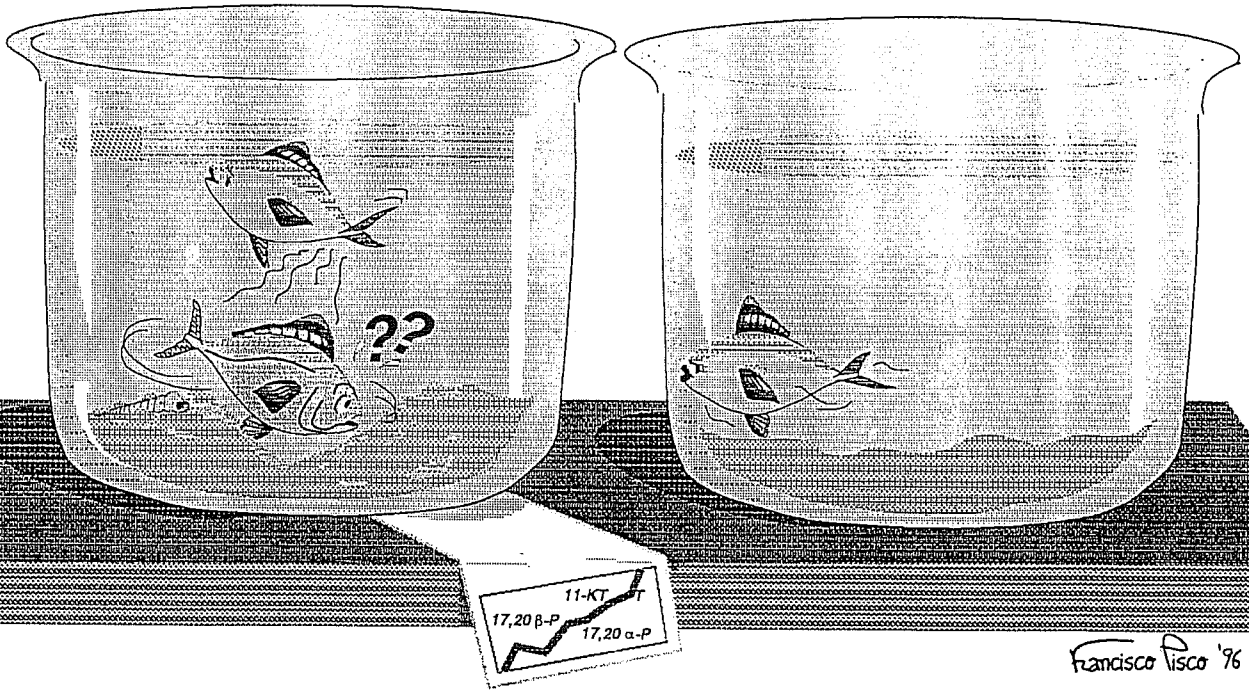


Rita Alexandra Duarte Borges

**INFLUÊNCIA DE ESTÍMULOS SOCIAIS NO
COMPORTAMENTO E NÍVEIS URINÁRIOS DE ESTERÓIDES
SEXUAIS DE MACHOS DE *OREOCHROMIS MOSSAMBICUS*
PETERS (PISCES: CICHLIDAE)**

Tese para obtenção do grau de mestre em Etologia

**I.S.P.A.
1996**



Francisco Pisco '96

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos aqueles que permitiram a realização deste trabalho. Em particular, obrigada:

- Ao Professor Doutor Vítor Almada por tudo o que aprendi nas suas aulas e por ter aceite a orientação deste trabalho.
- Ao Dr. Rui Oliveira pelo bom ambiente das aulas práticas, pelo seu sentido de humor e espetacular apoio e orientação que sempre demonstrou em todos os passos deste trabalho, desde a sua planificação à leitura crítica que permitiu melhorá-lo.
- Ao Professor Doutor Adelino Canário por ter permitido a realização de todo o trabalho de determinação das concentrações hormonais não só colocando à nossa disposição material e reagentes existentes no Laboratório de Fisiologia da Reprodução de Peixes da U.C.T.R.A., mas também pela explicação dos procedimentos experimentais e ajuda na interpretação dos resultados.
- Ao “Mestre” Paulo Vília, que sempre se prontificou a ajudar no laboratório, pela amizade demonstrada e por toda a bibliografia amavelmente cedida.
- À Dr^a Elsa Couto pela paciência ao ensinar-me todos os passos necessários pelas técnicas de separação e RIA.
- À Dr^a Teresa Modesto pela companhia a horas tardias no laboratório.
- À Professora Doutora Teresa Avelar pela organização do Mestrado.
- À Ana Salas e à Céu pela amável cedência de bibliografia.
- Aos meus amigos e colegas de Mestrado que se não existissem teriam de ser inventados:
 - Pli, exímia pescadora e a melhor amiga e companheira de Mestrado, muito para além das portas do ISPA e do prazo de entrega deste relatório. Por todas os diálogos com o olhar, “sandes em pão fixe” e todas as coisas boas.
 - Barbosa, Paulo Pereira, Paulo Marques e Miguel, por terem tornado tão agradáveis e divertidas as noites de “estudo”. Barbosa, obrigada por todos os bolos.
 - Augusta, Bé e Paula Rito, por completarem a mesa no Mestre André.
- À Sandra, grande amiga de longa data por ter participado como elemento obrigatório nas sessões paralelas deste Mestrado. Ainda bem que estás em Lisboa!!
- À Elsa pelas conversas que por serem menos frequentes só ganham em valor. Amiga, desculpa não ter podido ajudar-te nos preparativos...
- Dr^a Xana, desculpa não ter tido tempo para as nossas conversas.
- Ao amigo Francisco, um obrigada especial pelo desenho da contra-capá.
- Miguel, desculpa a rabugice e as invasões sucessivas ao teu espaço; obrigada pela paciência.
- Para os meus pais, não há palavras que cheguem. Obrigada pelo apoio e amizade que sempre manifestaram.
- Ao Gui um obrigada muito especial por me teres ajudado a atingir mais esta etapa. Agora vai sobrar mais tempo para nós.

NOTA: Este Mestrado foi financiado em parte por uma Bolsa de Mestrado da JNICT- Programa Praxis XXI (BM/1301/94).
A Figura representada no cabeçalho e utilizada no texto foi retirada de Boulenger, 1915 (*in* Trewavas, 1983).

RESUMO

A primeira parte do presente trabalho teve como objectivo o estudo da influência de estímulos sociais sobre aspectos comportamentais de machos de *O. mossambicus*. Tentou-se clarificar que tipo de canais sensoriais estão envolvidos na percepção desses estímulos. Para tal, foram sujeitos 13 machos a três situações experimentais com diferentes graus de acesso (total, visual e químico) a uma fêmea e a um macho da mesma espécie. Estímulos visuais parecem ser importantes no reconhecimento sexual e na estimulação da actividade locomotora, escavação de ninho, proximidade e coloração apresentados pelo macho. No entanto as respostas observadas tiveram sempre maior amplitude quando o acesso era total. Embora não tenha sido detectada a influência de estímulos químicos libertos pelas fêmeas, não se eliminou essa hipótese. Na situação de acesso total, estudou-se a interacção entre os dois indivíduos. Apenas se observaram comportamentos sexuais e escavação de ninho na presença de uma fêmea; a frequência de comportamentos agonísticos foi superior na presença de um macho intruso. A segunda parte deste trabalho teve como objectivo o estudo da influência de estímulos sociais nos níveis urinários de esteróides sexuais dos machos de *O. mossambicus*. Na presença de uma fêmea, apenas se verificou um aumento dos níveis de androgénios, Testosterona (T) e 11-Cetotestosterona (11-KT), tendo sido esse aumento mais rápido no último caso. Houve um aumento das correlações entre os níveis desta hormona e a frequência de comportamentos sexuais e a coloração do macho (positivas) e a frequência de comportamentos agonísticos (negativa); na presença de um macho não houve aumento dos níveis hormonais, embora se tenha verificado um aumento da correlação (positiva) entre os níveis de 11-KT e a frequência de comportamentos agonísticos. Propõe-se que a 11-KT poderá activar respostas comportamentais diferentes na presença de estímulos sociais diferentes. Os níveis de progestinas (17,20 α -P e 17,20 β -P) não variaram, ao contrário do que seria de esperar com base em trabalhos anteriores, o que poderá dever-se ao estado de maturação dos indivíduos. As fracções mais representativas dos níveis de progestinas eram as glucuronizadas; estes compostos poderão funcionar como sinalizadores das arenas reprodutivas para as fêmeas conspecíficas.



ÍNDICE

1. Introdução Geral.....	1
2. Influência de Estímulos Sociais no Comportamento.....	2
2.1 Introdução	2
2.2 Metodologia.....	4
2.2.1 Acesso total	5
2.2.2 Acesso visual.....	6
2.2.3 Acesso químico	7
2.2.4 Registo de comportamentos	8
2.2.5 Pontos de amostragem.....	9
2.2.6 Análise estatística	10
2.3 Resultados	12
2.3.1 Actividade locomotora	12
2.3.2 Coloração.....	14
2.3.3 Ninho	17
2.3.4 Comportamentos sexuais.....	19
2.3.5 Comportamentos agonísticos.....	19
2.3.6 Proximidade	21
2.4 Discussão.....	23
3. Influência de Estímulos Sociais nos níveis de Esteróides Sexuais	30
3.1 Introdução	30
3.2 Metodologia.....	34
3.2.1 Extracção de urina.....	35
3.2.2 Determinação das concentrações hormonais	35
3.2.2.1 Desconjugação e extracção	35
3.2.2.2 Radioimunoensaios (RIA).....	36
3.2.3 Análise estatística	37
3.3 Resultados	38
3.3.1 Testosterona.....	38
3.3.2 11-Cetotestosterona	40



3.3.3 17,20 β -P	40
3.3.4 17,20 α -P	43
3.3.5 Correlações entre hormonas e comportamentos	44
3.4 Discussão	47
4. Considerações Finais.....	61
5. Bibliografia	62



1. INTRODUÇÃO GERAL

Oreochromis mossambicus é um ciclídeo originário dos rios e lagos da costa Leste Africana, tendo sido introduzido em várias regiões do Mundo (Fryer & Iles, 1972; Brutton & Bolt, 1975; Trewavas, 1983). Na época reprodutiva, os machos estabelecem territórios onde escavam ninhos que defendem dos outros machos. Formam-se arenas reprodutoras que agregam ninhos de vários machos (Fryer & Iles, 1972; Brutton & Bolt, 1975). As fêmeas prontas a desovar visitam a arena e, após um breve período de cortejamento e postura, abandonam-na com os ovos na boca; a incubação oral dos ovos continua durante 20-22 dias (Brutton & Bolt, 1975). Após o abandono da fêmea, o macho continua a cortejar novas fêmeas que se aproximem do seu território.

As populações naturais de *O. mossambicus* distribuem-se desde o baixo Zambezi até ao Tete e nas partes costeiras de Moçambique; Trewavas (1983) sintetiza os limites da distribuição desta espécie de acordo com diferentes autores. Segundo esta autora, os registos da Tanzânia e Quênia, referem-se a outras espécies. Tendo sido introduzida em Java, foi depois dispersa por quase todos os países tropicais e subtropicais. Actualmente a sua distribuição por lagoas e aquários é vasta, não só no continente Africano, havendo em alguns locais, populações silvestres (e.g. Califórnia). Em muitos locais, é mantida juntamente com outras espécies.

A época de reprodução varia, mas nas latitudes tropicais em que foi introduzida, a reprodução ocorre todo o ano (Trewavas, 1983).

A facilidade de manutenção desta espécie, torna-a adequada para experiências de laboratório. Por isso, tem sido utilizada com alguma frequência em estudos de fisiologia e de comportamento.

Com um sistema social em que há interacções permanentes entre os indivíduos, é de esperar que os estímulos sociais possam ser importantes na modulação dos comportamentos apresentados. É objectivo deste trabalho o estudo do modo como diferentes estímulos sociais influenciam alguns aspectos do comportamento de machos de *O. mossambicus* e uma maior compreensão de quais os canais sensoriais envolvidos na percepção dos mesmos. Também se pretende estudar a influência de estímulos sociais nos níveis urinários de androgénios (11-KT e T) e progestinas (17,20 α -P e 17,20 β -P) dos machos, esteróides que



estão de algum modo implicados na regulação de aspectos da reprodução de muitos teleósteos, incluindo a regulação de comportamentos.

2. INFLUÊNCIA DE ESTÍMULOS SOCIAIS NO COMPORTAMENTO

2.1 INTRODUÇÃO

O reconhecimento social inclui processos de reconhecimento ao nível inter e intraespecífico, sexual e individual num grande número de espécies de peixes, possuindo cada espécie vários canais sensoriais que poderão ser utilizados (Myrberg Jr., 1980).

No sistema social de *O. mossambicus*, em que as interacções entre os indivíduos atingem uma certa complexidade, são necessárias formas precisas de comunicação que poderão envolver a integração de várias modalidades sensoriais (Myrberg Jr., 1980). Os canais sensoriais envolvidos na percepção de estímulos sociais devem ser interpretados num contexto ecológico, face às condicionantes do meio.

Na maioria das espécies, a visão parece ser a principal modalidade sensorial (Aronson, 1957; Myrberg Jr., 1980). Segundo Fryer & Iles (1972), esta é a principal forma de comunicação nos Ciclídeos, embora outras formas possam estar envolvidas. Nas arenas, devido à proximidade entre os indivíduos, é óbvia a importância de estímulos visuais.

A grande variedade de cores e formas encontradas entre os peixes levou alguns autores a interpretar o seu possível significado. Muitos concluíram que essas características podem ser importantes indicadores do sexo e estado fisiológico do indivíduo (Myrberg Jr., 1980). Os sinais visuais na comunicação dos Ciclídeos podem envolver alterações de coloração; também ao defenderem os ninhos os machos adquirem uma coloração intensa que os torna conspícuos para as fêmeas. A escavação de ninhos pode também ser uma forma de comunicação para indivíduos da mesma espécie. Podem também basear-se em comportamentos específicos a que a coloração e a forma surgem associadas (Fryer & Iles, 1972).

Segundo Fryer & Iles (1972), outras formas de comunicação entre os Ciclídeos envolvem a produção de sons, o tacto, que é utilizado pela maioria das espécies durante a



corde, e a libertação de substâncias químicas. Os Ciclêdeos utilizam formas de comunicação química, por exemplo, no reconhecimento das ninhadas. Por vezes é também importante a libertação de feromonas.

Silverman (1978 a, b) estudou a influência de estímulos sociais sobre vários aspectos da reprodução de *O. mossambicus*. Concluiu haver uma relação entre estímulos sociais emitidos pelas fêmeas e algumas características fisiológicas associadas à reprodução e à frequência de comportamentos sexuais. Este autor salienta a importância de estímulos visuais mas também de outros estímulos sensoriais, visto que a influência dos estímulos sociais sobre os parâmetros estudados é maior quando o acesso ao estímulo é total, do que quando é apenas visual. Nada conclui quanto à natureza dos outros estímulos, embora proponha a existência de possíveis feromonas.

Há cada vez maior evidência do papel de feromonas na reprodução de peixes (ver revisões por Colombo *et al.*, 1982; Liley, 1982; Liley & Stacey, 1983; Stacey *et al.*, 1987; Scott & Vermeirssen, 1994; Scott *et al.*, 1994).

As respostas às feromonas podem induzir alterações fisiológicas cujos resultados podem permanecer a longo prazo (efeito *primer*) ou provocar alterações imediatas no comportamento (efeito *releaser*) (Stacey, 1991; Jobling, 1995). Qualquer destas acções das feromonas sexuais verifica-se quase sempre nos últimos estádios do ciclo reprodutivo (Jobling, 1995).

Colombo *et al.* (1982) referem várias espécies em que a libertação de feromonas por fêmeas altera comportamentos como a atracção de machos, orientação, estimulação do cortejamento, etc. Kim & Liley (não publ. *in* Liley, 1982) concluíram que em *O. mossambicus* fêmeas ovuladas emitiam feromonas sexuais que alteravam comportamentos nos machos. Assim, segundo Liley (1982) neste grupo, pela estimulação da actividade sexual do macho, a feromona sexual da fêmea sincronizaria o comportamento reprodutivo na presença de ovos maduros, prontos para a fertilização.

Na sequência dos trabalhos de Silverman (1978a,b) pretendemos, na primeira parte deste trabalho, clarificar a importância relativa de estímulos visuais e químicos emitidos pelas fêmeas e machos de *O. mossambicus* na alteração de alguns comportamentos exibidos pelos machos.



2.2 METODOLOGIA

Foram utilizados 13 machos da espécie *Oreochromis mossambicus* (Peters). Os peixes foram obtidos a partir de descendentes de um stock original do Rio Incomati (Moçambique), em reprodução desde os anos 70 no Aquário Vasco da Gama (Lisboa, Portugal). Os indivíduos foram mantidos em dois aquários com capacidade de 216 l no ISPA, com idênticas condições de arejamento, num regime de fotoperíodo de 12D:12N e a uma temperatura de $(25\pm 1)^{\circ}\text{C}$. Cada aquário reservatório contém uma população com indivíduos de ambos os sexos ($n=14$ e $n=13$ respectivamente). Em ambos os reservatórios o fundo é coberto com areia (*c.a.* 7cm), permitindo aos machos a escavação de ninhos. Os machos utilizados tinham um comprimento standard variável entre 10.7 cm e 14.4 cm e as fêmeas entre 8.5 cm e 12.25 cm. Todos os indivíduos foram alimentados diariamente com ração comercial para peixes tropicais de aquário. Quando estavam a ser utilizados na experiência, a alimentação dos indivíduos foi feita sempre após as observações para não interferir com as mesmas, visto que há alterações comportamentais e de coloração quando se alimentam (Neil, 1964; Pinheiro, 1980).

Em todas as situações experimentais as condições de temperatura e fotoperíodo utilizadas foram as já descritas. Cada aquário utilizado tinha uma camada de areia no fundo com $4\text{ cm}\pm 1\text{ cm}$ de altura que foi sempre alisada antes da introdução dos indivíduos.

Cada macho utilizado foi sujeito, antes de cada observação, a um período de isolamento social de *c.a.* 50 horas com o objectivo de eliminar todos os estímulos sociais que pudessem influenciar quer os comportamentos a observar, quer os níveis endócrinos.

Numa fase inicial, foram observadas interacções entre machos e entre machos e fêmeas, na tentativa de determinar quais os parâmetros comportamentais a registar e os respectivos tempos de observação.

Sendo uma espécie com dimorfismo sexual pronunciado, os machos são facilmente distinguíveis das fêmeas pela sua maior dimensão, formato da cabeça e barbatana dorsal, além dos padrões de coloração que apenas estes exibem (Neil, 1964)

Devido ao reduzido número de machos maduros disponíveis, todos os indivíduos nessas condições foram sujeitos a todos os tratamentos. Tentou-se que o mesmo indivíduo não sofresse qualquer tipo de manipulação entre tratamentos, durante um intervalo de tempo mínimo de 15 dias. Após a sua primeira utilização, os machos foram marcados



(quando era impossível o reconhecimento a partir de marcas naturais) e medidos. A marcação foi efectuada cortando raios nas barbatanas. A posição do corte efectuado variava, permitindo assim o reconhecimento individual. Este procedimento foi o mais rápido possível, após o que os machos eram novamente introduzidos no respectivo aquário reservatório. Repetiu-se a marcação sempre que se considerou necessário.

Todas as fêmeas utilizadas como estímulo foram injectadas intraperitonealmente com 200µl de solução salina contendo 5µg de des-Gli10, [D-Ala6]-Hormona Libertadora da Hormona Luteinizante etilamida (Sigma), hormona que estimula a maturação das gónadas, tornando-as sexualmente receptivas. As fêmeas eram então isoladas durante 50h, de qualquer estimulação por machos. Considerámos este tempo de isolamento suficiente para a acção da LHRH por ser semelhante ao utilizado noutros trabalhos (e.g.Oliveira *et al.*, 1996). Por outro lado, por vezes aconteceu que as fêmeas após o isolamento, continham ovos na boca, não fertilizados.

2.2.1 Acesso total

Nesta situação experimental, cada macho foi sujeito a três tratamentos quando recebeu respectivamente como estímulo uma fêmea, um macho, ou nenhum estímulo (controle). Foram utilizados 2 aquários com capacidade de 122 l. As paredes laterais e de fundo de cada aquário encontravam-se forradas por fora com plástico preto opaco; no vidro da frente de cada um foi desenhada externamente uma quadrícula com 32 células (8x4) de dimensões 14 cm x 7.5 cm.

O macho a ser observado era colocado no aquário antes do isolamento; após esse período, era introduzido o estímulo (macho ou fêmea) no mesmo aquário (Fig. 2.1).

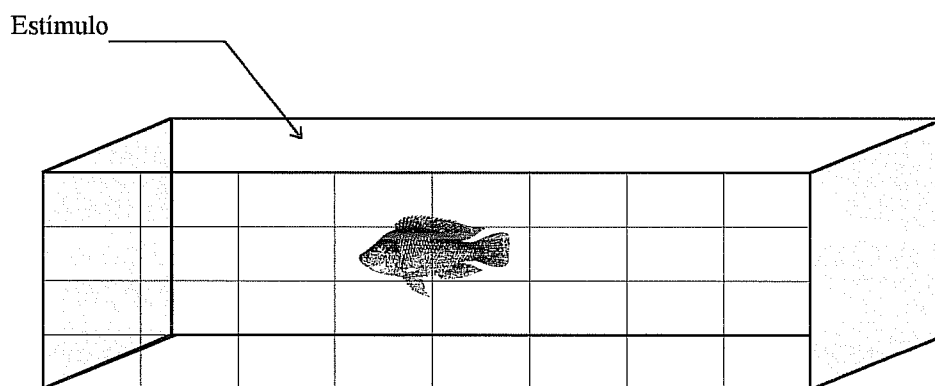


Figura 2.1: Esquema da situação experimental de acesso total: a seta representa o final do período de isolamento, quando se introduz outro indivíduo no aquário.



