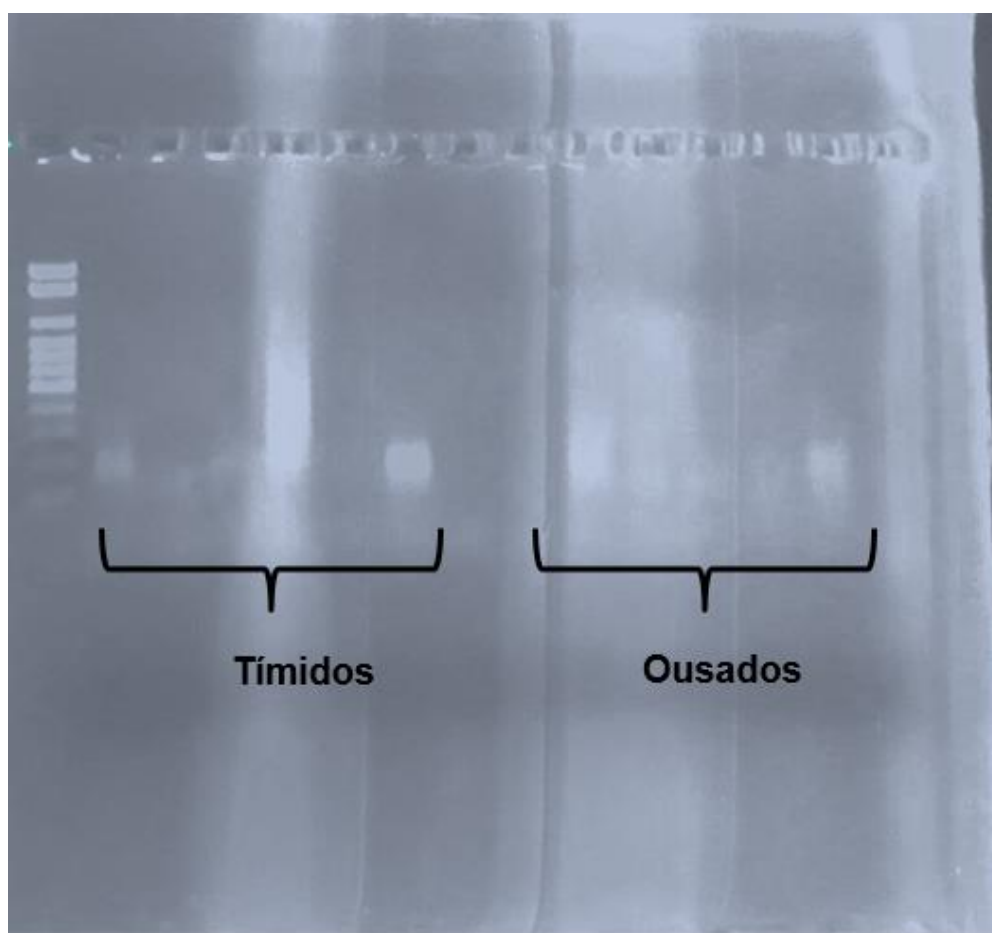


Figura 17: Amplificação em gel de agarose. Da esquerda para direita: primeiro poço para marcador de peso molecular (controle positivo), cinco poços seguintes para tímidos, os demais 5 poços para ousados e último para água (controle negativo).

DISCUSSÃO

Nossos resultados demonstram indivíduos de perfil tímido e ousado reagem fisiológica e comportamentalmente de maneiras distintas, quando levamos em consideração o estímulo estressor provocado pela bactéria.

Ao analisarmos a morfologia celular das lâminas, percebemos alterações celulares e presença de hifas fungicas apenas em indivíduos com perfil tímido, além de bandas mais espessas na amplificação de DNA plasmidial nesse perfil. Tavares-Dias (2009) afirmou que o aumento da suscetibilidade a doenças está ligado aos estressores que os animais são expostos e como o gênero *Aeromonas* muitas vezes se beneficia de populações de peixes enfraquecidas (ALYAHYA et al., 2018), o fato de encontrarmos fungos (oportunistas) apenas no perfil tímido deve ser ressaltado. Além disso, sabe-se que em pacus (*Piaractus mesopotamicus*) a *Aeromonas hydrophila* provocou também provocou anisocitose (CLAUDIANO, 2015) e a mesma alteração dos eritrócitos foi encontrada apenas nos indivíduos tímidos.