Os indivíduos-estímulo utilizados foram retirados do aquário reservatório ao mesmo tempo que os machos a observar. Os machos utilizados como estímulo eram retirados do aquário reservatório a que não pertencia o macho a testar, de modo a evitar a influência de interações prévias no reservatório. Tentámos utilizar como intrusos indivíduos adultos de igual ou menor dimensão que o macho a testar. Quando foi introduzido o estímulo, durante um período de 10 minutos, registaram-se:

- i) Latência:** o tempo decorrido até a aproximação do macho à fêmea ou vice-versa.
- ii) Comportamentos sexuais:** registou-se continuamente a frequência de comportamentos sexuais: observaram-se quais os comportamentos exibidos, bem como a sequência dos mesmos. Registou-se ainda a posição no aquário em que cada comportamento era exibido. Consideraram-se os comportamentos de *tilting*, *jerking*, *leading*, *quivering*, *pit circling*, descritos com pormenor por Neil (1964).
- iii) Escavação do ninho:** no mesmo período, registámos a frequência de escavação do ninho. No entanto, apesar de haver na maior parte das vezes aumento das dimensões do ninho, raramente se observou este comportamento, não tendo sido analisados estes dados.
- iv) Comportamentos agonísticos:** registou-se a frequência de perseguições e investidas durante a observação focal referida.
- v) Proximidade:** Durante um período total de dois minutos registou-se, de 10 em 10 segundos, a posição do macho e do intruso na quadrícula. Este tipo de amostragem apenas foi possível com o auxílio de sinais sonoros previamente gravados, com a periodicidade indicada. Como medida da proximidade, considerámos o número de vezes, em cada período de amostragem, que os dois indivíduos se encontravam na mesma célula da quadrícula ou numa adjacente.

2.2.2 Acesso visual

Em cada experiência foram utilizados dois aquários com capacidade de 33 l, espaçados lateralmente por 2 cm a 3 cm; em cada aquário as condições de temperatura, luz e arejamento eram idênticas às descritas para os reservatórios. A parede de fundo de cada aquário encontrava-se forrada externamente com plástico preto, bem como as paredes laterais não adjacentes ao outro aquário; o termostato foi colocado em cada aquário, na



parede lateral forrada (Fig. 2.2). A quadrícula desenhada tinha 12 células (4x3) de dimensões 12 cm x 4 cm. Num dos aquários, o macho era colocado antes do período de isolamento. Durante esse período, havia uma cartolina preta a separar os dois aquários. Cada macho foi também sujeito a uma situação controle (em que o aquário tinha as mesmas dimensões e condições, sendo forrado em ambas as paredes laterais, ou não se retirava a cartolina).

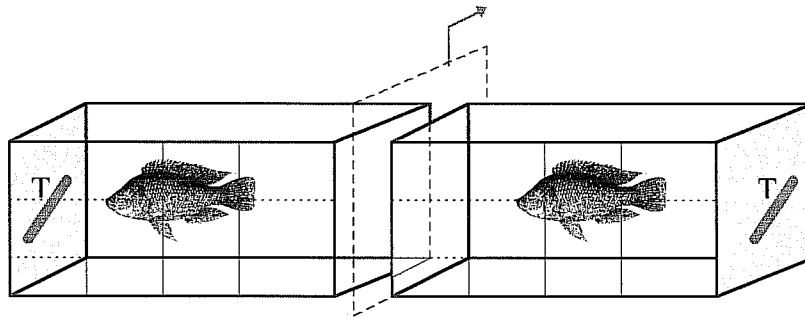


Figura 2.2: Esquema da situação experimental de acesso visual; a seta representa o final do período de isolamento (quando se retira a cartolina, representada a tracejado). T, termostato.

No início de cada observação, a fêmea era introduzida no aquário vizinho ao do macho e era retirada a cartolina, permitindo ao macho observar a fêmea e vice-versa. Cada macho foi testado quando observava uma fêmea do lado esquerdo e quando essa estimulação se encontrava do lado direito, respectivamente. Quando o estímulo foi um macho, foi-nos possível a observação simultânea do macho com estímulo à esquerda e à direita respectivamente (cada sujeito servia simultaneamente de estímulo ao macho do aquário vizinho).

Registou-se o número de vezes que cada macho foi observado em cada uma das 4 secções verticais do aquário (cada uma resultante da adição de três células), que traduziam a distância ao termostato e conseqüente proximidade ao estímulo.

2.2.3 Acesso químico

Nesta situação apenas se testou a influência de estímulos químicos eventualmente emitidos por fêmeas.

Os aquários utilizados tinham as mesmas dimensões, quadrícula e condições internas dos utilizados para o estudo da estimulação visual. Todas as paredes dos aquários excepto a da frente encontravam-se forradas externamente com plástico preto. O macho era colocado durante o período de isolamento num aquário, após o que era transferido para um aquário



idêntico que tinha servido para o isolamento de duas fêmeas, do qual haviam sido previamente retiradas (Fig. 2.3). Estas fêmeas eram normalmente utilizadas como estímulos nas situações de acesso total e visual. Quando foi sujeito à situação controle, após o período de isolamento, o macho era deslocado para outro aquário igual, com água limpa.

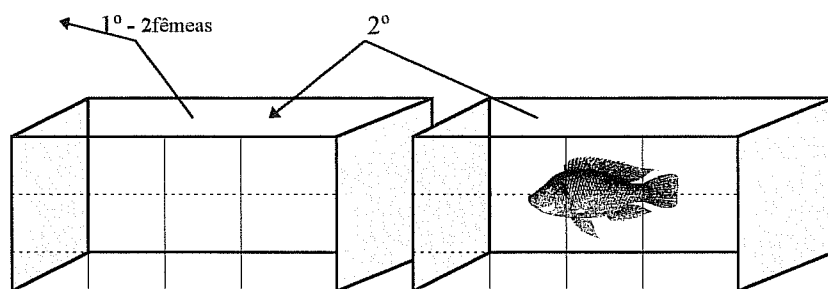


Figura 2.3: Esquema da situação experimental de acesso químico. As setas representam o final do período de isolamento (passagem para a água em que estiveram duas fêmeas).

2.2.4 Registo de comportamentos

Os comportamentos referidos em seguida, foram registados nas três situações experimentais já referidas. Foi realizada amostragem focal-animal (*c.f.* Altmann, 1974).

Os registos foram feitos directamente para grelhas apropriadas. As observações foram efectuadas no final do período de isolamento e em vários pontos amostrais ao longo do tempo que serão indicados em 2.2.5. Todas as observações foram feitas entre as 9h30min e as 19h30min.

Dimensão do ninho: Registaram-se as medidas aproximadas do diâmetro e profundidade de cada ninho, encostando uma régua transparente ao vidro do aquário; considerando que os ninhos escavados são cónicos, determinou-se o volume do cone invertido existente em cada caso; sempre que havia mais do que um ninho, somaram-se os respectivos volumes.

Coloração: Podendo variar a coloração entre uma coloração neutra que se confunde com a areia e a cor preta tipicamente exibida pelos machos quando defendem o ninho (Neil, 1964), atribuiu-se uma classificação arbitrária de 0 a 4 às diferentes tonalidades, de modo a permitir classificá-las numa escala ordinal (consoante o grau de pigmentação): as colorações consideradas tentam obedecer às descritas por Neil (1964): o Neutro, a série dos cinzentos, (*Dark series c.f.* Neil) e o Preto. Pinheiro (1980) descreve os mesmos padrões com pormenor. Assim, foi atribuída a seguinte classificação: 0=Neutro; 1=Cinzento1; 2=Cinzento2;



3=Cinzeno3; 4=Preto. Cada coloração exibida foi classificada de acordo com a escala anterior; às colorações consideradas intermédias, ou quando havia dúvidas entre dois daqueles valores, foi ponderado um peso intermédio (incremento mínimo de 0.25 valores).

Actividade locomotora: Em cada ponto de amostragem, durante um período de 2 minutos, observou-se continuamente o macho, tendo-se registado o número de vezes que a boca do mesmo atravessou linhas da quadrícula (cada célula da quadrícula tinha uma dimensão semelhante ou ligeiramente inferior à dimensão do corpo dos machos).

2.2.5 Pontos de amostragem

Os pontos de amostragem considerados para cada parâmetro comportamental descrito em cada situação experimental, encontram-se esquematizados nas Tabelas 2.1 a 2.3:

Tabela 2.1: Pontos de amostragem de comportamentos de machos com acesso total ao estímulo. t0=final do isolamento; t0'= após introdução do estímulo; os restantes pontos referem-se ao tempo passado após a introdução do estímulo.

Acesso total	t0	t0'	30'	1h	2h	6h	>24h
Act.Locom.	♦		♦	♦	♦	♦	♦
Coloração	♦	♦	♦	♦	♦	♦	♦
Vol. Ninho	♦	♦	♦	♦	♦	♦	♦
Latência		♦					
Sexuais		♦	♦	♦	♦	♦	♦
Agonísticos		♦	♦	♦	♦	♦	♦
Proximidade			♦	♦	♦	♦	♦

NOTA: Devido à morte de um peixe macho quando era intruso, provocada pelas interações com o macho residente, optámos pela separação dos dois machos sempre que a intensidade das interações agonísticas o justificasse. Assim, raramente foi possível a observação da interacção entre machos para além das duas horas.

Tabela 2.2: Pontos de amostragem de comportamentos de machos com acesso visual ao estímulo. t0=final do isolamento; t0'= após introdução do estímulo; os restantes pontos referem-se ao tempo passado após a introdução do estímulo.

Acesso visual	t0	t0'	30'	1h	2h	6h	>24h
Act.Locom.	♦		♦	♦	♦	♦	♦
Coloração	♦	♦	♦	♦	♦	♦	♦
Vol. Ninho	♦	♦	♦	♦	♦	♦	♦
Proximidade	♦		♦	♦	♦	♦	♦



Tabela 2.3: Pontos de amostragem de comportamentos de machos com acesso químico ao estímulo. t0=final do isolamento; t0'= após introdução do estímulo; os restantes pontos referem-se ao tempo passado após a introdução do estímulo.

Acesso químico	t0	t0'	30'	1h	2h	6h	>24h
Act.Locom.	♦					♦	♦
Coloração	♦	♦	♦	♦	♦	♦	♦
Vol. Ninho	♦	♦	♦	♦	♦	♦	♦

Nem sempre nos foi possível utilizar o mesmo desenho experimental para os mesmos parâmetros nas três situações. Isto deveu-se ao facto de se ter tentado rentabilizar ao máximo os tempos para observação, visto que por vezes decorriam simultaneamente as várias situações.

2.2.6 Análise estatística

Optou-se pela utilização de métodos estatísticos não paramétricos dado que na maioria dos casos nem a transformação dos dados permitia o cumprimento dos pressupostos para uma análise paramétrica. A homogeneidade da variância foi testada utilizando o Teste de Levene; calculou-se também o índice de correlação entre a média e o desvio padrão.

Para se testar se havia um efeito da posição em que era observado o estímulo visual, testaram-se as diferenças entre os comportamentos observados quando o sujeito observava um macho do lado esquerdo e direito ou quando observava uma fêmea do lado esquerdo e direito, respectivamente. Para tal foram utilizados testes de Wilcoxon para cada ponto de amostragem e para cada tipo de estímulo. Não se tendo encontrado diferenças significativas para a maioria dos casos analisados, as análises posteriormente realizadas apenas consideraram as situações em que o estímulo se encontrava do lado esquerdo. Optou-se pela utilização destes valores por ter sido esta a primeira situação experimental a ser realizada (no caso do estímulo ser uma fêmea).

Nas situações de acesso total e visual ao estímulo, verificou-se uma grande variabilidade nas dimensões do ninho registadas no tempo t0. Assim, determinou-se para cada hora e situação um valor de incremento do ninho em relação ao valor inicial (subtraindo ao valor observado em cada hora, o valor apresentado em t0). Estes incrementos foram comparados para cada hora entre os diferentes tipos de tratamento, através de testes de Friedman ou Wilcoxon, quando se tratavam de comparações entre três



ou duas situações, respectivamente (*c.f.* o que já foi descrito). Na situação de estimulação química, não foi necessário este procedimento visto que o macho mudava de aquário; nas comparações temporais excluíram-se os valores observados em t_0 .

Para testar a existência de diferenças na actividade locomotora, incremento do ninho e coloração, utilizaram-se testes de Friedman na comparação entre os três tratamentos (com macho, com fêmea, controle); para os pontos de amostragem em que não houve número suficiente de observações com macho, ou quando apenas se pretendia comparar duas situações, utilizaram-se testes de Wilcoxon. Testou-se para cada situação a variação temporal do comportamento considerado através de testes de Friedman. Fizeram-se comparações *a posteriori* para os testes de Friedman (*c.f.* Siegel & Castellan Jr., 1988) para se determinar entre que variáveis havia diferenças.

Para cada situação experimental apresentada, contou-se também o número de peixes que escureceu tendo-se comparado os valores observados para o estímulo fêmea, controle (e macho, no caso de estímulos totais ou apenas visuais) para cada hora, através de testes de χ^2 .

Para se testar a aproximação dos machos aos estímulos visuais, em cada uma das situações e para cada hora, somou-se o número de observações de cada indivíduo em cada uma das quatro células que traduziam a distância ao estímulo. Estes valores foram então testados através de testes de χ^2 .



2. 3 RESULTADOS

As diferenças significativas para $p < 0.05$ e para $p < 0.01$, estão assinaladas por * e ** respectivamente.

2.3.1 Actividade locomotora

A visualização de outro indivíduo num aquário adjacente provoca um aumento na actividade locomotora dos machos (Fig. 2.5). No entanto, quando estes têm acesso total ao estímulo, o aumento da actividade locomotora é ainda maior, sendo máxima após a introdução de um macho, em que aumenta para um valor superior ao dobro do valor inicial (Fig. 2.4). Os estímulos químicos não parecem ter influência: pela análise das Tabelas 2.4 e 2.5 verifica-se que apesar de haver uma variação significativa, nunca há diferença (nos pontos amostrados) em relação ao controle e os valores são sempre inferiores às outras duas situações (Fig. 2.6). Em qualquer hora, a presença de outro indivíduo no aquário ou o acesso a estímulos visuais, provoca uma maior actividade nos machos em relação à situação controle. Curiosamente, até às duas horas de estimulação, a estimulação por um macho apenas parece ser mais eficaz do que por uma fêmea no aumento da actividade, quando o acesso é total. Quando é apenas visual tal só acontece com o continuar da estimulação, embora nunca sejam atingidos valores tão elevados quanto no acesso total.

No entanto, tanto com estímulos totais como apenas visuais, até 1h de estimulação, apenas é significativa a diferença entre as situações com macho e controle, embora nos visuais o aumento da actividade locomotora quando estimulados por uma fêmea seja maior do que no controle. Às 2h e 6h, já se encontram diferenças significativas entre as situações com fêmea e controle, o que deixa de acontecer com a continuação da estimulação (em ambos os casos houve um aumento da actividade locomotora do controle). Machos que vêem outro macho continuam a ter uma actividade significativamente superior ao controle.

Apesar de o padrão de variação quando vêem uma fêmea e quando vêem um macho (pelo menos até às duas horas) ser semelhante ao que apresentam quando têm acesso total, nunca são atingidos valores de actividade locomotora tão elevados como na primeira situação.

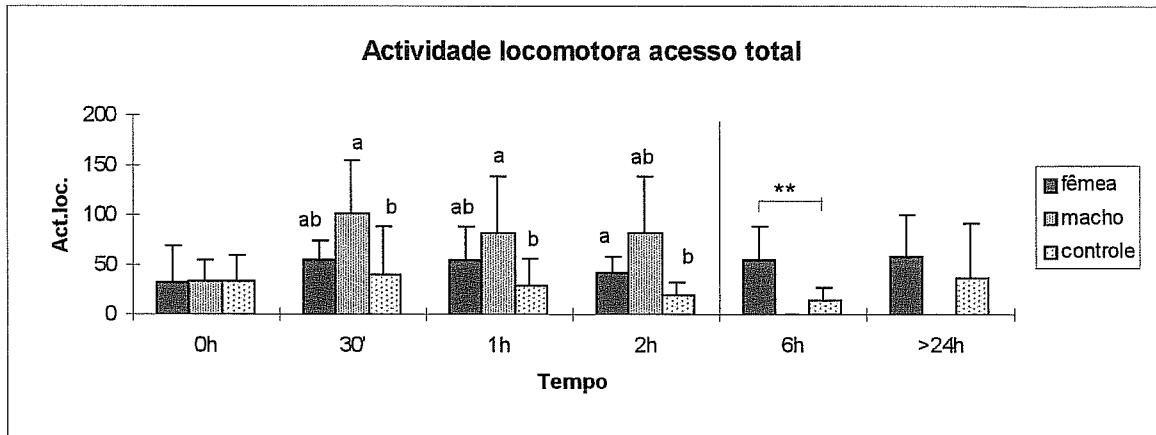


Figura 2.4: Actividade locomotora média apresentada pelos machos na presença de diferentes tipos de estímulos (fêmea, macho, controle). As barras representam o desvio padrão. Os valores dos testes de Friedman estão representados na Tabela 2.4. Para cada hora, as letras diferentes representam diferenças significativas nas comparações a posteriori para $p < 0.05$; às 6h, $z = 2.60$, $p = 0.009$ ($n = 10$); para $>24h$, $z = 1.68$, $p = 0.09$ ($n = 10$). Quando não há letras, todo o grupo é homogêneo.

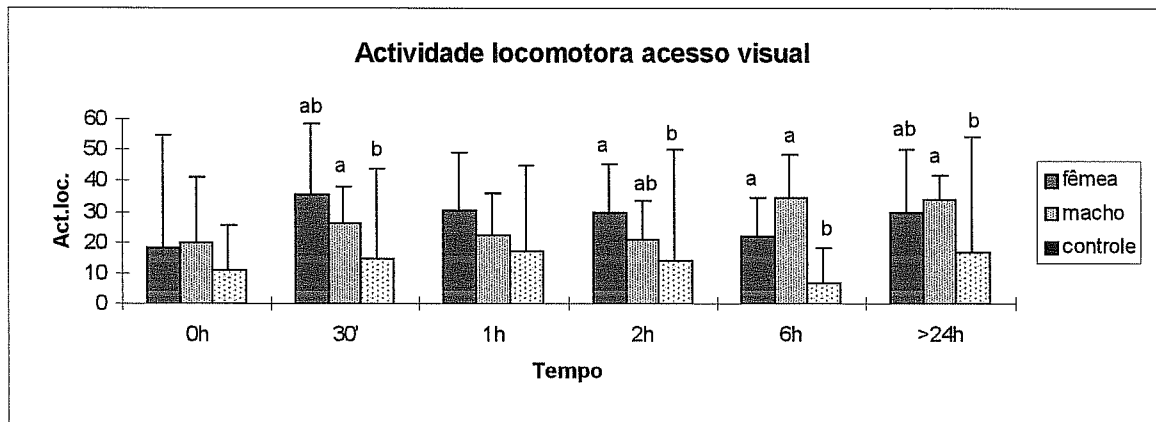


Figura 2.5: Actividade locomotora média apresentada pelos machos quando vêem diferentes tipos de estímulos (fêmea, macho, controle). As barras representam o desvio padrão. Os valores dos testes de Friedman estão representados na Tabela 2.4. Para cada hora, as letras diferentes representam diferenças significativas nas comparações a posteriori para $p < 0.05$. Quando não há letras, todo o grupo é homogêneo.

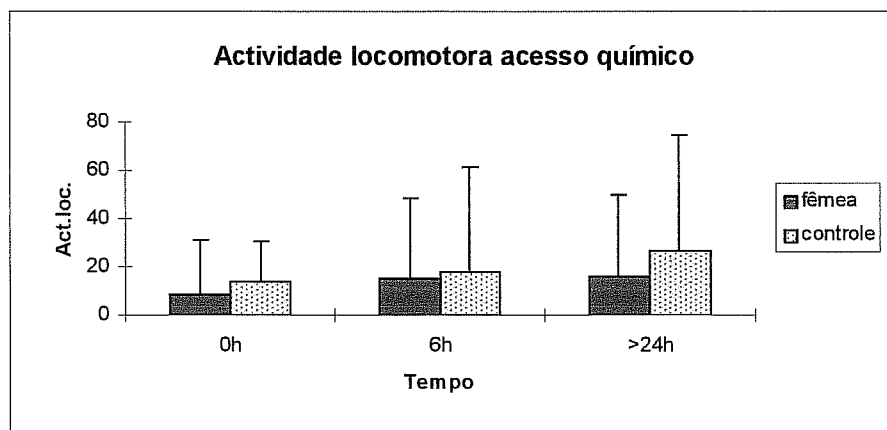


Figura 2.6: Actividade locomotora média apresentada pelos machos na água em que estiveram duas fêmeas ou quando são controle. As barras representam o desvio padrão. Os resultados dos testes de Wilcoxon estão representados na Tabela 2.4.



TABELA 2.4: Resultados da ANOVA de Friedman para a actividade locomotora do macho nas situações de acesso total e visual e do teste de Wilcoxon na situação de acesso químico.

Hora	TOTAL			VISUAL			QUÍMICO			
	N	χ^2 Friedman	p<	N	χ^2 Friedman	p<	N	T	Z	p
0h	6	0.78	0.68	10	2.46	0.29	12	11.00	0.98	0.33
30'	6	7.00	0.03 *	10	6.51	0.038 *				
1h	5	7.60	0.02 *	10	5.28	0.07				
2h	4	6.50	0.04 *	10	10.4	0.005 **				
6h				10	13.28	0.001 **	12	14.50	1.32	0.18
>24h				10	9.8	0.007 **	12	8.00	1.40	0.16

TABELA 2.5: Resultados da ANOVA de Friedman para a actividade locomotora ao longo do tempo, para cada tratamento; quando o estímulo é um macho com acesso total, apenas se considera até às 2h.

Trata- mento	TOTAL			VISUAL			QUÍMICO		
	N	χ^2 Friedman	p<	N	χ^2 Friedman	p<	N	χ^2 Friedman	p<
c/ fêmea	11	9.61	0.087	11	13.14	0.02 *	12	8.43	0.01 **
c/ macho	6	7.40	0.060	10	11.08	0.05 *			
controle	12	8.34	0.139	11	4.90	0.43	13	0.93	0.63

Os resultados apresentados na Tabela 2.4 indicam-nos que há em quase todos os pontos de amostragem diferenças significativas na actividade locomotora entre os três tratamentos. Esta diferença deve-se quase sempre a uma menor actividade quando controle do que nas outras duas situações.

2.3.2 Coloração

Quando sujeitos à introdução de uma fêmea no aquário, parece haver um escurecimento dos machos (Fig. 2.7): a coloração média a qualquer hora após a introdução da fêmea é sempre mais escura do que a inicial. No entanto, só há diferença significativa em relação à coloração do controle, às 6h. A coloração é sempre mais escura na presença de uma fêmea do que na presença de um macho, até às 2h de interacção. Há uma variação temporal (até às duas horas) da coloração significativa, na presença de um macho, que se traduz num ligeiro escurecimento quando é introduzido o macho intruso no aquário, adquirindo em seguida uma coloração mais clara do que a inicial. Quando apenas têm acesso visual à fêmea (Fig. 2.8), o escurecimento é menos acentuado, e nunca é atingido o mesmo grau de intensidade que se verifica quando o acesso é total. No entanto, parece haver uma variação significativa na coloração do controle (Tabela 2.7).

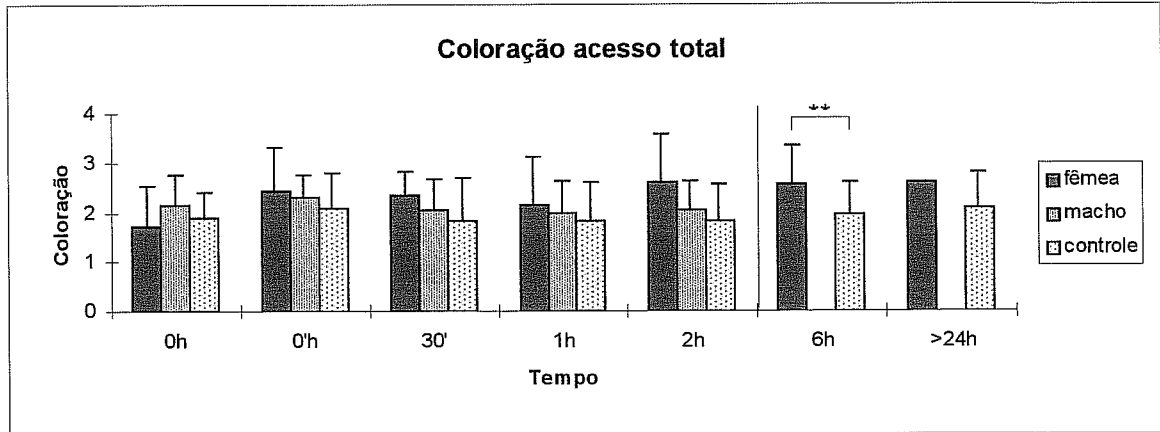


Figura 2.7: Variação da coloração média dos machos na escala de 0(neutro) a 4(preto) na presença de diferentes tipos de estímulos (fêmea, macho, controle). As barras representam o desvio padrão. Os valores dos testes de Friedman estão representados na Tabela 2.6. Para cada hora, as letras diferentes representam diferenças significativas nas comparações a posteriori para $p < 0.05$; às 6h, $z = 2.18$, $p = 0.029$ ($n = 13$); para $>24h$, $z = 1.66$, $p = 0.097$ ($n = 13$).

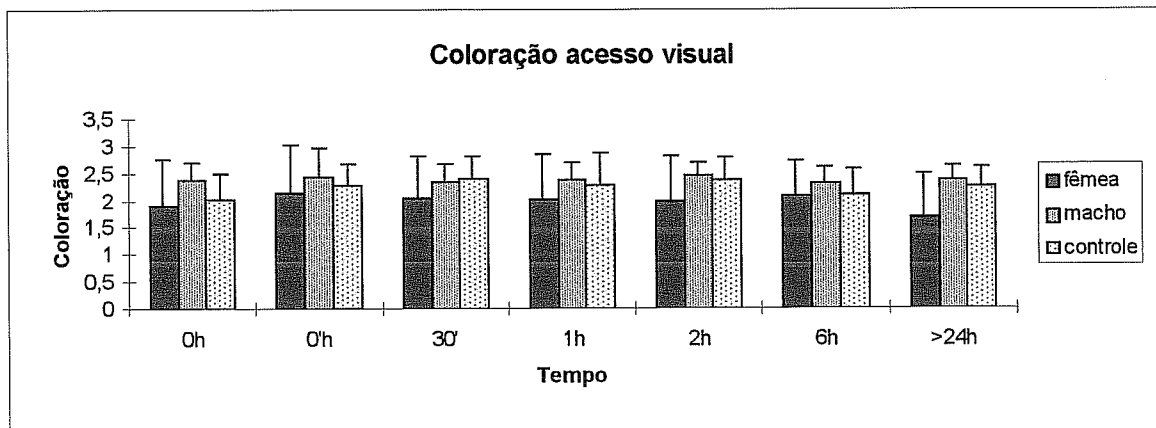


Figura 2.8: Variação da coloração média dos machos na escala de 0(neutro) a 4(preto) quando vêem diferentes tipos de estímulos (fêmea, macho, controle). As barras representam o desvio padrão. Os valores dos testes de Friedman estão representados na Tabela 2.6. Para cada hora, as letras diferentes representam diferenças significativas nas comparações a posteriori para $p < 0.05$.

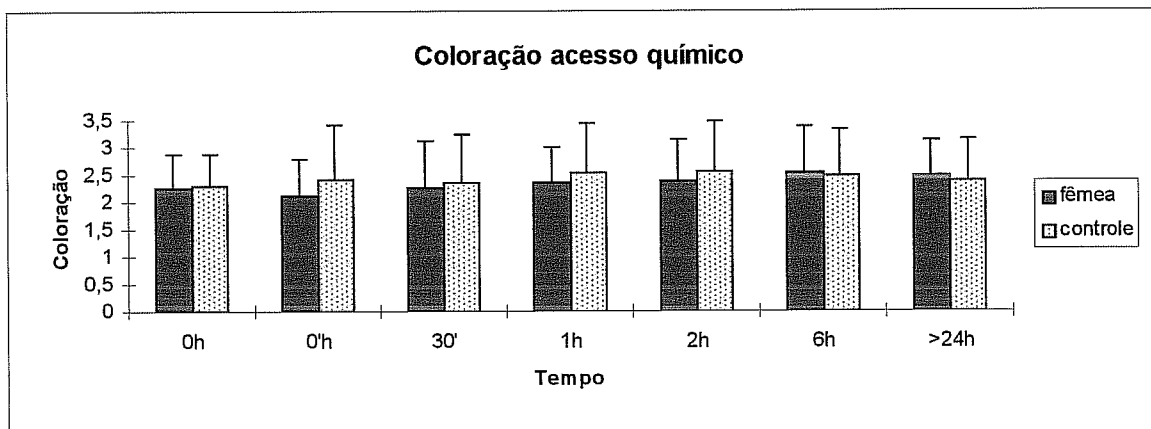


Figura 2.9: Coloração média apresentada pelos machos quando estão na água em que estiveram duas fêmeas ou quando são controle. As barras representam o desvio padrão. Os resultados dos testes de Wilcoxon estão representados na Tabela 2.6.



Com a continuação do acesso visual a uma fêmea ($t > 24h$) tornam-se mais claros, o que não acontece quando o acesso é total. Os estímulos químicos não parecem ter efeito, nunca havendo diferenças significativas em relação ao controle (Fig. 2.9).

TABELA 2.6: Resultados da ANOVA de Friedman para a coloração do macho nas situações de acesso total e visual e do teste de Wilcoxon na situação de acesso químico.

Hora	TOTAL			VISUAL			QUÍMICO			
	N	χ^2 Friedman	p<	N	χ^2 Friedman	p<	N	T	Z	p
0h	8	1.78	0.41	10	2.65	0.27	12	7.50	0.63	0.53
0'h	8	1.87	0.39	10	0.06	0.97	12	12.00	1.24	0.21
30'	8	2.52	0.28	10	0.26	0.88	12	8.00	0.52	0.60
1h	7	1.68	0.43	10	0.19	0.91	12	6.00	1.35	0.18
2h	6	2.33	0.31	10	1.40	0.50	12	6.00	1.35	0.18
6h				10	0.86	0.65	12	19.00	0.41	0.68
>24h				10	5.45	0.06	12	18.5	0.47	0.64

TABELA 2.7: Resultados da ANOVA de Friedman para a coloração ao longo do tempo, para cada tratamento; quando o estímulo é um macho com acesso total, apenas se considera até às 2h.

Tratamento	TOTAL			VISUAL			QUÍMICO		
	N	χ^2 Friedman	p<	N	χ^2 Friedman	p<	N	χ^2 Friedman	p<
c/ fêmea	13	11.38	0.077	11	8.98	0.17	12	11.38	0.08
c/ macho	6	10.02	0.04 *	10	3.14	0.79			
controle	13	9.53	0.14	11	14.99	0.02 *	13	8.37	0.21

No entanto, em nenhuma das diferentes condições de estimulação se verifica uma diferença significativa no número de escurecimentos em relação à coloração inicial entre machos controle, sujeitos à estimulação de uma fêmea ou um macho respectivamente (Tabela 2.8).

TABELA 2.8: Diferenças entre o número de escurecimentos entre as três situações, para cada hora; para o acesso total, em $t=6h$ e $t>24h$, apenas se consideram as situações c/ fêmea e controle.

Hora	TOTAL		VISUAL		QUÍMICO	
	χ^2 (Observ x Esper)	p<	χ^2 (Observ x Esper)	p<	χ^2 (Observ x Esper)	p<
t0'-t0	3.80	0.15	0.18	0.91	1.28	0.26
t30'-t0h	1.40	0.50	0.67	0.72	0.14	0.70
t1h-t0h	3.20	0.20	0.20	0.90	0.40	0.53
t2h-t0h	0.20	0.90	0.25	0.88	0.09	0.76
t6h-t0h	0.69	0.40	0.28	0.87	0.33	0.56
t>24h-t0h	0.07	0.80	2.00	0.37	0.11	0.74



2.3.3 Ninho

Quando tiveram acesso total ao estímulo, a dimensão média dos ninhos dos machos no final do período de isolamento, foi $320.14 \text{ cm}^3 \pm 562.5 \text{ cm}^3$, $666.15 \text{ cm}^3 \pm 425.27 \text{ cm}^3$ e $647.08 \text{ cm}^3 \pm 520.05 \text{ cm}^3$ antes da introdução da fêmea, do macho e para o controle, respectivamente. Estas diferenças poderiam mascarar o aumento do volume dos ninhos. Na situação de acesso visual, os volumes dos ninhos nos três tratamentos também era variável antes da introdução do estímulo ($277.54 \text{ cm}^3 \pm 293.82 \text{ cm}^3$, $501.31 \text{ cm}^3 \pm 573.52 \text{ cm}^3$ e $828.34 \text{ cm}^3 \pm 536.29 \text{ cm}^3$ antes de verem a fêmea, o macho e para o controle, respectivamente). Assim, nas Figuras 2.10. a 2.12 estão representados os incrementos para cada hora, em relação a t0h.

Em qualquer situação, quando o estímulo é uma fêmea, há uma variação temporal significativa do volume dos ninhos escavados (Tabela 2.10). Esta variação traduz o aumento da dimensão dos ninhos. No entanto, o incremento em cada hora é sempre superior quando a estimulação é total (Fig. 2.10); na estimulação visual, o aumento do incremento das 6h para as >24h, é menor (Fig. 2.11), podendo traduzir um abrandamento na escavação do ninho. Quando sujeitos a estímulos químicos apenas se verifica um aumento da dimensão do ninho mais tarde, sendo menor que o incremento do controle às >24h (Fig. 2.12); no entanto essa diferença não é significativa.

No controle (acesso total) há também um aumento significativo, no entanto o incremento é sempre significativamente inferior ao verificado na presença da fêmea.

Na estimulação visual, em que os machos vêem outro macho até >24h, há um aumento significativo do incremento do ninho, sendo apesar de tudo inferior ao verificado na presença de uma fêmea e superior ao do controle.

TABELA 2.9: Resultados da ANOVA de Friedman para o aumento da dimensão do ninho em relação a t0 nas situações de acesso total e visual e dos testes de Wilcoxon na situação de acesso químico.

Hora	TOTAL			VISUAL			QUÍMICO			
	N	χ^2 Friedman	p<	N	χ^2 Friedman	p<	N	T	Z	p
t0'h-t0	8	2.00	0.37	10	2.47	0.291	12	26.00	--	--
t30'-t0	8	2.80	0.25	10	3.60	0.165	12	26.00	--	--
t1h-t0	7	5.38	0.068	10	3.60	0.165	12	26.00	--	--
t2h-t0	6	7.52	0.02 *	10	6.23	0.044 *	12	26.00	--	--
t6h-t0				10	14.81	0.001 **	12	3.00	0.00	1.00
t>24h-t0				10	6.44	0.040 *	12	3.00	1.86	0.06

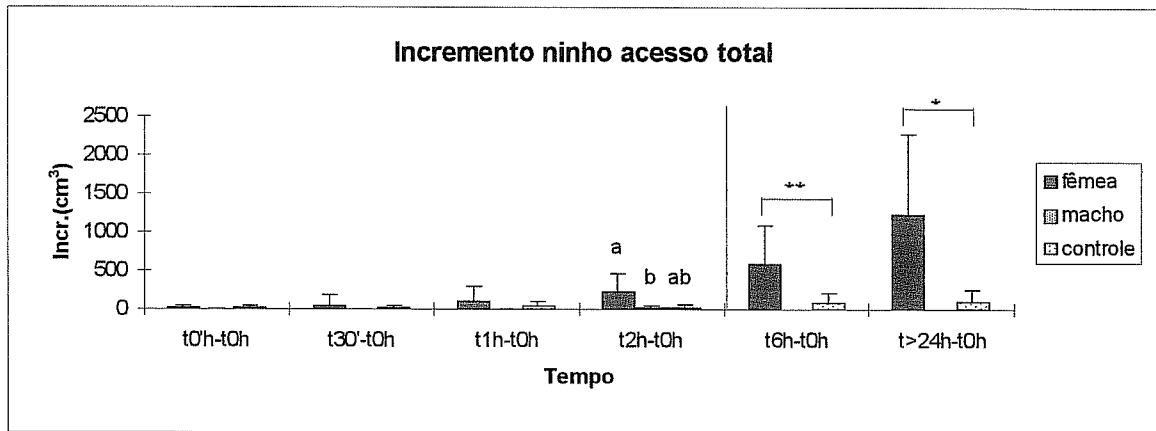


Figura 2.10: Variação média da dimensão do ninho corrigida para o valor inicial dos machos na presença de diferentes tipos de estímulos (fêmea, macho, controle). As barras representam o desvio padrão. Os valores dos testes de Friedman estão representados na Tabela 2.9. Para cada hora, as letras diferentes representam diferenças significativas nas comparações *a posteriori* para $p < 0.05$; quando não há letras, todo o grupo é homogêneo; às 6h, $z = 2.82$, $p = .0047$ ($n = 13$); para $t > 24h$, $z = 2.98$, $p = 0.029$ ($n = 13$).

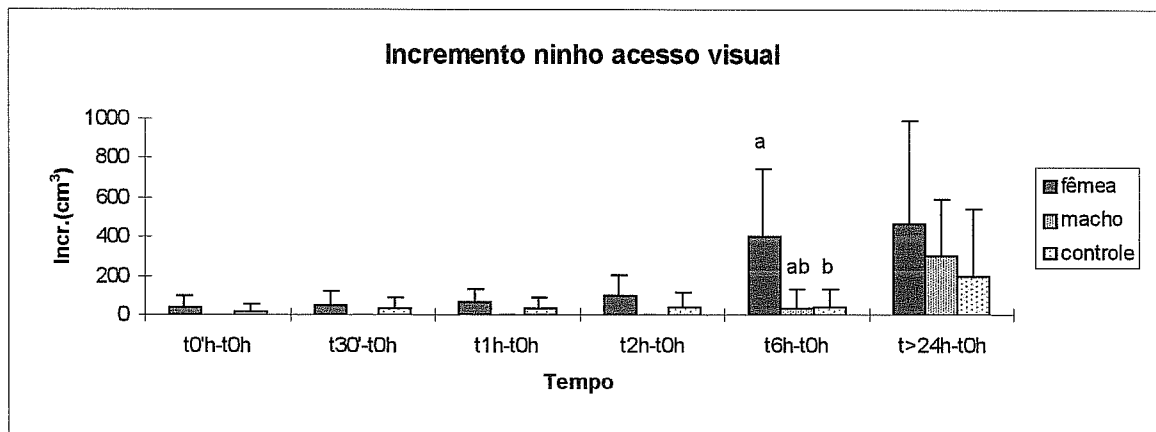


Figura 2.11: Variação média da dimensão do ninho corrigida para o valor inicial dos machos quando vêem diferentes tipos de estímulos (fêmea, macho, controle). As barras representam o desvio padrão. Os valores dos testes de Friedman estão representados na Tabela 2.9. Para cada hora, as letras diferentes representam diferenças significativas nas comparações *a posteriori* para $p < 0.05$. Quando não há letras, todo o grupo é homogêneo.

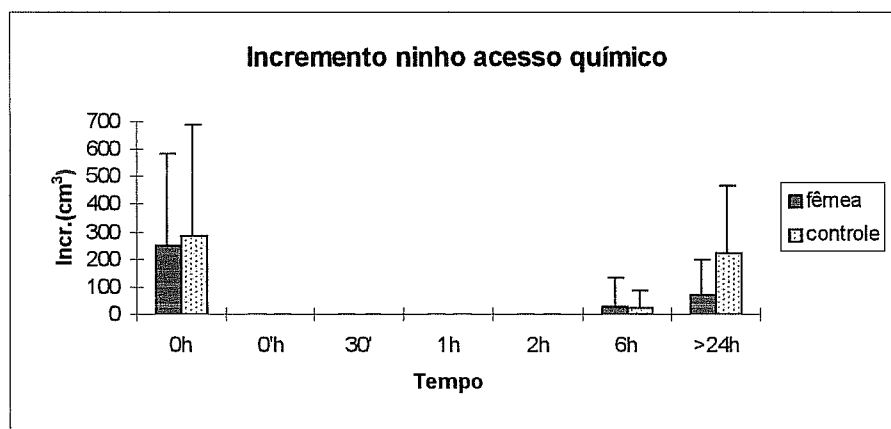


Figura 2.12: Dimensão média dos ninhos escavados pelos machos quando estão na água em que estiveram duas fêmeas ou quando são controle. As barras representam o desvio padrão. Os resultados dos testes de Wilcoxon estão representados na Tabela 2.9.



TABELA 2.10: Resultados da ANOVA de Friedman para a dimensão do ninho ao longo do tempo, para cada tratamento; quando o estímulo é um macho com acesso total, apenas se considera até às 2h.

Tratamento	TOTAL			VISUAL			QUÍMICO		
	N	χ^2 Friedman	p<	N	χ^2 Friedman	p<	N	χ^2 Friedman	p<
c/ fêmea	13	62.11	0.00 **	11	42.71	0.00 **	12	12.22	0.03 *
c/ macho	6	3.00	0.56	10	27.30	0.00 **			
controle	13	12.92	0.04 *	11	7.81	0.25	13	29.92	0.00 **

2.3.4 Comportamentos sexuais

Não há uma variação significativa ao longo do tempo na frequência de comportamentos sexuais (χ^2 Friedman = 4.22, N=13, p< 0.52) embora a frequência média máxima se verifique passados trinta minutos da introdução da fêmea (Fig. 2.13).

Na presença de um macho, não se observaram quaisquer comportamentos sexuais.

2.3.5 Comportamentos agonísticos

Pela análise do gráfico da Fig. 2.14, a frequência média de interações agonísticas é sempre significativamente superior na presença de um macho, do que na presença de uma fêmea. Quando o estímulo é uma fêmea, quase não há interações agonísticas, embora a Tabela 2.12 indique a existência de uma variação significativa em que se atinge um valor máximo logo após a introdução da fêmea.

TABELA 2.11: Comparação entre a frequência de interações agonísticas em cada hora quando o estímulo é um macho e uma fêmea respectivamente (Testes de Wilcoxon).