Em relação aos parâmetros comportamentais, os perfis de personalidade apresentaram similaridade nas repostas. Ambos os perfis diminuíram o comportamento alimentar após a infecção. Em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) que sofreram estresse de confinamento a alimentação durante 7 dias, também diminuiu tanto indivíduos proativos como reativos (CASTANHEIRA et al., 2013). O comportamento de locomoção não foi alterado em relação aos perfis e tão pouco antes e após a contaminação do ambiente. VERAS e colaboradores (2013) afirmam que o padrão de atividade em teleósteos é plástico e por isso, pode não ser expressivo mesmo em condições adversas. Ainda, a curta exposição ao patógeno pode não ter sido suficiente para deflagrar os sinais mais graves da doença e consequente alteração motora.

Quando analisamos os batimentos operculares, percebemos o aumento da frequência em indivíduos ousados após a contaminação do ambiente, no entanto, estatisticamente não houve diferença significativa. A taxa de ventilação é uma resposta de ação do sistema nervoso simpático em relação ao estresse (BARRETO & VOLPATO, 2011), no entanto, a coloração dos olhos seria um parâmetro mais fidedigno ao estresse. A resposta ao estresse é adaptativa e prepara o organismo

para enfrentar o desafio, mobilizando a energia para locais apropriados com o aumento do batimento opercular (SAPOLSKY, 2004).

Quanto à resposta imune, o número de eritrócitos e linfócitos, não apresentaram as diferenças esperadas. Sabemos que em zebrafish (*Danio rerio*) que não foram desafiados por bactérias, animais proativos apresentam maiores níveis mRNA de IL-1 β (KIRSTEN et al., 2018) e no trabalho de OSTER et al. (2015) com suínos, animais proativos também apresentaram maior expressão de citocinas pro-inflamatórias no dia 0. Porém as diferenças entre os perfis desapareceram no dia 14 (estágio agudo), mas voltaram a aparecer do dia 28 (estágio crônico). Isso poderia justificar a ausência de diferenças em nosso trabalho, uma vez que o período de infecção analisado também foi agudo. Além disso, neste estudo, durante os 28 dias, não houve diferença na relação total do número de leucócitos, linfócitos, monócitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, número de plaquetas, eritrócitos número e no hematócrito, assim como em nossas análises.

Ainda que não haja diferença em relação às variáveis imunológicas, podemos afirmar que houve infecção por *Aeromonas*, uma vez que foi observada a presença de linfócitos, sabemos que houve a ativação da imunidade humoral, já que os linfócitos são responsáveis por reconhecer o antígeno e desenvolver a resposta imune (RANZANI-PAIVA, 2007). Além disso, o fato dos animais terem consumido menos pellets após a introdução da bactéria no ambiente, comprova que houve infecção dos animais, uma vez que a perda de apetite é um dos sinais da septicemia hemorrágica (PLUMB, 1994; AOKI, 1999). As amostras analisadas por PCR demonstraram amplificação do DNA bacteriano, porém, não sabemos se as demais amostras estavam infectadas por *Aeromonas*, uma vez que não foram submetidas à amplificação. Mesmo congelada, a cepa bacteriana continua sofrendo alterações químicas, ainda que de maneira mais lenta, o que pode resultar na perda ou diminuição da viabilidade durante a armazenamento (MALIK & CLAUS, 1987; COLLA & PRENTICE-HERNÁNDEZ, 2003).

Outro ponto que devemos destacar é o uso de técnica de contagem manual para o número de eritrócitos e linfócitos. Durante uma infecção, o número de eritrócitos tende a aumentar devido ao recrutamento de hemácias pelo baço (VERAS et al., 2013), mas isso não foi observado nesse estudo. Atualmente, vem sendo discutido o

uso de contagens automatizadas, no trabalho feito por SELINUMMI e colaboradores (2005), revelou que a correlação é melhor quando as contagens são realizadas pelo software, quando comparadas com a contagem manual. Além disso, o sangue é um tecido adequado para se trabalhar com personalidades, principalmente aliado a técnicas de biologia molecular (MOURÃO, 2013; OSTER et al., 2015; SEBASTIÃO, 2015).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base no que foi apresentado, concluímos que não houve diferença entre perfis tímido e ousado frente à infecção por *Aeromonas hydrophila*. O perfil tímido, por sua vez, apresentou alterações morfológicas características de indivíduos debilitados, o que pode estar relacionado à menor reatividade ao estresse. Dada à importância na biologia básica e na aplicação junto à aquicultura, são necessários estudos complementares nesta área, utilizando técnicas de biologia molecular, como o PCR, além de técnicas automatizadas, como hemograma completo.

REFERÊNCIAS

- ADAMO, S.A. (2004). How should behavioural ecologists interpret measurements of immunity? *Animal Behaviour*, 68, p 1443–1449.
- ALVARENGA, C. M. & VOLPATO, G. L. (1995). Agonistic profile and metabolism in alevins of Nile tilapia. *Physiology & Behavior*, 57 (75-80).
- ALYAHYA, S. A. A., AMEEN, F. B., AL-NIAEEM, K. S. C., AL-SA'ADI, B. A. D., HADI, S. B. & MOSTAFA, A. A. B. E. (2018). Histopathological studies of experimental *Aeromonas hydrophila* infection in blue tilapia, *Oreochromis aureus*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25, 182–185.
- AOKI, T. (1999). Motile Aeromonads (*Aeromonas hydrophila*). In: WOO, P.T.K.; BRUNO, D.W. *Fish Disease*, v.3, p 427-453.
- AUSTIN, B. and AUSTIN, D. A. (1988). Patologia en acuicultura. In: Barja, J. L.; Esteves, A. T. *Enfermedades bacterianas*, Madrid, Caicy, 550 p.
- BARBER, I., MORA, A. B., PAYNE, E. M., WEINERSMITH, K. L. & SIH, A. (2017). Parasitism, personality and cognition in fish. *Behavioural Processes*, 141, p 205–219.
- BARRETO, R. E. & VOLPATO, G. L. (2004). Caution for using ventilatory frequency as an indicator of stress in fish. *Behavioural Processes*, 66, 43–51.
- BARRETO, R. E. & VOLPATO, G. L. (2011). Ventilation rates indicate stress-coping styles in Nile tilapia. *Journal of Biosciences*, 36 (851–855).
- BILLER-TAKAHASHI, J.D & URBINATI, E.C. (2014). Fish Immunology. The modification and manipulation of the innate immune system: Brazilian studies. *Academia Brasileira de Ciências*, 1483-1495, vol.86 no.3, Rio de Janeiro.
- CAMUS, A. C., DURBOROW, R. M., HEMSTREET, W. G., THUNE, R. L. & HAWKE, J. P. (1998). *Aeromonas* bacterial infections – Motile aeromonas septicemia. *Southern Regional Aquaculture Center*, n.478, p.1-4.
- CARVALHO-CASTRO, G.A.; LOPES, C.O.; LEAL, C.A.G.; CARDOSO, P.G.; LEITE, R.C. & FIGUEIREDO, H.C.P. (2010). Detection of type III secretion system genes in

Aeromonas hydrophila and their relationship with virulence in Nile tilapia. *Veterinary Microbiology*, 144:371-376.

CASTANHEIRA, M. F., HERRERA, M., COSTAS, B., CONCEIÇÃO, L. E. C. & MARTINS, C. I. M. (2013). Can We Predict Personality in Fish? Searching for Consistency over Time and across Contexts. *PLOS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062037>.

CASTANHEIRA, M. F., CONCEIÇÃO, L. E. C., MILLOT, S., REY, S., BEGOUT, M. L., DAMSGARD, B., KRISTIANSEN, T., HEOGLUND, E., OVERLI, O. & MARTINS, C. I. M. (2017). Coping styles in farmed fish: consequences for aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 9, 23–41.

CLAUDIANO, G.S. (2015). ASPECTOS DA FISIOPATOLOGIA DA SEPSE EM *Piaractus mesopotamicus* INDUZIDA POR *Aeromonas hydrophila*. Tese (Doutorado em Parasitologia Animal). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp. Jaboticabal, p. 94. 2015.

COLLA, L. M. & PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. (2003). Congelamento e descongelamento – sua influência sobre os alimentos. *Vetor*, Rio Grande, 13: 53-66.

CONRAD, J. L., WEINERSMITH, K. L., BRODIN, T., SALTZ, J.B., & SIH, A. (2011). Behavioural syndromes in fishes: a review with implications for ecology and fisheries management. *Journal of Fish Biology*. 78, 395–435.

DE GRAAF, G., GALEMONI, F. & BANZOUSSI, B. (1996). Recruitment control of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, by the African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell 1822), and the African snakehead, *Ophiocephalus obscurus*. I. A biological analysis. *Aquaculture*, 146(1-2), p.85-100.

DINGEMANSE, N.J & WOLF, M. (2010). Recent models for adaptive personality differences: a review. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. 365, p 3947–3958.