Hora	N	T	Z	p
0 ^h	8	0.00	2.52	0.012 *
30 ^h	8	0.00	2.52	0.012 *
1 ^h	7	0.00	2.37	0.018 *
2 ^h	6	0.00	2.20	0.028 *

TABELA 2.12: Resultados da ANOVA de Friedman para a frequência de comportamentos agonísticos ao longo do tempo, para cada tratamento; quando o estímulo é um macho, apenas se considera até às 2h.

Tratamento	N	Friedman χ^2	p<
c/ fêmea	13	18.38	0.002 **
c/ macho	7	2.00	0.37

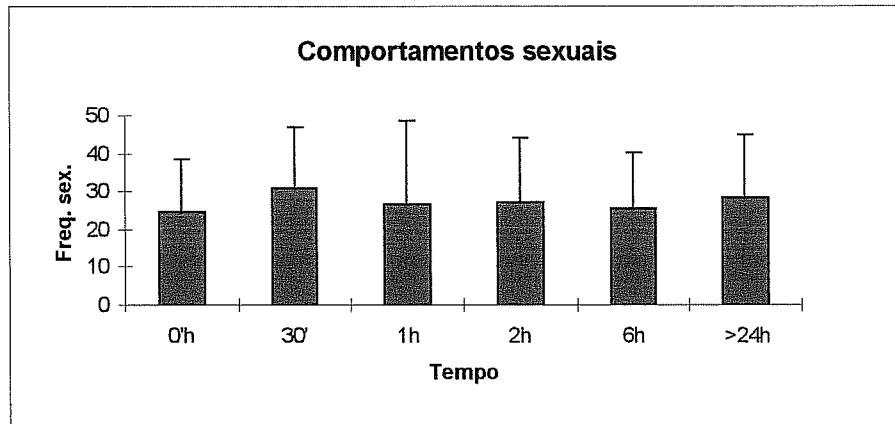


Figura 2.13: Variação temporal da frequência média de comportamentos sexuais exibidos pelos machos na presença de uma fêmea sexualmente madura. As barras representam o desvio padrão.

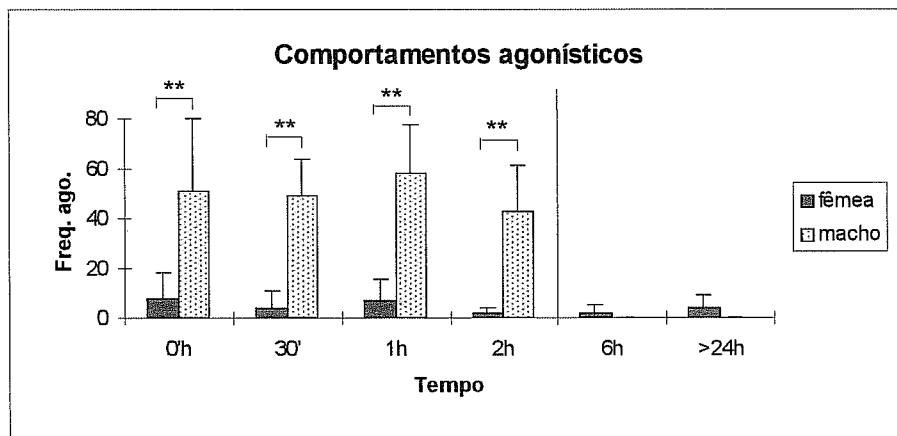


Figura 2.14: Frequência média de comportamentos agonísticos nas interações macho-fêmea e macho-macho. As barras representam o desvio padrão. Os resultados dos testes de Wilcoxon para cada hora encontram-se representados na Tabela 2.11.

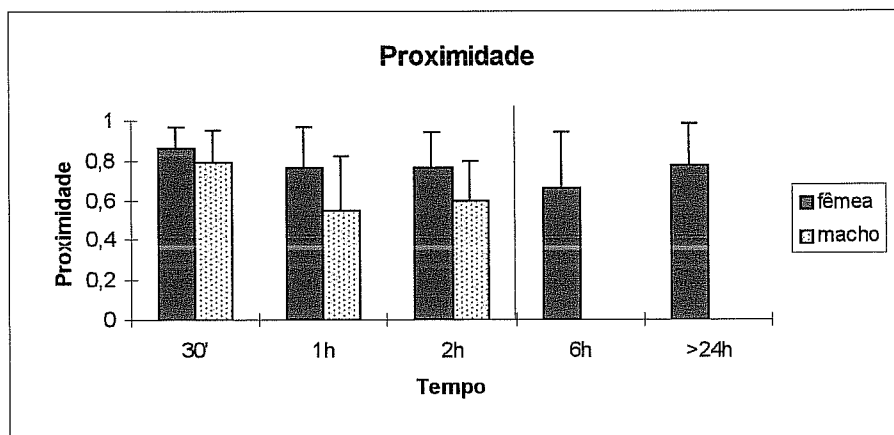


Figura 2.15: Proximidade média de comportamentos agonísticos nas interações macho-fêmea e macho-macho. As barras representam o desvio padrão. Os resultados dos testes de Wilcoxon para cada hora encontram-se representados na Tabela 2.13.



2.3.6 Proximidade

Quando o acesso é total, a proximidade média entre o macho e a fêmea é sempre superior à proximidade média entre os dois machos (Fig.2.15). No entanto, esta diferença nunca é significativa (Tabela 2.13). Pelos resultados expostos na Tabela 2.14, não há uma variação temporal significativa da proximidade macho-fêmea e macho-macho. De facto, em ambas as situações a proximidade entre os indivíduos permanece elevada (sempre superior a 50% do tempo).

TABELA 2.13: Comparação entre a proximidade entre macho-macho e macho-fêmea (Testes de Wilcoxon).

Hora	N	T	Z	p
30'	6	7.50	0.63	0.53
1h	5	5.00	0.67	0.50
2h	4	4.00	0.36	0.71

TABELA 2.14: Resultados da ANOVA de Friedman para a variação temporal da proximidade entre o macho-macho e entre macho-fêmea, respectivamente. Quando o estímulo é um macho, apenas se considera até às 2h.

Tratamento	N	χ^2 Friedman	p<
c/ fêmea	11	6.98	0.14
c/ macho	6	3.27	0.19

Como se pode verificar nos gráficos da Fig. 2.16 no tempo 0h, em qualquer uma das situações, há uma maior permanência dos machos junto ou próximo do termostato. Quando não há qualquer estimulação (controle), esta proximidade mantém-se ao longo do tempo (Fig. 2.16 i-m) embora a ocupação do lado oposto do aquário seja maior do que a das secções centrais. No entanto quando os machos vêem uma fêmea (Fig. 2.16 a-d) ou um macho (Fig. 2.16 e-h) no aquário adjacente, do lado oposto ao do termostato, verifica-se nos gráficos um deslocamento do pico de ocupação para a esquerda, que corresponde a uma aproximação dos indivíduos ao estímulo. Esta proximidade mantém-se ao longo do tempo (nas horas não representadas graficamente a variação de ocupação do aquário é semelhante). Pela análise da Tabela 2.15, o número de vezes que foram vistos machos em cada célula nunca é aleatório.

TABELA 2.15: Resultados do teste de χ^2 para testar se o n° de vezes que foram vistos os machos em cada célula do aquário foi aleatória, quando viram do lado oposto ao termostato uma fêmea no aquário adjacente, um macho, ou quando foram controle.

Hora	c/ fêmea		c/ macho		controle	
	χ^2 (Observ x Esper)	p<	χ^2 (Observ x Esper)	p<	χ^2 (Observ x Esper)	p<
0h	100.50	0.00 **	69.51	0.00 **	55.12	0.00 **
30'	45.78	0.00 **	86.92	0.00 **	26.15	0.00 **
1h	22.23	0.00 **	79.17	0.00 **	56.69	0.00 **
2h	29.00	0.00 **	111.35	0.00 **	63.05	0.00 **
6h	26.87	0.00 **	47.91	0.00 **	94.79	0.00 **
>24h	21.33	0.00 **	43.35	0.00 **	86.01	0.00 **

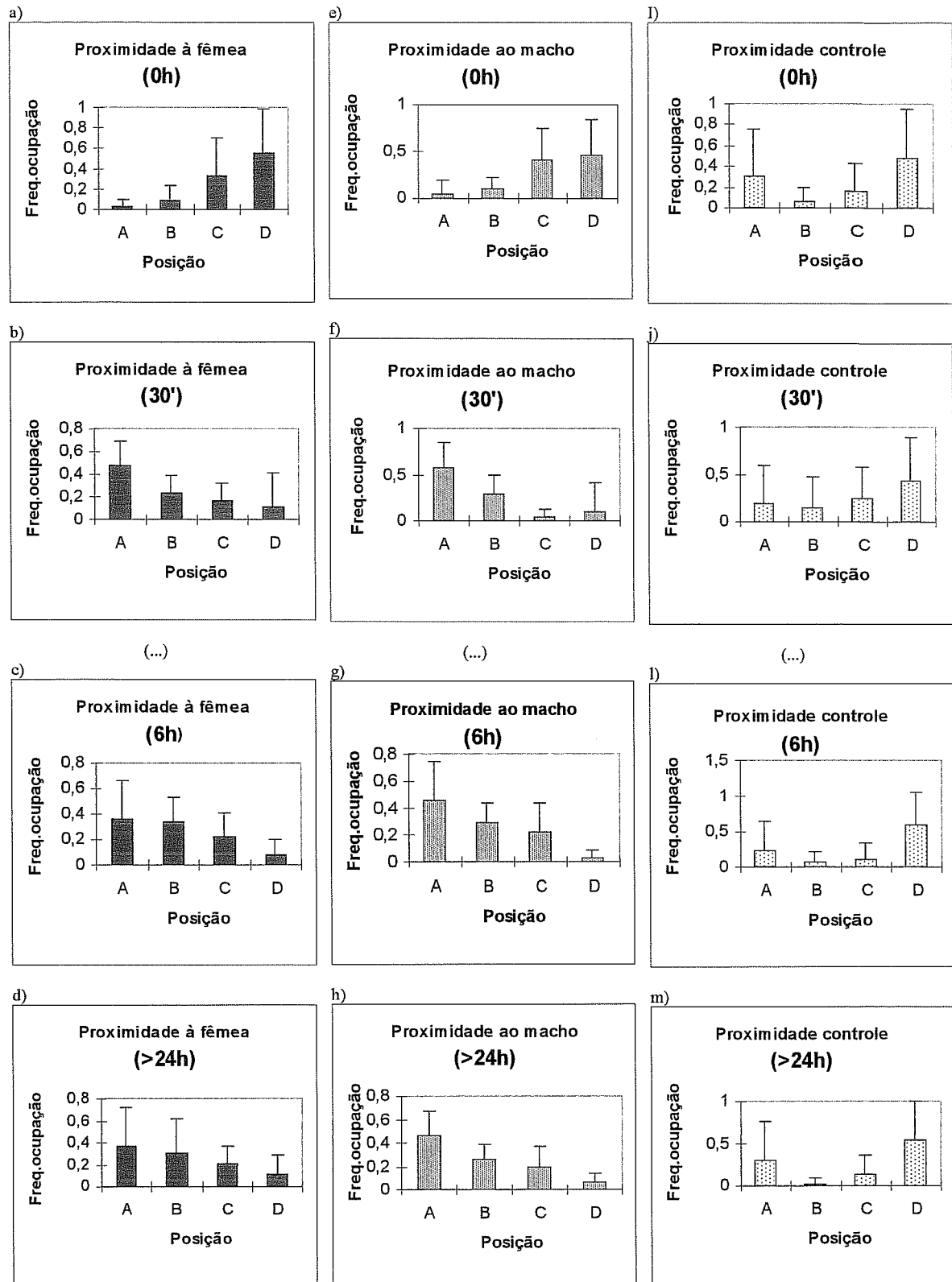


Figura 2.16: Proximidade média dos machos ao estímulo. De a) a d), quando vêm uma fêmea; de e) a h) quando vêm um macho; de i) a m) quando são controle. De A a D, as seções do aquário: A=mais próxima do estímulo; D=mais afastada do estímulo e mais próxima do termostato.



2.4 DISCUSSÃO

Os estímulos sociais podem ser utilizados em diferentes processos de reconhecimento: de um modo geral, diferentes espécies podem usar diferentes canais sensoriais para a obtenção do mesmo resultado. Apesar de algumas exceções, ao nível do reconhecimento sexual, são importantes os estímulos comportamentais; a este nível podem também influenciar a coloração, o tamanho e a forma do indivíduo (Myrberg Jr, 1980). Quando há reconhecimento individual, este parece ser mediado principalmente por pequenas diferenças no padrão cromático da espécie considerada.

Os machos de *O. mossambicus* reagem de modo diferente à presença de estímulos sociais diferentes. A presença da fêmea parece ser importante para a construção do ninho e na estimulação de comportamentos sexuais. Quando o intruso é um macho, o facto de a dimensão do ninho não aumentar até às duas horas de interacção pode dever-se às interacções agonísticas entre os machos, que se prolongam provavelmente até ao estabelecimento de posições de dominância. A maior actividade locomotora, que se verifica nessa situação, traduz as perseguições, em que os indivíduos se deslocavam rapidamente por todo o aquário. Quando foi possível prolongar a interacção entre machos até às 24h (visuais), verificou-se que a partir das 6h já havia escavação de ninho. Uma vez estabelecidas relações de dominância, a presença de outros machos não impede a escavação de ninhos (como se verifica nas arenas).

O facto de a ligação do par se manter elevada no decorrer da experiência (como se pode ver pela constância da frequência de sexuais e pela elevada proximidade), pode ter a ver com o facto de não ter sido observada nenhuma oviposição. Neil (1964) refere que pode verificar-se a desova 1h a 1,5h após a primeira visita da fêmea ao ninho. Provavelmente nas arenas tudo se passa mais rapidamente, sendo talvez para isso necessária a presença de outros indivíduos. Também nunca se observaram comportamentos de cortejamento a outros machos.

Em alguns peixes a estimulação resultante de cortejamento provoca alterações de coloração, que poderão permitir por sua vez novos estímulos importantes para as interacções sociais. A coloração e o movimento têm um papel importante, podendo estes dois factores actuar separada ou conjuntamente, valorizando o potencial de cada um (Fryer



& Iles, 1972). Estes autores concluíram que em *Hemichromis bimaculatus* o reconhecimento sexual pode ser efectuado apenas com base em estímulos visuais.

As alterações lentas e rápidas na coloração dos vertebrados devem-se à dispersão dos grânulos pigmentares. Esta dispersão é regulada pela hormona estimuladora dos melanóforos (MSH), secretada na pituitária anterior (Goodenough *et al.*, 1993).

Apesar de a coloração preta dos machos surgir associada ao cortejamento (Neil, 1964), no nosso trabalho, embora a frequência desses comportamentos se tenha mantido elevada, raramente foi atingida a coloração preta. O escurecimento foi rápido, mas a coloração predominante foi cinzento²-cinzento³. Estes resultados não são de estranhar visto que Neil (1964) refere que na presença de uma fêmea, a coloração preta não é atingida em menos de um a dois dias; no entanto, segundo este autor, se um macho for colocado num tanque com várias fêmeas, é atingida essa coloração em 24h. Neil (1964) considera cinzento² uma coloração alternativa ao cortejamento; de facto, a coloração preta não é necessária para evocar uma resposta das fêmeas, visto que no trabalho de Neil houve fêmeas que desovaram com machos cinzento² e cinzento³. Por outro lado, também nunca foi atingida a coloração preta na presença de um macho; Neil (1964) refere também que quando dois ou mais machos são colocados juntos num tanque, essa coloração só aparece ao fim de alguns dias.

A importância de estímulos sexuais em Ciclídeos tem sido objecto de estudos há já algum tempo e alguns trabalhos tentam identificar o tipo de estímulos envolvidos. Quando fêmeas de *Tilapia macrocephala* são isoladas visualmente em aquários separados, a frequência de desova é menor do que quando vêm indivíduos da mesma espécie em aquários adjacentes. Estes resultados verificam-se qualquer que seja o sexo do indivíduo-estímulo (Aronson, 1957). Após ter sido estimulada visualmente por um macho, deposita ovos normalmente, mesmo após remoção do indivíduo-estímulo (Aronson, 1965 *in* Wingfield & Marler, 1988).

Baerends & Baerends-van-Roon (1950, *in* Aronson, 1957) concluíram que a discriminação sexual pelos machos de *O. mossambicus* e de outros Ciclídeos em que há incubação bucal dos ovos, depende do comportamento das fêmeas em resposta ao cortejamento dos machos.

Os trabalhos de Silverman (1978 a,b) contribuíram para a identificação do tipo de estímulos sociais envolvidos na alteração de parâmetros reprodutivos em *O. mossambicus*. Os nossos resultados confirmam a importância de estímulos visuais nesta espécie, sobre os



parâmetros comportamentais estudados. Quando foi permitida ao macho de *O. mossambicus* a visualização de outro indivíduo conspecífico num aquário adjacente, houve a aproximação ao estímulo, independentemente do sexo do mesmo. Verificou-se um aumento na sua actividade locomotora e na dimensão do ninho. No entanto, esse aumento foi superior quando o indivíduo-estímulo era uma fêmea, do que quando era um macho. Estes resultados levam-nos a supôr que os machos de *O. mossambicus* têm capacidade de discriminar indivíduos de sexos diferentes apenas com base em estímulos visuais. Neste trabalho nada se pode concluir sobre que estímulos concretos emitidos pelas fêmeas (coloração, forma ou comportamentos) alteram a resposta do macho.

O facto de *O. mossambicus* apresentar grande dimorfismo sexual na coloração, tamanho e forma, bem como a rápida capacidade de mudança de coloração, parecem reforçar a importância de estímulos visuais nesta espécie.

Silverman (1978 b) não encontrou uma relação entre o sexo do animal-estímulo e a amplitude da resposta (eixo reprodutor), quer de machos quer de fêmeas, apesar do dimorfismo sexual. Refere que isto poderá reflectir um efeito geral de conspecífico, relacionado com a gregaridade desta espécie, em que a “presença “ poderia ser importante. Mas levanta a hipótese de efeitos comportamentais específicos se suplantarem em relação à “presença” em grupos mistos. Pelo menos em relação a alguns dos parâmetros estudados no nosso trabalho (dimensão do ninho e actividade locomotora), parece haver uma influência dos estímulos sociais que são percebidos pelo macho como algo mais do que uma simples “presença”, visto que as respostas a indivíduos de sexos diferentes são diferenciadas.

A capacidade de resposta de escavação de ninho face a estímulos visuais é vantajosa, visto que é um meio rápido de propagação de informação que pode ser reconhecido pelos machos vizinhos da arena e contribuir para a regulação das interações entre machos territoriais; por outro lado, a própria construção do ninho, pode ser percebida visualmente por outros indivíduos.

No entanto, os estímulos visuais não devem ser suficientes para permitir a totalidade dos comportamentos. De facto, Fryer & Iles (1972) concluíram que *Hemichromis bimaculatus* é uma espécie menos especializada do que a maioria das espécies endémicas dos grandes lagos, sendo improvável que em espécies com um sistema social mais elaborado, como é o caso de *O. mossambicus*, esta seja a única forma de comunicação envolvida. De facto, tanto em relação a aspectos morfofisiológicos como em relação à



frequência de comportamentos, Silverman (1978 a, b) salienta a importância de estímulos visuais mas também de outro tipo de estímulos sensoriais, visto que as respostas observadas quando o acesso ao estímulo é total são sempre mais fortes do que quando é apenas visual (nomeadamente na aceleração da ovulação). Os nossos resultados confirmam esta hipótese. Nas nossas observações, o aumento da actividade locomotora do macho de *O. mossambicus* e do ninho em relação aos valores observados nas situações controle, foi superior na situação de acesso total em relação aos aumentos verificados apenas com acesso visual a uma fêmea.

Apesar de em muitas espécies de peixes serem principalmente os estímulos visuais que influenciam os comportamentos sexuais dos machos (e.g. no guppy, *Poecilia reticulata*, Baerends *et al.*, 1955 in Wingfield & Marler, 1988), noutras os estímulos químicos parecem ser os principais.

Visto que há diferentes hormonas envolvidas no controle das diferentes fases do ciclo de maturação das gónadas, estas poderiam servir como estímulos químicos úteis para informar os conspécíficos sobre o estado reprodutivo de potenciais parceiros sexuais (Kime, 1982; Jobling, 1995). É o que acontece com o peixe-dourado (*Carassius auratus*), em que os machos conseguem discriminar fêmeas ovuladas de fêmeas não ovuladas apenas com base em estímulos químicos; a feromona parece estar presente no fluido ovárico e é liberta após ovulação, o que atrai os machos e neles estimula o comportamento de cortejamento que acompanha a desova (Partridge *et al.*, 1976 in Wingfield & Marler, 1988; Billard *et al.*, 1990). Na altura da ovulação, prostaglandinas envolvidas na ruptura folicular são libertas pelas fêmeas para a água, onde provocam uma estimulação sexual dos machos através do sistema nervoso central (Stacey *et al.*, 1987). Machos maduros com estímulos sociais de fêmeas receptivas têm maiores níveis plasmáticos de GtH e volume de esperma do que quando em grupos só de machos (Kyle *et al.*, 1985 in Wingfield & Marler, 1988).