FROST, A. J., WINROW-GIFFEN, A., ASHLEY, P. J., & SNEDDON, L. U. (2007). Plasticity in animal personality traits: does prior experience alter the degree of

boldness? *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274(1608), 333–339. <http://doi.org/10.1098/rspb.2006.3751>

GERLAI, R., FERNANDES, Y. & PEREIRA, T. (2009). Zebrafish (*Danio rerio*) responds to the animated image of a predator: Towards the development of an automated aversive task. *Behavioural Brain Research*, 201 (318–324).

GONTIJO, A. M. M. C., BARRETO, R. E., SPEIT, G., VALENZUELA REYES V. A., VOLPATO G. L. & FAVERO SALVADORI, D. M. (2003). Anesthesia of fish with benzocaine does not interfere with comet assay results. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 534 (175-162).

JACNES-HAMILTON, R., HALL, M. L., BUTTEMER, W.A., MATSON, K. D., SILVA, A.G., MULDER, R. A. & PETERS, A. (2017). Personality and innate immune defenses in a wild bird: Evidence for the pace-of-life hypothesis. *Hormones and Behavior*, 88, p 31–40.

JEMMOTT, J. B. & LOCKE, S. E. (1984). Psychosocial Factors, Immunologic Mediation, and Human Susceptibility to Infectious Diseases: How Much Do We Know? *Psychological Bulletin*, Vol. 95, No. 1, p 78-108.

KIRSTEN, K., FIOR, D., KREUTZZ, L. C. & BARCELLOS, L. J. G. (2018). First description of behavior and immune system relationship in fish. *SCientific Reports*, 8:846. doi:10.1038/s41598-018-19276-3.

KOOLHAAS J. M. (2008). Coping style and immunity in animals: making sense of individual variation. *Brain, Behavior, and Immunity*, 22, p 662–66.

LOCATELLO, L., PIZZOLON, M. & RASOTTO, M.B. (2012). One trait, many signals: Different information on male quality is enclosed within the same trait in a blenny fish. *Naturwissenschaften*, Volume 99, Issue 10, pp 863-867.

LOPES. P.C. (2017). Why are behavioral and immune traits linked? *Hormones and Behavior*, 88, p 52–59.

MALIK, K. A. & CLAUS, D. (1987) Bacterial Culture Collections: Their Importance to Biotechnology and Microbiology, *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 5:1, 137-198, doi: 10.1080/02648725.1987.10647837.

MARSLANDA, A.L., BACHENB, E.A., COHENC, S., RABIND, S & MANUCKA, S.B. (2002). Stress, immune reactivity and susceptibility to infectious disease. *Physiology & Behavior*, 77, 4–5, p 711–716.

MERIGHE, G. K. F., PEREIRA-DA-SILVA, E. M., NEGRÃO, J. A. & RIBEIRO, S. (2004). Efeito da Cor do Ambiente sobre o Estresse Social em Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.33, n.4, p.828-837.

MOURÃO, L.C. (2013). Doenças bacterianas em tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*) cultivadas em sistema intensivo. Trabalho de conclusão de curso (Monografia) - Bacharel em Medicina Veterinária, Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Betim, Minas Gerais. 2013.

OSTER, M., SCHEEL, M., MURÁNI, E., PONSUKSILI, S., ZEBUNKE, M., PUPPE, B. & WIMMERS, K. (2015) The Fight-Or-Flight Response Is Associated with PBMC Expression Profiles Related to Immune Defence and Recovery in Swine. *PLOS ONE*, (1-15). doi:10.1371/journal.pone.0120153.

PLUMB, J.A. (1994). Health maintenance of cultured fish. Principal microbial diseases. *Boca Raton*: CRC. 254p.

RANZANI-PAIVA, M. J. T., PÁDUA, S. B., TAVARES-DIAS, M. & EGAMI, M. I. (2013). Métodos para análise hematológica em peixes. Maringá: *Edurem*.

REALE, D., READER, S. M., SOL, D., MCDOUGALL, P. T. & DINGEMANSE, N. J. (2007). Integrating animal temperament within ecology and evolution. *Biological Reviews*, 82, 291-318.

REY, S., RIBAS, L., MORERA CAPDEVILA, D, CALLOL, A., HUNTINGFORD, F. A., PILARCZYKLL, M., KANDRI, S. & MACKENZIE, S. (2016). Differential responses to environmental challenge by common carp *Cyprinus carpio* highlight the importance of coping style in integrative physiology. *Journal of Fish Biology*, 88, p 1056–1069.

ROMERO, A., SARACENI, P.R., MERINO, S., FIGUERAS, A., TOMAS, J.M. & NOVOA, B. (2016). The Animal Model Determines the Results of Aeromonas Virulence Factors. *Frontiers in Microbiology*. 7:1574.

RUIZ-GOMES, M. L. & HUNTINGFORD, F. A. (2012). Boldness and aggressiveness in early and late hatched three-spined sticklebacks *Gasterosteus aculeatus*. *Journal of Fish Biology*, 81(3):966-76. doi: 10.1111/j.1095-8649.2012.03340.

SAPOLSKY, R. M. (2004). Why zebras don't get ulcers. Third Edition. New York, Henry Holt and Company.

SEBASTIÃO, F.A. (2015). Validação de técnicas moleculares para o diagnóstico de bactérias em peixes, visando redução de tempo e custo. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp. Jaboticabal, 136 f.

SELINUMMI, J., SEPPÄLÄ, J., YLI-HARJA, O. & PUHAKKA, J. A. (2005). Software for quantification of labeled bacteria from digital microscope images by automated image analysis. *BioTechniques*, 39, 06, 859-862.

SIH, A., BELL, A. & JOHNSON, J. C. (2004). Behavioral syndromes: an ecological and evolutionary overview. *Trends in Ecology & Evolution*, 19(7):372-8.

SILVA, G. V. (2010). Caracterização de indivíduos hesitantes e ousados na tilápia-do-Nilo. (Dissertação) Ciências Biológicas – Zoologia, Instituto de Biociências – UNESP, Botucatu, São Paulo.

TAKAHASHI, A., FLANIGAN, M. E., MCEWEN, B. S. & RUSSO, S. J. (2018). Aggression, Social Stress, and the Immune System in Humans and Animal Models. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, vol 12, art 56.

TONS, C.N., ECHEVARRIA, D.J. & JOUANDOT, D.J. A. (2010). Methodological Review of Personality-Related Studies in Fish: Focus on the Shy-Bold Axis of Behavior. *International Journal of Comparative Psychology*, 23, p 1-25.

VERAS, G. C., MURGAS, L. D. S., ZANGERONIMO, M. G., OLIVEIRA, M. M., ROSA, P. V. & FELIZARDO, V. O. (2013). Ritmos biológicos e fotoperíodo em peixes. *Archivos de Zootecnia*, 62, 25-43.

VILCHES, S., URGELL, C., MERINO, S., CHACÓN, M. R., SOLER, L., CASTRO-ESCARPULLI, G., FIGUERAS, M. J. & TOMÁS, J. M. (2004). Complete type III

secretion system of a mesophilic *A. hydrophila* Strain. *Applied and Environment Microbiology*, Washington, v. 70, n. 11, p. 1916-1919.

WILSON A.D.M. & GODIN, J. 2010. Boldness and intermitente locomotion in the bluegill sunfish, *Lepomis macrochirus*. *Behavioral Ecology* 21:57–62.

WOLF, M. & WEISSING, F. J. (2012). Animal personalities: consequences for ecology and evolution. *Trends in Ecology and Evolution*, Vol. 27, No. 8, 452- 462.

ANEXO A



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



Certificado

Certificamos que o projeto intitulado "Susceptibilidade entre Shy-Bold em Tilápia-do-Nilo à *Aeromonas hydrophila*", Protocolo nº 963-CEUA, sob a responsabilidade de **Percília Cardoso Giaquinto**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 9 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)**, nesta data.

Finalidade:	() Ensino	(X) Pesquisa Científica
Vigência do Projeto:	Início: 20/4/2017	Término: 20/1/2018
Espécie/linhagem:	Peixe – <i>Oreochromis niloticus</i>	
Nº de animais:	60	
Peso:	30gr	Idade: 9 meses
Sexo:	Macho e fêmea	
Origem	Biotério de Organismos Aquáticos – Dep. de Fisiologia – Instituto de Biociências – Unesp Câmpus de Botucatu/SP	

Botucatu, 6 de abril de 2017.

Prof. Dr. Bruno Cesar Schimming
Presidente da CEUA



Instituto de Biociências – Diretoria Técnica Acadêmica
Distrito de Rubião Júnior s/n CEP 18618-970 Botucatu SP Brasil
Tel 14 3880 0851 fax 14 3815 3744 e-mail: secda@ibb.unesp.br