Em *Poecilia reticulata* a fêmea produz uma feromona que atrai machos conspécíficos (Meyer *et al.*, 1982 in Wingfield & Marler, 1988). Em salmonídeos uma feromona sexual da fêmea estimula a aproximação e comportamentos sexuais no macho (Honda, 1980). A fêmea de guppy também produz uma feromona livre ou conjugada que atrai o macho (Jobling, 1995).

A libertação de feromonas foi identificada noutras espécies; no entanto em tilápias são poucas as evidências. A observação de que a actividade de cortejamento do macho aumentava significativamente com a aproximação do período reprodutor da fêmea, apenas



se estes se encontrarem no mesmo aquário, levou Silverman (1978 a, b) a relacionar estes factores com uma análise histológica das gónadas: os contactos visuais parecem acelerar a ovulação de oócitos desenvolvidos, mas não influenciam o desenvolvimento dos oócitos; estímulos não visuais parecem acelerar não só a ovulação e o início da vitelogénese, afectando a duração do desenvolvimento dos oócitos. Por outro lado, Kim & Liley (não publ. in Liley, 1982), verificaram que feromonas sexuais emitidas por fêmeas ovuladas de *O. mossambicus*, provocavam um aumento da escavação do ninho e do escurecimento dos machos isolados.

No nosso trabalho, não se verificaram alterações dos parâmetros estudados em resposta a estímulos químicos. No entanto, estes resultados poderão dever-se ao facto de o macho ter mudado para um aquário totalmente desconhecido e de talvez o tempo de amostragem não ter sido suficiente para detectar o efeito de uma feromona (ou deste ter desaparecido quando o macho volta a ficar ambientado). Também se poderia dar o caso de apenas terem um efeito *primer* que só se notaria ao fim de algum tempo. As respostas comportamentais observadas por Kim & Liley (não publ. in Liley, 1982), tornavam-se aparentes várias horas ou dias após a exposição ao estímulo. De facto, no nosso trabalho, só a partir das 6h se detecta a escavação de ninhos, cujas dimensões aumentam até às 24h; nos outros parâmetros não se detectaram alterações conclusivas.

Assim não se deverá excluir a hipótese de libertação de feromonas pela fêmea, que possam ter influência no comportamento dos machos.

Silverman (1978a) refere que fêmeas maduras de *O. mossambicus* poderiam libertar substâncias químicas que estimulassem ou facilitassem os comportamentos de corte do macho quando este tivesse acesso visual à fêmea. De acordo com esta hipótese e com os nossos resultados, estímulos visuais emitidos pelas fêmeas só por si poderiam influenciar algumas respostas comportamentais (mesmo que incompletas), o mesmo não acontecendo com os químicos.

No peixe-anjo *Pterophyllum scalare* (ciclídeo), tanto estímulos químicos como visuais são potentes reguladores do comportamento de desova (Chien, 1973 in Wingfield & Marler, 1988).

Myrberg Jr. (1980), refere a possibilidade de sinergismo entre diferentes modalidades sensoriais e de percepção gestaltica. Assim, também se pode levantar a hipótese de, em *O. mossambicus*, os estímulos químicos, apesar de necessários, apenas serem efectivos quando em conjunto com outros estímulos sensoriais (visuais e/ou outros).



É o que parece acontecer, pelo menos nalgumas espécies de Ciclídeos, em que a capacidade que o progenitor tem de reconhecimento diferenciado das suas ninhadas, parece depender da associação de estímulos visuais e químicos emitidos pelos juvenis (Myrberg 1966, *in* Myrberg Jr 1980).

Mesmo existindo a libertação de substâncias químicas importantes na comunicação, também poderão estar envolvidos outro tipo de estímulos, não estudados no presente trabalho. Segundo Myrberg Jr. (1980), em muitas espécies de peixes, os sons emitidos no cortejamento são apenas produzidos pelo macho, o que poderia permitir o reconhecimento sexual. Segundo Marshall (1972 *in* Wingfield & Marler, 1988) os machos de *O. mossambicus* produzem sons que influenciam a oviposição em fêmeas isoladas. Mesmo que nesta espécie ambos os sexos emitam sons, poderá haver diferenças, por exemplo, na modulação do som entre machos e fêmeas.

O facto de a proximidade entre o macho e a fêmea durante o cortejamento se ter mantido elevada, aumenta a probabilidade de ocorrência de contactos corporais entre os indivíduos. Durante o cortejamento, vários comportamentos envolvem toques entre o macho e a fêmea em muitas espécies (Aronson, 1957). Assim, o contacto entre o macho e a fêmea durante a interacção, poderá ser importante para a continuação da mesma.

Dada a diversidade de mecanismos pelos quais os estímulos sociais interagem com o comportamento em diferentes espécies, não devem ser feitas generalizações. Os estímulos relevantes em cada caso deverão ser identificados e interpretados segundo o sistema social em que o animal está inserido bem como o contexto ecológico onde decorre a interacção. A importância relativa de cada modalidade sensorial também poderá variar no mesmo indivíduo, com o contexto social. Sendo *O. mossambicus* uma espécie com um sistema social que envolve interacções complexas entre os indivíduos do mesmo sexo e do sexo oposto, é pouco provável que haja apenas um tipo de estímulos a influenciar as respostas comportamentais. A integração de informação proveniente de vários canais sensoriais seria vantajosa pois daria informação mais precisa sobre a situação onde seria exigida uma resposta comportamental. Segundo Silverman (1978 a), a existência de um sistema interactivo permite poupar energia na emissão constante de sinais. Num ambiente em que podem variar as condições que afectam a transmissão segundo alguns canais, a integração de informação diversa pode ser útil.

Os estímulos visuais poderão ser mais efectivos e mais económicos do ponto de vista energético na defesa do território; muitas interacções entre machos vizinhos envolvem



exibições que por vezes não implicam contacto corporal, nas fronteiras entre territórios. Estímulos visuais têm a vantagem de serem imediatos, direccionais e informativos mas a sua eficácia é menor na água do que no ar, dependendo da turbidez e redução da luminosidade com a profundidade (Colombo *et al.*, 1982). Em particular, os odores propagam-se devagar na água, de acordo com a velocidade de difusão molecular e transporte pelas correntes, mas a sua fonte pode ser detectada pelos peixes a longas distâncias (Colombo *et al.*, 1982; Liley, 1982). No entanto, os sinais químicos limitam a possibilidade de mudança de uma mensagem para outra (Liley, 1982). A libertação de feromonas que informassem o macho acerca da condição reprodutiva das fêmeas seria vantajosa, visto que as fêmeas desta espécie, quando ovuladas, não apresentam grandes alterações na fisionomia.

A capacidade de reconhecimento sexual é importante visto que há diferenças nas interacções entre indivíduos do mesmo sexo e do sexo oposto; por outro lado, há vantagens num processo rápido de reconhecimento de estímulos numa interacção, em que o comportamento de um indivíduo depende dos estímulos emitidos pelo outro. Assim, os estímulos visuais são importantes, mas provavelmente não são suficientes.



3. INFLUÊNCIA DE ESTÍMULOS SOCIAIS NOS NÍVEIS DE ESTERÓIDES SEXUAIS

3.1 INTRODUÇÃO

Em muitas espécies de teleósteos, detectaram-se nas fêmeas níveis de testosterona idênticos ou superiores aos dos machos (Godwin & Thomas, 1993; Goodenough *et al.*, 1993). A testosterona é um dos principais esteróides na circulação de fêmeas de várias espécies incluindo tilápias (Trewavas, 1983). Assim, esta hormona foi questionada como o principal androgénio nos peixes. Ao contrário dos testículos da maioria dos vertebrados, os dos teleósteos são capazes de sintetizar derivados de androstenediona e de testosterona, com um grupo hidroxilo ou ceto na posição 11 no núcleo de esteróide (Billard *et al.*, 1982). Assim, o androgénio considerado como característico dos teleósteos é a 11-cetotestosterona (11-KT) (Liley & Stacey, 1983; Matty, 1985; Scott, 1987; Kime, 1993). Para além destes dois androgénios, os testículos dos peixes podem sintetizar outros esteróides como a androstenediona (Fostier *et al.*, 1983, Loir, 1990, Bourne, 1991 *in* Redding & Patiño, 1993), progesterona, 17α -hidroxi-4-pregnen-3-ona, $17\alpha,20\beta$ -dihidroxi-4-pregnen-3-ona ($17,20\beta$ -P), 11-desoxicorticosterona e provavelmente pequenas quantidades de estrogénios (Fostier *et al.*, 1987; Barry *et al.*, 1993 *in* Redding & Patiño, 1993). O número de estudos com progestagénios é menor (Vília, 1995). Em machos de salmonídeos, o mais frequente é a $17,20\beta$ -P; apesar desta hormona induzir a maturação dos oócitos em muitos teleósteos (Canário & Scott, 1987 a); Kime, 1993), a sua actividade surge relacionada com a espermiacção (*sensu* Jobling, 1995) em muitas espécies (Billard, 1986). Mais recentemente, detectou-se a presença de $17\alpha,20\alpha$ -dihidroxi-4-pregnen-3-ona ($17,20\alpha$ -P). Vília (1995) e Oliveira *et al.* (1996) referem vários trabalhos em que é salientada a importância deste esteróide em espécies de ciprinídeos, pleuronectiformes, serranídeos, perciformes e sparídeos.

A análise estrutural de um número cada vez maior de hormonas em peixes revela diferenças entre classes, entre vários grupos de peixes, ou por vezes dentro da mesma espécie (Godwin & Thomas, 1993; Wendelaar Bonga, 1993). A importância relativa de diferentes esteróides sexuais varia conforme as espécies. Assim, são necessários estudos que



caracterizem os esteróides testiculares presentes em cada espécie, para uma melhor compreensão dos processos envolvidos na reprodução.

Os esteróides produzidos nas gónadas dos peixes podem exercer uma influência directa na expressão dos comportamentos, ou indirecta, influenciando as características sexuais secundárias importantes nas interacções entre os indivíduos ou, por vezes, afectando o metabolismo geral dos indivíduos (Liley, 1969; Liley, 1980; Fostier *et al.*, 1983 *in* Redding & Patiño, 1993; Liley & Stacey, 1983; Matty, 1985; Jobling, 1995). Por exemplo, as fêmeas de esgana-gata (*G. aculeatus*) seleccionam os parceiros sexuais com base na coloração, característica dependente de androgénios.

A maioria dos estudos com teleósteos evidencia a influência de androgénios testiculares na expressão de comportamentos do macho. Muitos desses trabalhos baseiam-se em correlações encontradas entre os níveis plasmáticos de androgénios e os comportamentos reprodutores (Liley *et al.*, 1987; Moore, 1987; Hourigan *et al.*, 1991), na supressão dos comportamentos após castração dos indivíduos ou na administração de substâncias com propriedades antiandrogénicas e no facto da administração de androgénios aumentar a ocorrência de comportamentos reprodutivos do macho (Hinde, 1970; Matty, 1985; Moore, 1987; Goodenough *et al.*, 1993).

De um modo geral, as hormonas podem modificar o comportamento, afectando os mecanismos sensoriais ou perceptivos, o desenvolvimento ou actividade do sistema nervoso ou os mecanismos efectores importantes na execução do comportamento (Hinde, 1970; Huntingford & Turner, 1987; Goodenough *et al.*, 1993; Hutchison, 1993).

Os esteróides sexuais podem exercer retrocontrolo positivo e negativo no cérebro, hipotálamo, pituitária e gónadas (Billard *et al.*, 1981; Peter, 1982; Kah, 1986; De Leeuw *et al.*, 1987; Redding & Patiño, 1993; Jobling, 1995). No eixo cérebro-pituitária-gónadas há uma interacção estrutural e funcional entre os seus componentes; este sistema dinâmico pode sofrer alterações ao longo da vida, havendo uma grande variabilidade biológica no modo de variação dos acontecimentos neuroendócrinos. Apesar de se poderem fazer considerações gerais, é difícil extrapolar os aspectos mais detalhados de espécie para espécie (Schreibman *et al.*, 1990).

Lesões no cérebro e estimulação, implantes cerebrais de esteróides, auto-radiografia e técnicas electrofisiológicas e bioquímicas têm sido usadas para identificar áreas cerebrais específicas que medeiam os efeitos dos esteróides sexuais no comportamento (Davis *et al.*, 1977; Demski & Hornby, 1982; Peter, 1982; Moore, 1987; Kah *et al.*, 1993).



Os trabalhos de Hutchison (e.g. Hutchison & Hutchison, 1983; Hutchison, 1991; Hutchison, 1993) contribuíram para a compreensão do processo de aromatização de testosterona a estrogénios para a manifestação de algumas respostas comportamentais, a nível central. Também em teleósteos se detectaram efeitos comportamentais regulados por acção da aromatase (e.g. Callard *et al.*, 1978; Callard *et al.*, 1981; Callard, 1982; Pasmanik *et al.*, 1988). Também a acção cerebral de 5α -reductase pode modular os níveis de testosterona circulante em teleósteos e noutros vertebrados (Pasmanik & Callard, 1985).

Em todos os vertebrados os androgénios afectam diferentes aspectos do comportamento sexual (Kah *et al.*, 1993). No entanto, poucos trabalhos determinaram que comportamentos específicos estão dependentes de androgénios, ou quais os androgénios implicados. Apesar da regulação de comportamentos reprodutivos, incluindo construção de ninho, cortejamento e postura e comportamentos agressivos (territoriais ou não) parecerem depender de androgénios, há resultados contraditórios: em alguns trabalhos estes comportamentos persistem após castração. Faltam trabalhos que testem a eficácia relativa de diferentes esteróides testiculares na estimulação de comportamentos (Liley & Stacey, 1983; Moore, 1987).

Dos teleósteos ovíparos, o peixe-dourado (*C. auratus*) é a espécie mais estudada em termos da base hormonal dos comportamentos sexuais que ocorrem durante o acasalamento e postura. O cérebro concentra esteróides sexuais, que foram implicados no comportamento sexual (Kyle & Peter, 1982, Koyama *et al.*, 1984 *in* Kah, 1986).

Além das alterações a longo prazo em que as hormonas estão envolvidas, em algumas situações parecem estar envolvidas em alterações rápidas de alguns minutos ou mesmo segundos (Liley, 1969).

Erickson (1985) sintetiza os primeiros trabalhos sobre a influência de estímulos sociais nos níveis hormonais, realizados em aves. Os trabalhos de Lehrman (1965 *in* Liley, 1969) e de Hinde (1965 *in* Liley, 1969) com aves foram dos primeiros a considerar a importância da interacção entre factores externos e internos na coordenação de comportamentos reprodutivos: não são apenas as hormonas que influenciam o comportamento, como o comportamento também afecta o estado endócrino (Liley, 1969; Liley & Stacey, 1983; Stacey, 1983). Harding & Follett (1979) salientam a importância do sistema endócrino na resposta imediata do indivíduo a estímulos sociais críticos, dada a rapidez com que as alterações hormonais podem ocorrer durante uma interacção social.



Nas espécies em que há reversão sexual, alterações dos padrões hormonais são acompanhadas de alterações cromáticas e de comportamentos (Reinboth, 1980). Este autor refere alguns trabalhos sobre o controle social da inversão sexual .

O comportamento reprodutivo surge normalmente sincronizado com a maturação das gónadas e as condições ambientais apropriadas à reprodução (Liley, 1969; Sachs & Meisel, 1988). Em muitas espécies só no final da fase de crescimento das gónadas (e gametogénese) se dá a espermiacção e aparecem os comportamentos de construção de ninho e cortejamento. Estímulos sociais emitidos por outros indivíduos, olfactivos, visuais ou outros, podem permitir a activação comportamental do sistema endócrino. Os estudos das interacções entre hormonas e comportamentos tentam compreender de que modo as hormonas modulam o comportamento e vice-versa. No entanto, a maioria dos estudos em endocrinologia comportamental ainda se encontra na fase de identificação de quais as hormonas existentes e das estruturas anatómicas envolvidas (Moore, 1987).

A capacidade de fazer escolhas rápidas no acasalamento deve aumentar a eficácia reprodutora. Alterações rápidas na formação de estrogénio no cérebro parecem acompanhar a escolha do parceiro em aves, com alterações súbitas do comportamento de corte do macho (Hinde, 1965, Lehrman, 1965, *in* Lovari *et al.*, 1994; Hutchison & Hutchison, 1983; Hutchison, 1991) e os processos cognitivos envolvidos nessa escolha também envolvem provavelmente a acção de esteróides (Lovari *et al.*, 1994).

Nas espécies com repertórios comportamentais elaborados, estímulos comportamentais de conspecíficos, podem influenciar a actividade endócrina e talvez até estimular a ovulação e a espermiacção (Lam & Munro, 1987; Liley, 1980). Este autor refere alguns trabalhos com ciclídeos em que os estímulos sociais influenciam o ciclo reprodutor e outros em que a estimulação social é provavelmente responsável pela sincronização nos ciclos de postura em populações de *Lepomis* e esgana-gata (*G. aculeatus*).

Em *O. mossambicus*, foram feitos vários estudos sobre a influência de esteróides sexuais em aspectos da reprodução: Clemens & Inslee (1968 *in* Liley & Stacey, 1983) observaram a reversão sexual em machos após administração de androgénios; os mesmos resultados foram obtidos por Billy (1982 *in* Liley & Stacy, 1983); este autor salienta o controle endócrino da coloração. Kime (1982) e Kime & Hyder (1983) detectaram níveis elevados de vários androgénios, incluindo a 11-KT. Kim & Liley (não publ. *in* Liley, 1982) detectaram a libertação de uma feromona pela fêmea de *O. mossambicus*. O trabalho de Oliveira *et al.* (1996) revela não só níveis de androgénios e de progestinas na urina de



machos de *O. mossambicus*, como também a variação destes esteróides, regulada socialmente. Estes autores concluíram que as interações sociais em machos de *O. mossambicus* têm um efeito modulador a curto prazo nas concentrações urinárias de esteróides sexuais: estes autores formaram grupos de indivíduos após um período de isolamento social; após a formação dos grupos, os índices de dominância determinados eram bons predictores das concentrações de esteróides. Sugerem também funções diferentes para os androgénios e as progestinas; encontraram uma correlação positiva entre os níveis urinários de $17,20\beta\text{-P}$ e os ninhos escavados pelos machos, mas só da $17,20\alpha\text{-P}$ com o cortejamento. Segundo estes autores, as alterações de $17,20\alpha\text{-P}$ em *O. mossambicus* são semelhantes às da $17,20\beta\text{-P}$ em salmonídeos; há evidências que apontam para um papel de feromona.

Os estudos do controle de comportamentos reprodutivos nos peixes podem ter aplicações económicas e podem contribuir para o entendimento da evolução do controle hormonal do comportamento sexual nos vertebrados (Stacey, 1983). Muitos aspectos na relação entre o sistema endócrino e o comportamento, podem ter aplicação em gestão e cultura de stocks de peixes (Bardach & Magnuson, 1980; Billard, 1982, 1986, 1987 a; Baroiller & Jalabert, 1989).

Nesta parte do trabalho estuda-se a interacção entre comportamentos exibidos por machos de *O. mossambicus* e os níveis urinários dos esteróides sexuais T, 11-KT, $17,20\alpha\text{-P}$ e $17,20\beta\text{-P}$ quando sujeitos a interações sociais com machos e fêmeas da mesma espécie.

3.2 METODOLOGIA

Nos teleósteos, as concentrações plasmáticas de testosterona são por vezes superiores nas fêmeas. Assim, a definição clássica de androgénios não é adequada: há que diferenciar entre a estrutura química e a actividade biológica e restringir a definição de androgénio e estrogénio aos esteróides com estrutura C19 e C18 respectivamente; deve referir-se a actividade biológica como androgénica ou estrogénica, independentemente da sua estrutura química (Kime, 1987, 1993). Para pormenores da nomenclatura de esteróides, ver Kime (1987).



3.2.1 Extracção de urina

Optou-se pela extracção de urina apenas em alguns pontos de amostragem, para minimizar a manipulação dos animais. Assim, recolheu-se urina no final do período de isolamento (t_0), 6h e >24h após a introdução do estímulo (*c.f.* o descrito em 2.2.5.). Todas as amostras de urina foram recolhidas após as observações de comportamentos, para que estas observações não fossem influenciadas pela manipulação sofrida nesse processo.

Na recolha das amostras, retiraram-se os indivíduos da água; a urina era retirada pressionando levemente a parte inferior dos flancos, atrás da papila genital. A urina foi directamente recolhida para tubos Eppendorf de 1,5 ml. Tentou-se que todo este procedimento fosse o mais rápido possível (<1min). Os indivíduos eram então novamente introduzidos nos respectivos aquários. As amostras foram congeladas a -20°C até posterior utilização.

3.2.2 Determinação das concentrações hormonais

As amostras foram transportadas em gelo seco em recipiente adequado para o Laboratório de Radioisótopos da Unidade de Ciências e Tecnologias de Recursos Aquáticos da Universidade do Algarve, onde se procedeu à determinação das respectivas concentrações hormonais.

É possível medir os esteróides conjugados directamente nos fluidos biológicos por radioimunoensaios. No entanto, na maioria dos trabalhos procede-se a uma desconjugação inicial, seguida de extracção e de radioimunoensaios (Scott & Vermeirssen, 1994).

3.2.2.1 Desconjugação e extracção

Os esteróides livres dissolvem-se preferencialmente em solventes orgânicos, enquanto as formas conjugadas sendo mais hidrofílicas, permanecem na fase aquosa.

Foram utilizados 3ml de éter para extracção das formas livres em 25 μl de urina.

Devido à grande resistência de muitos esteróides sulfatados à hidrólise por muitas preparações de sulfatases, é necessário proceder a solvólise ácida, para clivar o grupo sulfato da molécula de esteróide; as condições ácidas tornam os esteróides sulfatados solúveis em solventes orgânicos (Scott & Vermeirssen, 1994). Assim, após a extracção dos livres, juntou-se à fase aquosa anterior acetato de etilo como solvente orgânico e ácido trifluoroacético (TFA) na proporção 100:1. Geralmente é utilizado o ácido sulfúrico; no entanto, Scott & Canário (1992 *in* Scott & Vermeirssen, 1994) substituíram este ácido pelo



TFA por ser mais fácil de remover devido à sua maior volatilidade. Após incubação a 40°C durante a noite, a solução foi evaporada num banho a 40°C e com o auxílio de um fluxo de azoto gasoso. Em seguida, juntaram-se 0.25 ml de tampão acetato e extraíram-se os esteróides libertos com 3ml de éter dietílico.

A desconjugação dos esteróides glucuronizados é feita por hidrólise enzimática. À fase aquosa obtida anteriormente, foram adicionados 10 µl da enzima β-glucuronidase, tendo-se deixado a solução a incubar a 37°C (noite). Os esteróides assim libertos foram extraídos com éter dietílico. Cada fracção foi diluída em 1 ml de tampão acetato com BSA e congelada até posterior utilização. Nas extracções a fase aquosa foi congelada num banho de etanol a -30°C; o éter foi evaporado num evaporador de vácuo (SpeedVac Plus SC1101-SAVANT); as centrifugações foram feitas a 700 rpm durante 3 min .

3.2.2.2 Radioimunoensaios (RIA)

Esta técnica permite a quantificação dos esteróides em estudo, através da sua ligação a anticorpos específicos para os mesmos. Baseia-se na competição entre um marcador radioactivo e a hormona fria, não marcada, para um número limitado de sítios de ligação nas moléculas de anticorpo (Vília, 1995). Com base em concentrações conhecidas de hormona fria e marcador, determina-se uma curva padrão, a partir da qual se determina a concentração da hormona em estudo (Vília, 1995).

A quantidade de marcador utilizada na quantificação de cada hormona foi a que permitia 1500 cpm em 100 µl de solução; a quantidade de anticorpo era a que correspondia a *c.a.* 50% de ligação marcador-anticorpo, tendo sido determinada previamente para cada hormona, por titulação. Após incubação a 4°C, foram adicionados a cada tubo 750 µl de solução de carvão activado e dextrano, aguardando-se o tempo necessário até a reacção atingir o equilíbrio (12 min). Procedeu-se então à sua centrifugação a 2000 rpm, durante 12 min a 4°C , após o que se transferiu o sobrenadante para tubos de cintilação de polietileno. Juntou-se líquido de cintilação a cada tubo (4 ml ou 8 ml *c.f.* a dimensão dos tubos). Após agitação dos tubos, estes foram introduzidos num contador de radiações beta (Beckman LS 6000 Series Liquid Scintillation System), sendo a radioactividade em cada tubo contada durante 8min. Este aparelho fornece-nos indicação do número de cpm por amostra, tendo sido estes dados transformados em concentração de esteróide por amostra.

Determinámos as concentrações dos esteróides 11-cetotestosterona (11-KT), testosterona (T) e 17α,20β-dihidroxi-4-pregnen-3-ona (17,20β-P) segundo esta



metodologia, nas amostras de urina recolhidas de machos que tinham acesso total aos estímulos emitidos por uma fêmea, um macho e controle, respectivamente. Apenas nos foi possível a quantificação da $17\alpha,20\alpha$ -dihidroxi-4-pregnen-3-ona ($17,20\alpha$ -P) na situação de acesso total a uma fêmea.

As características dos RIA para a T e $17,20\beta$ -P são descritas por Scott, MacKenzie e Stacey (1984 *in* Oliveira *et al.*, 1996); 11-KT, por Scott e Sumpter (1988 *in* Oliveira *et al.*, 1996) e $17,20\alpha$ -P por Canário e Scott (1989 c).

3.2.3 Análise estatística

Para testar se havia ou não influência do tipo de tratamento a que foram sujeitos os indivíduos, bem como se a estimulação provocava alguma variação temporal nos níveis hormonais, foram feitas comparações através de análise de variância (ANOVA) para mediadas repetidas.

Após a transformação logarítmica dos dados da concentração de testosterona, o índice de correlação entre a média e o desvio padrão baixou consideravelmente (de $r=0.96$ para $r=0.25$). Com o teste de Levene pudémos concluir a existência de homogeneidade na variância ($F=0.77$, $p=0.63$). Por vezes foi necessária a transformação logarítmica dos dados de modo a reduzir a correlação entre a média e o desvio padrão das variáveis. Relativamente 11-KT, após a transformação logarítmica dos dados, o índice de correlação entre a média e o desvio padrão baixou ligeiramente (de $r=0.94$ para $r=0.72$). No entanto, com o teste de Levene pudémos concluir a existência de homogeneidade na variância ($F=1.77$, $p=0.11$).

Na $17,20\beta$ -P, a média e o desvio padrão dos dados não se encontram correlacionados ($r=0.21$), não tendo sido necessária a sua transformação. Por outro lado, a variância é homogénea nesses dados ($F=1.33$, $p=0.24$); para a $17,20\alpha$ -P, a correlação entre a média e o desvio padrão baixou com a transformação logarítmica dos dados (de $r=0.66$ para $r=-0.18$). Por outro lado, a variância desses dados era homogénea ($F=1.41$, $p=0.26$).

Para análise dos dados das hormonas 11-KT, T e $17,20\beta$ -P, foram definidos dois factores de medidas repetidas, cada um com três níveis, respectivamente: 1-tempo (0h, 6h, >24h); 2-tratamento a que o peixe foi sujeito (c/fêmea, c/macho, controle). Após a análise do efeito de cada factor e da interacção entre ambos, foram efectuadas comparações planeadas. No caso da $17,20\alpha$ -P foi apenas definido um factor de medidas repetidas: tempo (0h, 6h, >24h).



Para cada tipo de tratamento a que os peixes foram sujeitos, foram efectuadas correlações de Spearman entre os níveis hormonais encontrados e os dados obtidos para os comportamentos.

3.3 RESULTADOS

As diferenças significativas para $p < 0.05$ e para $p < 0.01$, estão assinaladas por * e ** respectivamente.

3.3.1 Testosterona

No gráfico da Fig. 3.1a podemos verificar um aumento da concentração média de testosterona na urina dos machos na presença de uma fêmea, sendo o valor encontrado passadas mais de 24h da introdução da fêmea, superior ao dobro da concentração inicial. A introdução de um macho não parece afectar a concentração inicial e na situação controle há uma diminuição da concentração das 0h para as 6h. Na Tabela 3.1 estão representados os resultados da ANOVA para os dados transformados. Há um efeito significativo de cada um dos factores considerados; as diferenças significativas entre os níveis do mesmo tratamento, estão representadas no gráfico da Fig. 3.1a.

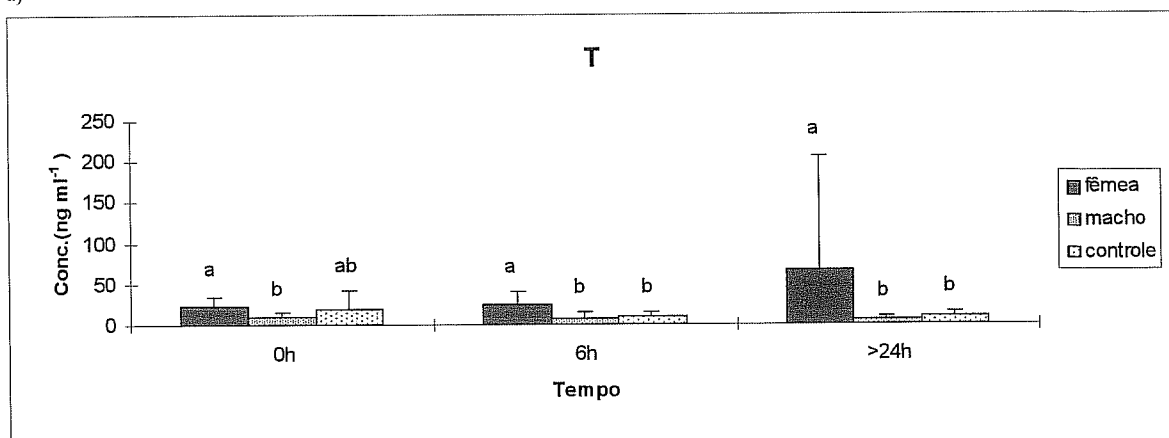
TABELA 3.1: Resultados da ANOVA de medidas repetidas para os valores log transformados da testosterona; 1 e 2 representam os dois factores de medidas repetidas, cada um com três níveis (0h, 6h, >24h e c/fêmea, c/macho, controle, respectivamente)

Efeito	g.l. efeito	efeito MS	g.l.erro	erro MS	F	p
1.tempo	2	0.08	14	0.02	4.04	0.04 *
2.tratam.	2	1.96	14	0.08	23.14	0.00 **
interacção	4	0.04	28	0.05	0.75	0.57

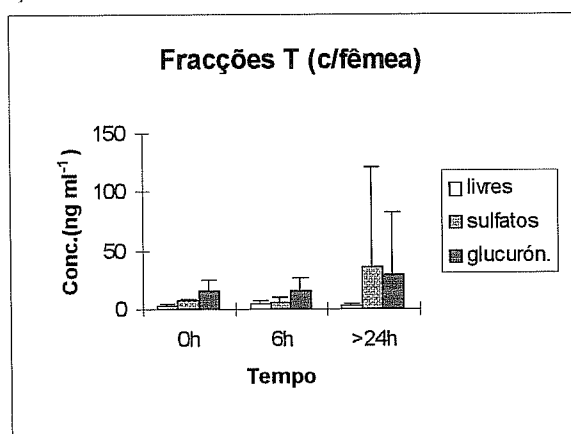
Nos gráficos da Fig. 3.1.b-d), está representado o contributo médio de cada fracção de esteróide para o total encontrado, em cada hora. Verifica-se que em todas as situações, os esteróides livres existem em menores quantidades, sendo as formas conjugadas que mais contribuem para os valores totais.



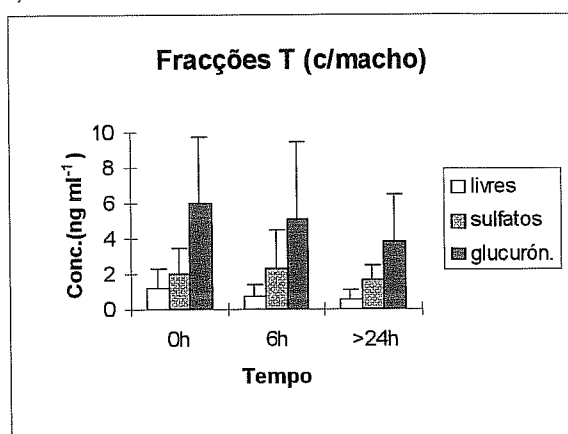
a)



b)



c)



d)

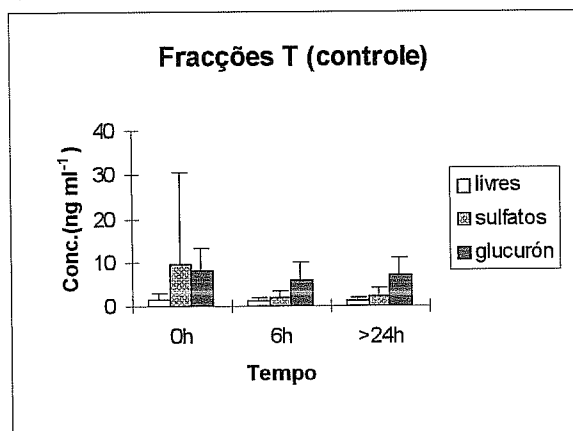


Figura 3.1: Variação média da concentração de testosterona nas amostras de urina de machos:

a) na presença de uma fêmea, quando estiveram sujeitos a um máximo de 2h de interação com um macho, ou quando foram controle. Para cada hora, as letras diferentes representam diferenças encontradas através de comparações planejadas entre níveis dos factores da ANOVA de medidas repetidas. Os resultados gerais desta análise estão representados na Tabela 3.1. As barras representam o desvio padrão.

b)-d) Fracções constituintes (livres, sulfatos e glucuronídeos) que contribuem para os níveis médios totais de T em cada uma das situações anteriores. As barras representam o desvio padrão.



3.3.2 11-Cetotestosterona

A presença de uma fêmea provoca um aumento da concentração média desta hormona na urina dos machos, atingindo-se um pico às 6h, cujo valor é quase o dobro do valor inicial (Fig. 3.3 a). Na Tabela 3.2 estão representados os resultados da ANOVA para os dados transformados:

Tabela 3.2: Resultados da ANOVA de medidas repetidas para os valores log transformados da 11-cetotestosterona; 1 e 2 representam os dois factores de medidas repetidas, cada um com três níveis (0h, 6h, >24h e c/fêmea, c/macho, controle, respectivamente)

Efeito	g.l. efeito	efeito MS	g.l.erro	erro MS	F	p
1.tempo	2	0.04	14	0.02	1.83	0.197
2.tratam.	2	0.70	14	0.04	17.59	0.00 **
interacção	4	0.05	28	0.03	2.01	0.12

Não se encontra um efeito temporal, mas há influência muito significativa do tipo de tratamento. Para cada hora, as diferenças significativas entre os níveis de tratamentos estão representadas na Fig. 3.2 a.

Como se pode verificar pela análise dos gráficos da Fig. 3.2 b-d, também no caso da 11-cetotestosterona, são geralmente os glucurónidos que existem em maiores quantidades nas amostras de urina dos machos, em qualquer dos tratamentos.

É de notar que a quantidade total de androgénios aumenta das 0h para as 6h, mantendo-se sensivelmente constante das 6h para as >24h.

3.3.3 17,20 β -P

Na presença de uma fêmea, os níveis urinários de 17,20 β -P praticamente não variam; no entanto, verifica-se uma redução da concentração desta hormona na presença de um macho e no controle, sendo os valores às 6h e >24h menores que os iniciais (Fig. 3.3 a).

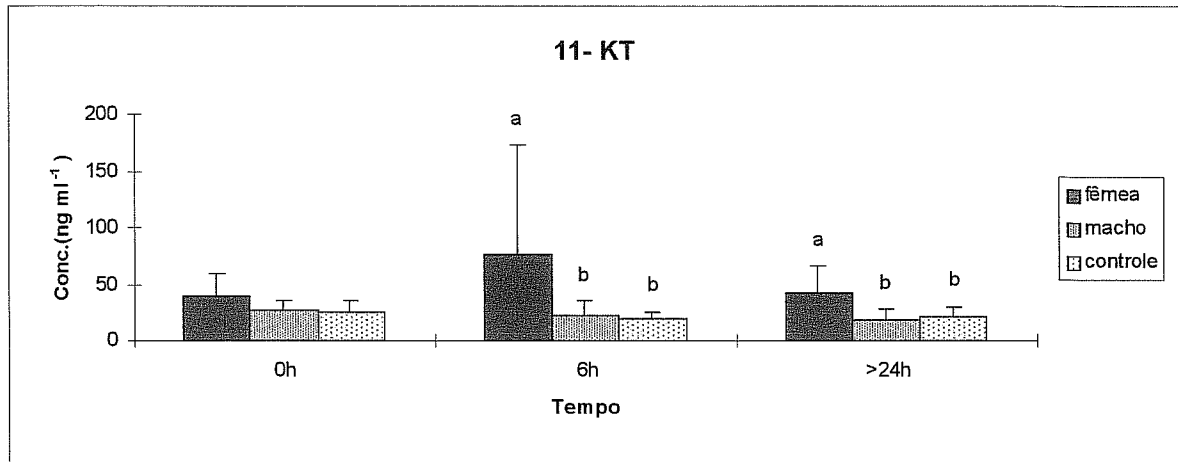
A análise estatística não revelou a existência de diferenças significativas nos níveis hormonais, provocadas por um efeito temporal, nem pelo tipo de estímulo a que os machos foram sujeitos (Tab. 3.3).

Tabela 3.3: Resultados da ANOVA de medidas repetidas para os valores de 17,20 β -P; 1 e 2 representam os dois factores de medidas repetidas, cada um com três níveis (0h, 6h, >24h e c/fêmea, c/macho, controle, respectivamente)

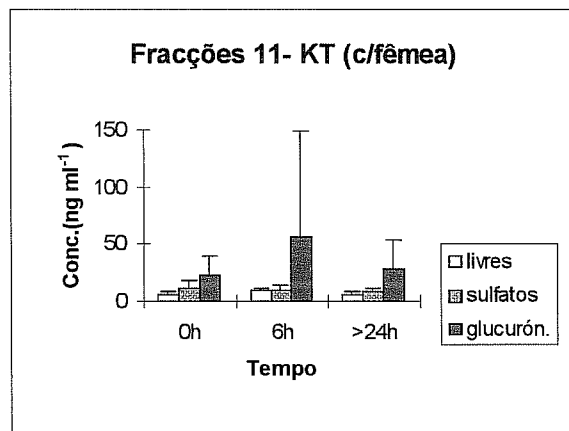
Efeito	g.l. efeito	efeito MS	g.l.erro	erro MS	F	p
1.tempo	2	39185.20	14	12763.35	3.07	0.078
2.tratam.	2	160114.70	14	49704.50	3.22	0.07
interacção	4	5764.7	28	13979.73	0.41	0.798



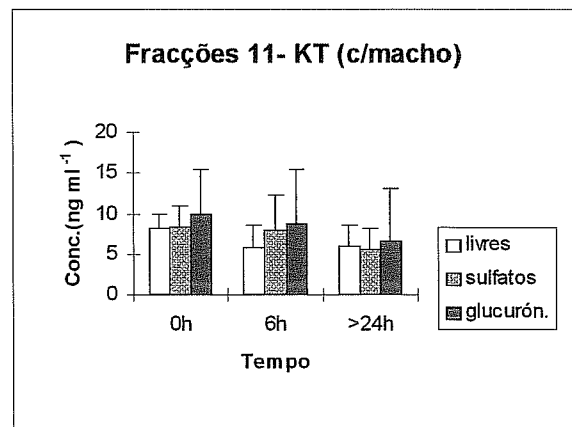
a)



b)



c)



d)

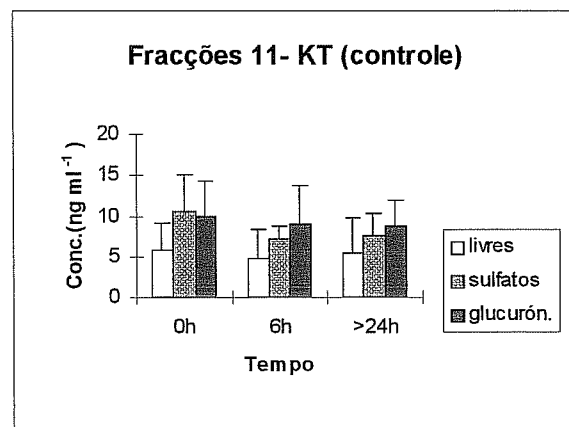


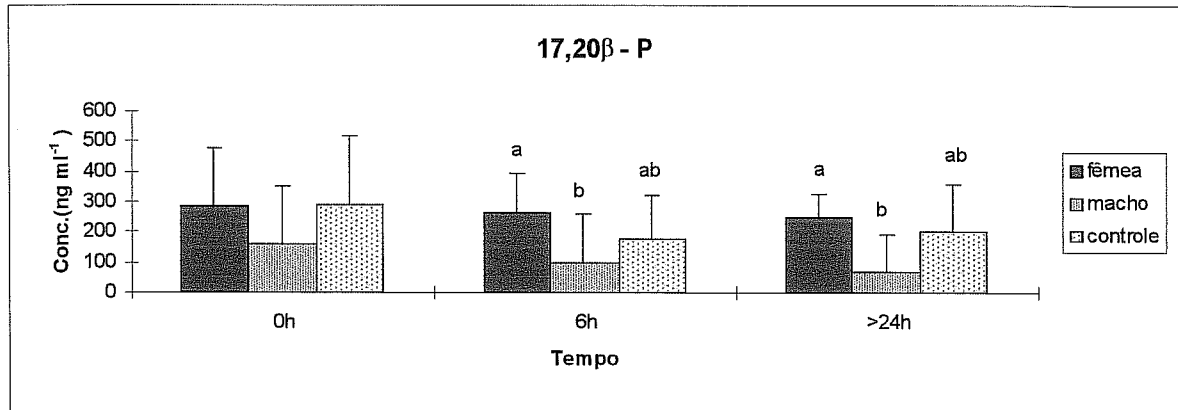
Figura 3.2: Variação média da concentração de 11-cetotestosterona nas amostras de urina de machos:

a) na presença de uma fêmea, quando estiveram sujeitos a um máximo de 2h d interação com um macho, ou quando foram controle. Para cada hora, as letras diferentes representam diferenças encontradas através de comparações planejadas entre níveis dos factores da ANOVA de medidas repetidas. Os resultados gerais desta análise estão representados na Tabela 3.2. As barras representam o desvio padrão.

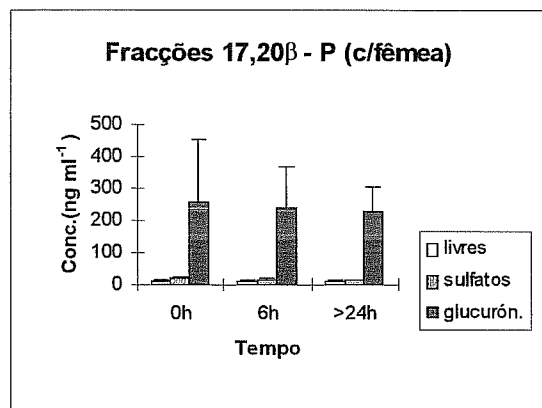
b)-d): Fracções constituintes (livres, sulfatos e glucuronídeos) que contribuem para os níveis médios totais de 11-KT em cada uma das situações anteriores. As barras representam o desvio padrão.



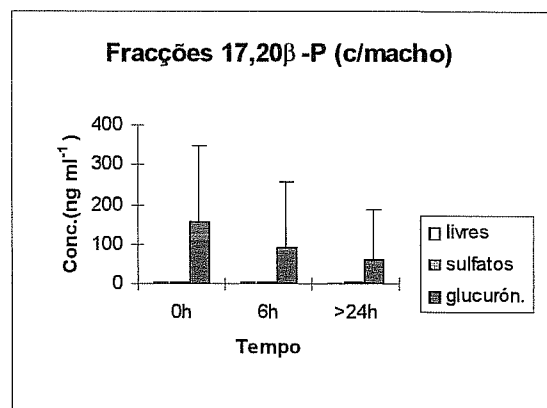
a)



b)



c)



d)

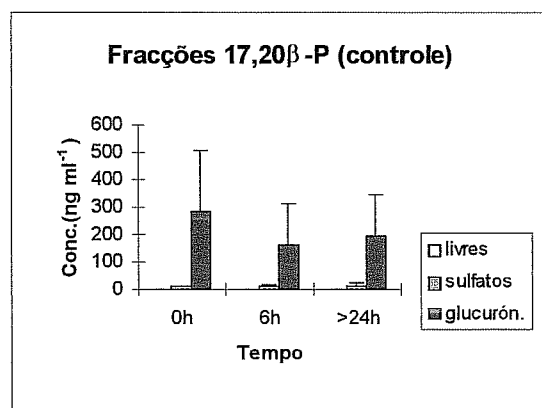


Figura 3.3: Variação média da concentração de 17,20β-P nas amostras de urina de machos:

a) na presença de uma fêmea, quando estiveram sujeitos a um máximo de 2h de interação com um macho ou quando foram controle. Para cada hora, as letra diferentes representam diferenças encontradas através de comparações planejadas entre níveis dos factores da ANOVA de medidas repetidas. Os resultados gerais desta análise estão representados na Tabela 3.3. As barras representam o desvio padrão.

b)-d): Frações constituintes (livres, sulfatos e glucuronidos) que contribuem para os níveis médios totais de 17,20β-P em cada uma das situações anteriores. As barras representam o desvio padrão.



As diferenças encontradas entre os machos com uma fêmea e com um macho (indicadas na Fig.3.3 a) devem-se à redução dos níveis hormonais na presença de um macho (nas comparações planeadas, há diferença entre as 0h e as 6h: $F=9.25$, $p=0.019$ e entre as 0h e as 24h: $F=10.07$, $p=0.016$). Os níveis encontrados de $17,20\beta$ -P são quase na totalidade devidos à presença de formas glucuronizadas, estando as formas livres e sulfatadas deste esteróide quase ausentes (Fig. 3.3 b-d).

3.3.4 $17,20\alpha$ -P

Como se pode verificar na Fig. 3.4, na presença de uma fêmea, há uma redução dos níveis médios de $17,20\alpha$ -P para as 6h após a introdução do estímulo, voltando a aumentar passadas mais de 24h.

Tabela 3.4: Resultados da ANOVA medidas repetidas para os valores log transformados de $17,20\alpha$ -P na presença de uma fêmea; considera-se apenas um factor de medidas repetidas (tempo), com três níveis (0h, 6h, >24h, respectivamente)

Efeito	g.l. efeito	efeito MS	g.l.erro	erro MS	F	p
1.tempo	2	0.03	14	0.04	0.67	0.52

A variação temporal referida anteriormente não é estatisticamente significativa (Tabela 3.4). Como se pode ver no gráfico da Fig. 3.4, também para esta hormona, as formas glucuronizadas se encontram em muito maiores concentrações, na urina dos machos na presença de uma fêmea, do que as livres e sulfatadas.

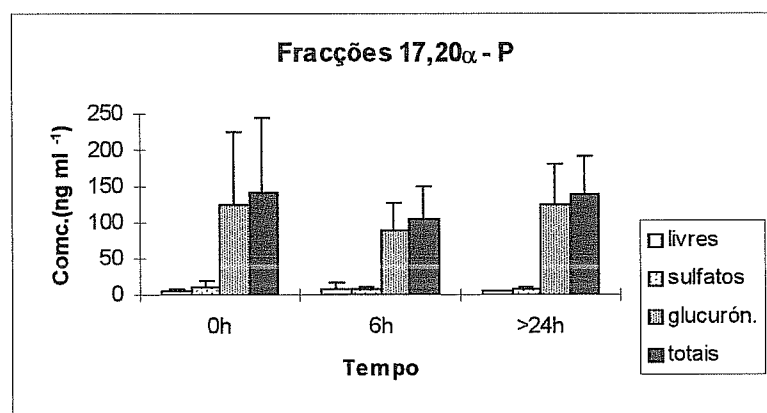


Figura 3.4: Fracções constituintes (livres, sulfatos e glucurónidos) que contribuem para os níveis médios totais de $17,20\alpha$ -P nas amostras de urina de machos na presença de uma fêmea. As barras representam o desvio padrão.

O total das concentrações urinárias de progestinas é sempre superior ao de androgénios.



3.3.5 Correlações entre hormonas e comportamentos

Nas Tabelas 3.5 a 3.7 estão expostos os valores das correlações entre os níveis hormonais encontrados e entre estes e alguns parâmetros comportamentais, nas três situações.

Os níveis de testosterona apresentados às 0h estão correlacionados com os das 6h e/ou >24h, nas três situações. O mesmo se passa com a 11-KT, mas apenas na presença de um macho ou no controle. Os níveis dos dois androgénios surgem quase sempre correlacionados. Os níveis de progestinas surgem sempre correlacionados entre si e com os níveis de um ou ambos os androgénios.

Os níveis de testosterona às 0h, nunca surgem correlacionados com os parâmetros comportamentais, apresentados nas horas seguintes, na presença de uma fêmea. No entanto parecem estar correlacionados positivamente com a dimensão do ninho, no controle (embora só seja significativo às >24h). Também os níveis de T às 0h surgem correlacionados com a frequência de interacções agonísticas logo após a introdução de um macho.

No controle, não há correlação dos níveis de T às 6h com parâmetros comportamentais, o mesmo se passando quando é introduzida uma fêmea. No entanto, quando se introduz um macho, os níveis apresentados às 6h e às 24h, estão correlacionados com a frequência de interacções agonísticas em momentos anteriores, no início da interacção entre os dois machos. Passadas >24h após a introdução de uma fêmea, os níveis de T correlacionam-se com as frequências de comportamentos sexuais e agonísticos à mesma hora.

Após os período de isolamento, não se encontram quaisquer correlações entre os níveis de 11-KT e os comportamentos à mesma hora e na horas seguintes.

Às 6h, no controle, surgem correlacionados positivamente com a dimensão do ninho em horas anteriores. No entanto, na presença de uma fêmea, a correlação encontrada é negativa. Na presença de um macho, os valores de 11-KT às 6h, têm uma correlação positiva mais forte com a frequência de comportamentos agonísticos no momento inicial da interacção entre os machos (de um modo semelhante ao que se passava com a testosterona). Quando o macho interage com a fêmea, há um aumento da correlação (negativa) com a dimensão do ninho, com a frequência de comportamentos agonísticos



(negativa) e com a frequência de comportamentos reprodutores (positiva) exibidos em horas anteriores e os níveis de 11-KT às 6h

No controle verificam-se correlações positivas entre a dimensão do ninho às 24h e os níveis de 17,20 β -P às 6h e 24h, respectivamente. Na presença de um macho, não se encontra qualquer correlação entre os níveis desta hormona e os comportamentos.

Verifica-se que os níveis iniciais de progesterona se correlacionam negativamente com a coloração apresentada pelo macho e com a frequência de comportamentos sexuais, no decorrer da interacção com a fêmea. No entanto, há uma inversão no sinal destas correlações, quando se comparam estes comportamentos às 2h e às 6h, com os níveis das progesteronas às 6h. Estes níveis hormonais correlacionam-se negativamente com a frequência de comportamentos agonísticos e com as dimensões dos ninhos registadas em horas anteriores e positivamente com a frequência de comportamentos sexuais

TABELA 3.5: Índices de correlação de Spearman entre os níveis urinários de esteróides e entre estes e os parâmetros comportamentais apresentados em 2.3. quando o estímulo foi uma fêmea. * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$.

fêmea	T			11-KT			17,20 β -P			17,20 α -P		
	0h	6h	>24h	0h	6h	>24h	0h	6h	>24h	0h	6h	>24h
T 0h	-											
T 6h	0.90 **	-										
T 24h	0.74 *	0.83 **	-									
11-KT 0h	0.69	0.38	0.14	-								
11-KT 6h	0.50	0.69	0.33	0.19	-							
11KT 24h	0.76 *	0.83 **	0.52	0.52	0.86 **	-						
17,20 β -P 0h	0.14	-0.21	-0.24	0.76 *	-0.38	-0.05	-					
17,20 β -P 6h	0.14	0.48	0.28	-0.26	0.86 **	0.55	-0.64	-				
17,20 β -P >24h	-0.07	-0.28	-0.21	0.28	-0.02	0.02	0.36	-0.21	-			
17,20 α -P 0h	0.28	-0.14	-0.25	0.78 *	-0.32	-0.04	0.96 **	-0.54	0.25	-		
17,20 α -P 6h	0.07	0.46	0.32	-0.18	0.86 **	0.61	-0.57	0.96 **	0.00	-0.46	-	
17,20 α -P >24h	-0.28	-0.43	-0.64	0.18	0.11	0.07	0.39	0.00	0.75 *	0.43	0.18	-
cor 0h	0.51	0.51	0.39	0.39	0.05	0.32	0.24	-0.05	-0.73	0.408	-0.15	-0.44
cor 0'h	-0.14	-0.34	-0.36	0.18	-0.45	-0.20	0.32	-0.65	0.06	0.29	-0.74 *	0.07
cor 30'	-0.20	-0.10	-0.18	-0.52	0.08	-0.25	-0.70 *	0.15	-0.07	-0.73	0.00	-0.41
cor 1h	-0.05	0.15	0.01	-0.49	0.44	0.02	-0.81 **	0.56	-0.09	-0.78 *	0.48	-0.26
cor 2h	-0.04	0.24	-0.12	-0.24	0.67	0.38	-0.55	0.76	-0.48	-0.47	0.78 *	0.04
cor 6h	-0.04	0.10	-0.31	0.01	0.626	0.27	-0.22	0.675	-0.23	-0.04	0.730	0.37
cor >24h	0.07	0.06	-0.19	0.20	0.17	0.01	0.13	0.23	-0.53	0.49	0.02	0.14
ninho 0h	0.17	-0.05	0.36	0.07	-0.61	-0.34	0.19	-0.66	0.22	0.15	-0.85	-0.41
ninho 1h	-0.22	-0.38	0.10	-0.23	-0.74 *	-0.62	0.08	-0.65	0.34	-0.05	-0.79 *	-0.23
ninho 2h	-0.09	-0.28	0.14	-0.07	-0.57	-0.43	0.12	-0.52	0.33	0.11	-0.71	0.00
ninho 6h	-0.31	-0.14	0.26	-0.57	-0.21	-0.31	-0.40	0.17	-0.24	-0.43	0.07	-0.11
ninho >24h	-0.45	-0.21	0.00	-0.45	0.05	-0.10	-0.21	0.43	-0.17	-0.28	0.50	0.32
sex 0'h	0.17	-0.71	-0.71	0.31	-0.17	0.07	0.19	-0.48	0.40	0.14	-0.50	0.07
sex 30'	0.20	0.34	0.40	-0.38	0.25	0.13	-0.76 *	0.25	-0.05	-0.72	0.11	-0.45
sex 1h	0.11	0.25	0.16	-0.24	0.56	0.37	-0.61	0.48	0.42	-0.67	0.50	0.00
sex 2h	0.26	0.45	0.24	-0.14	0.76 *	0.55	-0.67	0.71 *	-0.05	-0.50	0.61	0.04
sex 6h	0.26	0.45	0.33	0.02	0.71 *	0.74	-0.36	0.62	0.14	-0.36	0.64	0.28
sex >24h	0.25	0.42	0.623	-0.11	0.36	0.41	-0.32	0.48	-0.08	-0.29	0.52	0.05
ago 0'h	-0.15	0.11	0.45	-0.59	-0.06	-0.22	-0.45	0.33	-0.27	-0.64	0.45	-0.49
ago 30'	0.08	-0.10	0.18	0.38	-0.50	-0.17	0.71 *	-0.48	-0.01	0.86 **	-0.50	0.17
ago 1h	-0.20	-0.32	0.05	-0.07	-0.84 **	-0.51	0.36	-0.74 *	-0.22	0.36	-0.79 *	-0.23
ago 2h	-0.09	-0.29	0.10	0.14	-0.76	-0.42	0.57	-0.76 *	0.25	0.49	-0.79 *	-0.08
ago 6h	-0.24	-0.44	-0.20	-0.01	-0.91 **	-0.65	0.42	-0.91 **	-0.13	0.26	-0.91 **	-0.35
ago >24h	0.20	0.28	0.66 *	-0.20	-0.38	-0.17	-0.10	-0.20	-0.50	-0.18	-0.30	-0.90 **



TABELA 3.6: Índices de correlação de Spearman entre os níveis urinários de esteróides e entre estes e os parâmetros comportamentais apresentados em 2.3. quando o estímulo foi um macho. * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$.

	T			11-KT			17,20 β -P		
	0h	6h	>24h	0h	6h	>24h	0h	6h	>24h
macho									
T 0h	-								
T 6h	0.93 **	-							
T 24h	0.40	0.47	-						
11-KT 0h	0.69 *	0.48	0.59	-					
11-KT 6h	0.83 **	0.74 *	0.62	0.71 *	-				
11KT 24h	0.38	0.14	0.43	0.83 **	0.40	-			
17,20 β -P 0h	0.28	0.21	-0.17	0.31	-0.05	0.43	-		
17,20 β -P 6h	0.86 **	0.88 **	0.24	0.45	0.48	0.31	0.52	-	
17,20 β -P >24h	0.71 *	0.64	0.26	0.55	0.50	0.62	0.48	0.81 **	-
cor									
cor 0h	0.32	0.17	-0.21	0.23	0.35	-0.21	-0.02	-0.04	-0.27
cor 0'h	-0.17	-0.30	0.19	0.33	-0.16	0.47	-0.23	-0.17	0.12
cor 30'	-0.27	-0.26	0.49	0.29	-0.14	0.23	-0.23	-0.33	-0.24
cor 1h	-0.21	-0.21	0.42	0.18	-0.07	0.12	-0.59	-0.30	-0.21
cor 2h	-0.15	-0.36	-0.05	0.36	-0.22	0.61	0.07	-0.10	0.24
cor 6h	-0.59	-0.75	-0.66	-0.26	-0.51	0.01	0.15	-0.57	-0.23
cor 24h	-0.34	-0.59	-0.59	0.02	-0.37	0.25	0.48	-0.34	-0.22
ago									
ago 0'h	0.69	0.67	0.43	0.40	0.88	-0.05	-0.31	0.28	0.17
ago 30'	0.36	0.48	0.81 **	0.28	0.57	0.14	-0.26	0.21	0.07
ago 1h	0.14	0.26	0.14	-0.43	0.20	-0.60	-0.31	0.08	-0.43
ago 2h	0.10	0.20	0.60	0.30	0.40	0.60	0.10	0.20	0.20

TABELA 3.7: Índices de correlação de Spearman entre os níveis urinários de esteróides e entre estes e os parâmetros comportamentais apresentados em 2.3. na situação controle. * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$.

	T			11-KT			17,20 β -P		
	0h	6h	>24h	0h	6h	>24h	0h	6h	>24h
controle									
T 0h	-								
T 6h	0.69	-							
T 24h	0.83 **	0.81 **	-						
11-KT 0h	0.88 **	0.71 *	0.88 **	-					
11-KT 6h	0.62	0.86 **	0.74 *	0.50	-				
11KT 24h	0.81 **	0.74 *	0.98 **	0.81 **	0.69	-			
17,20 β -P 0h	0.67	0.60	0.64	0.90 **	0.28	0.52	-		
17,20 β -P 6h	0.4	0.76 *	0.40	0.48	0.62	0.24	0.57	-	
17,20 β -P >24h	0.60	0.88 **	0.62	0.62	0.83 **	0.48	0.59	0.88 **	-
cor									
cor 0h	0.05	0.18	0.48	0.17	0.33	0.54	0.01	-0.12	-0.05
cor 0'h	0.10	0.28	0.49	0.20	0.37	0.53	0.06	0.10	0.04
cor 30'	0.26	0.24	0.51	0.20	0.27	0.62	-0.06	-0.13	-0.15
cor 1h	0.25	0.26	0.54	0.24	0.22	0.67	-0.05	-0.24	-0.18
cor 2h	0.38	0.30	0.65	0.40	0.25	0.78 *	0.12	-0.25	-0.12
cor 6h	0.45	0.29	0.70 *	0.48	0.28	0.81	0.21	-0.22	-0.08
cor 24h	0.28	0.20	0.62	0.50	0.14	0.62	0.34	-0.01	-0.01
ninho									
ninho 0h	0.41	0.30	0.46	0.37	0.49	0.35	0.24	0.48	0.44
ninho 1h	0.53	0.47	0.57	0.49	0.61	0.47	0.36	0.60	0.56
ninho 2h	0.53	0.47	0.57	0.49	0.61	0.47	0.36	0.60	0.56
ninho 6h	0.57	0.48	0.60	0.50	0.62	0.50	0.33	0.57	0.55
ninho 24h	0.64	0.52	0.64	0.62	0.59	0.52	0.48	0.62	0.62



3.4 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho vêm confirmar a importância de estímulos sociais na modulação dos níveis de esteróides sexuais em *O. mossambicus*. Dos androgénios estudados, a 11-KT foi o que teve um aumento mais rápido na presença da fêmea. O facto de se ter verificado um aumento na correlação dos níveis de androgénios, principalmente de 11-KT, com a frequência de comportamentos sexuais na presença de uma fêmea, mostra a importância desta hormona na regulação dos comportamentos sexuais do macho; os níveis de androgénios não são bons preditores da frequência de comportamentos sexuais, mas os comportamentos sexuais no decorrer da interacção modulam os níveis hormonais (o que se traduz no aumento da correlação).

O aumento da correlação que se verifica entre a coloração e os níveis de 11-KT, como resultado da interacção social entre o macho e a fêmea, evidencia a importância deste androgénio também na regulação de caracteres sexuais secundários dos machos de *O. mossambicus*.

Ainda não está determinado se a T e a 11-KT têm um papel idêntico no desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários e no comportamento reprodutor (Liley & Stacey, 1983); a influência dos níveis de androgénios sobre os caracteres sexuais secundários e comportamentos reprodutivos tem sido estudada em várias espécies (revisões por Liley & Stacey, 1983; Matty, 1985). Muitos trabalhos incidem na administração de androgénios a fêmeas ou a machos castrados; os resultados são por vezes o aparecimento/acentuação de caracteres sexuais dos machos, como colorações nupciais, desenvolvimento de gonopódio e de comportamentos típicos dos machos.

Em ciclídeos, trabalhos de castração/ substituição obtiveram resultados contraditórios: Em *Tilapia macrocephala*, Aronson & Holz-Tucker (1947) verificaram que o tratamento com testosterona provocou alteração da coloração. Resultados idênticos foram obtidos no trabalho de Levy & Aronson (1955): machos castrados continuaram a escavar ninhos com a mesma frequência de machos intactos, embora tenham alterado a coloração; os resultados da castração eram revertidos pelo tratamento com testosterona. Em *Aquidens latifrons*, Aronson *et al.* (1960) verificaram que a castração de machos não alterou comportamentos como a construção e limpeza do ninho, embora tenha alterado a



coloração nupcial. Blüm & Fiedler (1965) concluíram que a construção do ninho em vários ciclídeos está dependente de hormonas das gónadas.

Outros estudos com tratamentos com androgénios, com ou sem castração, demonstram o papel endócrino na regulação da coloração nupcial em tilapias (e.g. Levy & Aronson, 1955 para *Sarotherodon macrocephala*; Billy, 1982 in Liley & Stacey, 1983 para *O. mossambicus*). Clemens & Inslee (1968 in Liley, 1969) obtiveram reversão funcional do sexo de *O. mossambicus* em fêmeas genéticas por tratamento com metiltestosterona nos primeiros 69 dias de vida. Os peixes revertidos exibiam a coloração típica dos machos e o comportamento de construção do ninho, quando na presença de fêmeas maduras.

Em quase todas as espécies de peixes estudadas, os caracteres sexuais masculinos e pelo menos alguns dos componentes do comportamento sexual estão de algum modo sob controle hormonal das gónadas.

Estudos experimentais de castração-substituição e comportamentos em teleósteos têm-se limitado à testosterona e aos seus derivados sintéticos, principalmente metiltestosterona (MT) (Mayer *et al.*, 1994). No entanto em muitos teleósteos estudados a 11-KT está claramente associada à actividade reprodutiva: em salmonídeos a T parece estar envolvida na espermiogénese enquanto a 11-KT está mais envolvida no início da espermiacção (Kime & Manning, 1982; Fostier *et al.*, 1987); a 11-KT parece ser o principal androgénio no salmão-atlântico, *Salmo salar* (Idler *et al.*, 1971; Idler *et al.*, 1976), e no linguado (Idler *et al.*, 1976). Katz e Eckstein (1974 in Idler *et al.*, 1976) referem pela primeira vez a ocorrência de 11-KT em *Tilapia aurea*. Na tilapia azul, *O. aureus*, Mol *et al.* (1994) encontraram elevados níveis de testosterona tanto em machos como em fêmeas e de 11-KT em grandes quantidades apenas nos machos.

Em estudos realizados com esgana-gata, *G. aculeatus* (Rouse *et al.*, 1977; Borg, 1987 in Mayer *et al.*, 1990 a, b; Borg *et al.*, 1989; Mayer *et al.*, 1994) e com *Lepomis macrochirus* (Kindler *et al.*, 1991 in Mayer *et al.*, 1994), a 11-KT surge como o androgénio mais importante na regulação dos caracteres sexuais secundários e comportamentos sexuais. Mayer *et al.* (1994) referem que os machos desta espécie podem converter a 11-cetoandrostenediona em 11-KT. Rastogi & Chieffi (1975) concluem que a 11-KT é o androgénio mais potente no desenvolvimento de caracteres sexuais secundários em *Xiphophorus helleri*.

Em salmonídeos e noutras espécies, a aquisição de caracteres sexuais secundários surge correlacionada com elevados níveis de 11-KT (Liley & Stacey, 1983). Também o



tratamento com este androgénio em *O. nerka*, resulta no desenvolvimento da coloração típica dos machos. Em *O. mossambicus*, a administração de 11-KT numa fase inicial de desenvolvimento permite a obtenção de populações 100% machos (Hunter & Donaldson, 1983).

Em machos de *O. mossambicus*, tal como noutras espécies de teleósteos, dos androgénios estudados a 11-KT parece ser o principal. O facto de nesta espécie os androgénios parecerem regular a coloração dos machos, não deve no entanto eliminar outros mecanismos reguladores. Segundo Neil (1964), é provável que as alterações mais rápidas da coloração sejam reguladas pelo sistema nervoso autónomo; Fujii (1993) refere que estas "alterações fisiológicas", podem ser controladas tanto pelo sistema endócrino como pelo nervoso.

O dimorfismo no tamanho do corpo que se verifica entre machos e fêmeas desta espécie poderá também ser regulada pela 11-KT, visto que uma das suas acções é a estimulação do crescimento em geral (Ganman & Lovell, 1991 e Woo *et al.*, 1991 *in* Mol *et al.*, 1994).

No nosso trabalho, os níveis de T antes da interacção entre os machos, são bons predictores da frequência de comportamentos agonísticos no início da interacção. Por outro lado, o facto de este androgénio estar fortemente implicado na regulação de comportamentos agonísticos em muitos teleósteos (*e.g.* revisão por Liley & Stacey, 1983), poderia levar-nos a associar esta hormona à regulação da agressividade e da 11-KT à regulação exclusiva de comportamentos reprodutivos. No entanto, a 11-KT poderá activar respostas comportamentais diferentes conforme os estímulos sociais. A associação entre os fenótipos comportamentais e os níveis de 11-KT em várias espécies, indica que este androgénio pode ter um papel importante no comportamento reprodutivo ou agressivo (Hourigan *et al.*, 1991). Em *O. mossambicus* a interacção entre o macho e uma fêmea, pode manter os comportamentos sexuais e inibir os agonísticos (visto que neste caso a correlação observada é negativa) e na presença de um macho, pode contribuir para a manutenção de agonísticos, visto haver uma correlação positiva (embora não significativa) entre os níveis de 11-KT e a frequência de comportamentos agonísticos com os machos intrusos. O facto de o mesmo esteróide poder influenciar comportamentos diferentes na presença de estímulos diferentes, permitiria uma maior plasticidade reguladora.



Como o comportamento agonístico surge muitas vezes associado à reprodução, é provável que o seu controle dependa, pelo menos em parte, dos mesmos mecanismos hormonais (Huntingford & Turner, 1987). Sabe-se que os androgénios podem afectar directamente a frequência de comportamentos agressivos em alguns ciclídeos e anabantídeos; Villars (1983) faz uma síntese dos trabalhos efectuados em várias famílias de teleósteos.

Quando o estímulo foi um macho intruso, não se verificou um aumento dos níveis de androgénios; os confrontos agonísticos poderiam ser mantidos por níveis mais baixos de androgénios. No entanto, estes resultados contrariam os de Oliveira *et al.* (1996), em que ambos os androgénios têm um aumento quando se formam grupos só de machos, diminuindo quando se formam grupos mistos; apenas se verifica um aumento de $17,20\alpha\text{-P}$ após a formação de grupos mistos. Provavelmente as diferenças devem-se a diferenças nas condições experimentais. Se calhar no nosso trabalho o tempo não foi suficiente para a definição de posições hierárquicas, numa fase em que ainda não havia estabelecimento total de território. Talvez isso seja necessário para que a continuação das interacções entre machos provoque um aumento nos níveis de esteróides. Seria interessante verificar a influência da introdução simultânea de vários machos intrusos, na variação a curto prazo dos perfis hormonais (a intervalos menores do que os utilizados por Oliveira *et al.*, 1996). O nosso trabalho baseia-se também num contexto diferente visto que apenas ocorrem interacções entre dois indivíduos.

Em centrarquídeos e gasterosteiformes, quando se provou estarem implicados esteróides sexuais na regulação de comportamentos agonísticos, o seu efeito era indirecto, através de alterações no comportamento de construção do ninho (Villars, 1983).

Kindler *et al.* (1989) reforçam a possibilidade de nos centrarquídeos os comportamentos de construção e defesa de ninho e outros comportamentos de pré-postura, estarem relacionados com os níveis plasmáticos de androgénios das gónadas.

Apesar de Oliveira *et al.* (1996) encontrarem uma correlação positiva entre as concentrações de androgénios (T e 11-KT) e progestinas ($17,20\alpha\text{-P}$ e $17,20\beta\text{-P}$) e a territorialidade e dimensão do ninho em machos de *O.mossambicus*, os nossos resultados foram diferentes. Apenas na situação controle se encontrou uma correlação positiva entre os níveis de 11-KT e a dimensão do ninho em horas anteriores, enquanto na presença da fêmea as correlações encontradas entre 11-KT e progestinas e o ninho foram negativas.



Este resultado é estranho, visto que na globalidade, há um aumento dos níveis de 11-KT e da dimensão do ninho, na presença de uma fêmea.

Scott *et al.* (1980 in Liley & Stacey, 1983) propuseram que a testosterona pode estar presente como um intermediário na síntese de cetotestosterona, ou desempenhar um papel nos primeiros estádios da espermiogénese. Apesar de poder ser produzida a partir de outra(s) via(s) metabólica(s), uma das principais vias de produção de 11-KT nos teleósteos envolve a conversão da testosterona em hidroxitestosterona e desta hormona em cetotestosterona (Idler *et al.*, 1969 in Idler *et al.*, 1971; Leitz & Reinboth 1985; Yeung *et al.*, 1993). Assim, parece haver variação entre espécies na biossíntese de 11-KT (Yeung *et al.*, 1993). Kime & Hyder (1983) detectaram em *O. mossambicus*, ambos os androgénios 11-oxigenados, 11 β -hidroxitestosterona e 11-cetotestosterona, em quantidades significativas. O facto de no nosso trabalho se terem encontrado níveis urinários de T idênticos aos de 11-KT nos machos de *O. mossambicus*, e de os níveis destes dois esteróides surgirem geralmente correlacionados, sugere que a principal via de produção de 11-KT é a referida.

O facto de a testosterona ser precursora de outras hormonas faz com que a sua presença não indique necessariamente a sua acção biológica. Mol *et al.* (1994) levantam a hipótese das elevadas concentrações de testosterona em ambos os sexos de *O. aureus* poderem dever-se ao facto desta hormona poder ser um precursor de 11-KT nos machos e de estradiol (E2) nas fêmeas.

Assim a T poderá ter um papel directo na regulação de interacções agonísticas e/ou indirecto pela sua conversão em 11-KT: a sua presença poderia apenas indicar o substrato para a conversão em 11-KT.

No nosso trabalho, só a 11-KT e as progestinas surgem correlacionadas com a coloração; talvez a importância da T na manutenção de caracteres sexuais secundários, descrita nos trabalhos referidos, passe pela sua metabolização em 11-KT.

O facto de ter havido um aumento dos níveis de 11-KT mais rápido do que de T na presença das fêmeas, leva-nos a supor que os estímulos emitidos pelas fêmeas poderão provocar um aumento dos níveis mínimos de androgénios, necessários na regulação da agressividade. A presença da fêmea poderá estimular um aumento da produção de T, que numa fase inicial é rapidamente metabolizada em 11-KT. Assim, após a regulação de comportamentos sexuais e coloração pela 11-KT e vice-versa, poderia haver inibição da



11 β -hidroxilase, mantendo-se elevados os níveis de produção de T. Isto permitiria ajustar a resposta agonística na presença de outros machos (pela conversão de T em 11-KT). Com a continuação da interacção, diminuiu a concentração urinária de 11-KT, acumulando-se T.

A capacidade de estímulos sociais alterarem sistemas enzimáticos é confirmada pelos trabalhos com a aromatase. Oliveira *et al.* (1996) também sugerem a inibição da enzima 11 β -hidroxilase, como consequência da subordinação, levando a uma acumulação de testosterona e redução na produção de 11-KT. Assim, a testosterona poderia manter os machos preparados para confrontos agonísticos (ajustando a resposta à intensidade de comportamentos agressivos) e a 11-KT estaria envolvida no desenvolvimento dos gâmetas e manutenção dos caracteres sexuais secundários.

Os níveis de ambas as progestinas por nós encontrados são superiores aos de androgénios; no entanto poderá acontecer que menores quantidades de androgénios sejam tão eficazes quanto níveis superiores de progestinas (dificuldade acrescida por se tratarem de níveis urinários e não plasmáticos); não temos informação suficiente sobre os níveis mínimos de cada hormona necessários para exercerem um efeito biológico.

Contrariamente aos resultados de Oliveira *et al.* (1996), no nosso trabalho não houve um aumento dos níveis urinários de progestinas após a introdução de fêmeas. No entanto, apesar da correlação entre o incremento do ninho e dos níveis de 17,20 β -P também ser negativa na presença de uma fêmea, esta foi a única situação testada em que não houve redução das concentrações desta progestina. Esta hormona deve de algum modo estar relacionada com a regulação da interacção com a fêmea; de facto, também se verifica um aumento da correlação entre os níveis de ambas as progestinas e a frequência de comportamentos sexuais, na presença da fêmea.

O facto de Oliveira *et al.* (1996) terem verificado subida dos níveis urinários de progestinas aquando da formação de grupos mistos pode significar que no nosso trabalho, os peixes não se encontravam no mesmo estágio de maturação. Parece haver nos testículos de vários teleósteos imediatamente antes ou durante o período final de maturação testicular, uma alteração no padrão esteróidogénico de C19-esteróides (androgénios) para C21-esteróides (progestinas) (Yoshikuni & Nagahama, 1991; Barry *et al.*, 1990; Sakai *et al.*, 1989). Muitas vezes, um declínio nos níveis de T e 11-KT parece coincidir com o início da espermiacção (Ueda *et al.*, 1983).



Segundo vários autores (e.g. Fostier *et al.*, 1987; Saad & Depêche, 1987; Billard, 1986) uma das acções da 11-KT poderia ser modular a produção da $17,20\beta$ -P; o aumento desta hormona no plasma do macho poderia aumentar a produção de esperma durante a postura, de modo a sincronizar a sua libertação com a oviposição (Fostier *et al.*, 1987). Barry *et al.* (1989) consideram a hipótese de a $17,20\beta$ -P ou uma molécula semelhante, poder ser também uma hormona parácrina que inibe a actividade das enzimas envolvidas na síntese de androgénios. A subsequente alteração das vias metabólicas controlaria os acontecimentos associados à postura. Ueda *et al.* (1983) consideram a provável influência da $17,20\beta$ -P no processo de hidratação do esperma. Scott & Baynes (1982) referem a possível função desta hormona no processo de aquisição de mobilidade dos espermatozóides.

Provavelmente as gónadas dos indivíduos utilizados por Oliveira *et al.* (1996) encontravam-se num estado mais avançado de maturação em que estímulos sociais podem provocar aumentos nos níveis de progestinas. Se for esse o caso, as interacções sociais podem também modular os níveis de androgénios antes da espermiacção (como se terá verificado pelos nossos resultados), o que talvez possa contribuir para uma aceleração desse processo.

Em trabalhos realizados com espécies em que os machos têm fenótipos comportamentais alternativos, como *Lepomis macrochirus* (Kindler *et al.*, 1989), *Chromis dispilus* (Pankhurst & Barnett, 1993), *Hypsypops rubicundus* (Sikkel, 1993), os níveis plasmáticos de esteróides sexuais eram geralmente mais elevados nos machos territoriais durante a fase de postura. Isto sugere que os níveis plasmáticos dos esteróides são elevados nos locais de elevadas densidades por acontecimentos comportamentais que ocorrem durante a fase de postura, que podem incluir incursões territoriais por vizinhos ou por machos não territoriais e o efeito directo de comportamentos sexuais e de visitas pelas fêmeas aos machos vizinhos, o que ocorre com maior frequência nos locais de densidades mais elevadas. Tudo isto está de acordo com a "hipótese do desafio" proposta por Wingfield (1984 *in* Pankhurst & Barnett, 1993) para aves em que os níveis de androgénios e a agressão territorial estariam correlacionados, mas apenas em períodos de maiores interacções sociais, *i.e.* alterações endócrinas moduladas comportamentalmente por sua vez modificariam respostas comportamentais de modo que estas se mantivessem apropriadas às condições sociais que se alterassem. A elevação dos níveis de esteróides poderia resultar da



exposição directa a um maior número de fêmeas ovuladas. Parece que tanto o aumento do número de fêmeas receptivas como o aumento do número de interacções territoriais actuam estimulando a secreção de esteróides nos peixes com ninho (Pankhurst & Barnett, 1993).

Em *O. mossambicus*, os indivíduos com uma posição social hierárquica superior eram também os que tinham níveis urinários de androgénios mais elevados, eram mais eficazes na defesa de territórios e tinham maiores frequências de cortejamento quando interagiam com fêmeas (Oliveira *et al.*, 1996). Estes resultados salientam a importância de estímulos sociais na modulação dos níveis hormonais nesta espécie. O nosso trabalho reforça estes resultados visto que a introdução de uma fêmea provoca alteração dos níveis de androgénios urinários do macho a curto prazo. De acordo com a hipótese do desafio, no sistema de arena, é de esperar que haja modulação dos níveis de esteróides pelos comportamentos, pois as interacções entre os indivíduos são frequentes.

Em ambas as progestinas estudadas, os níveis totais determinados são constituídos essencialmente pelas fracções glucuronizadas. Estes resultados poderão indicar a possível libertação de feromonas pelos machos de *O. mossambicus*, como acontece noutras espécies em que estas hormonas foram identificadas como tal.

Em muitas espécies de teleósteos, as feromonas sexuais libertas pelos machos e/ou fêmeas alteram a fisiologia e comportamento de conspecíficos (revisões por Resink *et al.*, 1987 a; Canário & Scott, 1989 b; Stacey, 1991). Muitas das feromonas identificadas são hormonas ou os seus metabolitos (Stacey *et al.*, 1987; Canário & Scott, 1989 b; Hara, 1993; Wendelaar Bonga, 1993; Jobling, 1995). As hormonas libertas por animais aquáticos, sendo solúveis em água podem informar um potencial receptor sobre a condição reprodutora do emissor (Stacey, 1991). Este facto é de esperar visto que a produção e libertação de hormonas é sincronizada com acontecimentos reprodutivos discretos, tornando estes compostos estímulos químicos apropriados (Stacey *et al.*, 1987). O metabolismo dos esteróides para sulfatos ou glucurónidos leva a um aumento da solubilidade destes compostos na água, aumentando a facilidade com que são excretados (Jobling, 1995). Nos mamíferos, a glucuronização é um mecanismo que facilita a inactivação de excesso de esteróides no sangue e a excreção de esteróides pela sua conversão em produtos mais solúveis (Matty, 1985; Yeung & Chan, 1987; Kime, 1982, 1987, 1993; Scott, 1987). Também foi sugerido que os glucurónidos podem ser formas mais facilmente transportáveis e que as formas activas seriam libertas nos tecidos receptores



pela enzima glucuronidase (Fisherman & Green, 1957 *in* Yeung & Chan, 1987). Há evidências que grande parte dos esteróides glucuronizados e/ou sulfatados são sintetizados directamente nas gónadas de teleósteos, não sendo necessariamente produtos do catabolismo dos esteróides no fígado (Kime, 1982; Fostier *et al.*, 1987; Resink *et al.*, 1987 a,b; Scott & Vermeirssen, 1994; Clarke *et al.*, 1991). A conjugação de esteróides nos testículos parece ser única dos peixes mas o seu significado biológico ainda não é totalmente conhecido (Colombo & Beldevere, 1976). Segundo Kime & Manning (1982), pode acontecer que a secreção testicular de glucurónidos exceda inclusivamente a de esteróides livres.

Clarke *et al.* (1991) referem que a glucuronização de hormonas pode ser importante na sinalização química e na cessação da sua actividade via excreção. Segundo alguns autores a formação de glucurónidos pode ter um papel importante na regulação da temperatura (Kime, 1980, 1982; Kime & Manning, 1982). Sendo mais solúveis em água, a sua utilização para sinalização química parece mais adequada (Scott, 1987). Este autor refere como exemplo o góbio *G. jozo*, em que o macho liberta conjugados de androgénios 5β -reduzidos, que atraem as fêmeas. Colombo *et al.* (1982) sugerem que os androgénios conjugados que são feromonas, representam uma utilização alternativa dos intermediários de androgénios deixados pela diminuição da aromatização e possivelmente 11β -hidroxilação em machos de alguns peixes, que ocorre na finalização da maturação dos gâmetas.

Também não se deve excluir a importância dos conjugados com grupos sulfatos, visto que estes compostos também foram sugeridos como potenciais feromonas para outras espécies (*e.g.* em Pleuronectiformes (*c.f.* Canário, 1991) e para *O. mossambicus* (Oliveira *et al.*, 1996).

Em *O. mossambicus*, a libertação de esteróides conjugados pelo macho, mesmo sendo apenas uma forma de eliminação de esteróides que têm uma função na espermição, sem serem produzidos e excretados como feromonas, poderia facilitar a sinalização das arenas para as fêmeas; havendo um número significativo de machos nas arenas, este efeito seria ampliado.

Foram identificadas várias espécies em que o macho liberta feromonas: no góbio-preto (*Gobius jozo*) as fêmeas localizam os machos que defendem território em resposta a uma feromona sexual (Colombo *et al.*, 1982); os testículos têm uma glândula que sintetiza



conjugados de androgénios 5β -reduzidos. No peixe-zebra (*Brachydanio rerio*) uma feromona liberta pelo macho estimula a ovulação (Chen & Martinich, 1975; Colombo *et al.*, 1982 van den Hurk., *et al.*, 1987a in Stacey *et al.*, 1987; Jobling, 1995). No peixe-gato-africano compostos glucurónidos que atraem as fêmeas (Resink *et al.*, 1987 b; Stacey *et al.*, 1987 ; Jobling, 1995) têm origem na vesícula seminal (Lambert *et al.*, 1987; Schoonen *et al.*, 1987; Resink *et al.*, 1989); noutra estudo, a água dos machos tinha uma feromona *primer* do desenvolvimento do ovário (van Weerd *et al.*, 1991). Resink *et al.*, (1989) referem que a feromona poderá ser um complexo de vários glucurónidos. No arenque-do-pacífico, *Clupea hareungus pallasi*, a presença de $17,20\beta$ -P e alguns dos seus conjugados no esperma parecem actuar como feromonas permitindo a sincronização da maturação e libertação do esperma pelos machos (Jobling, 1995).

As formas conjugadas das progestinas apresentam-se como os melhores candidatos a possíveis feromonas/ sinais químicos, por estarem envolvidas nas fases finais de maturação das gónadas e por terem sido descritas como feromonas noutras espécies.

A $17,20\beta$ -P é a principal hormona indutora da maturação dos oócitos em salmonídeos (Goetz *et al.*, 1987 in Liley & Rouger, 1990), surgindo implicada no controle de comportamentos de postura.

Segundo Scott & Turner (1991), em *O. mykiss* as gónadas transformam grande quantidade de precursor tritiado em $17,20\beta$ -P-sulfato. Estes autores sugerem esta hormona como uma possível feromona. Mayer *et al.* (1994) verificaram que em machos castrados desta espécie, os implantes de $17,20\beta$ -P parecem ser mais eficazes do que os de precursores de 11-KT na estimulação do comportamento de postura dos machos. Scott *et al.* (1992) referem que tanto machos em espermição como fêmeas ovuladas excretam $17,20\beta$ -P-sulfato; há um aumento deste esteróide em machos emparelhados com fêmeas com ninho (Scott *et al.*, 1992). Scott & Liley (1994) detectaram um aumento na taxa de excreção de $17,20\beta$ -P-sulfato (e de testosterona-glucurónido) em machos de truta, quando emparelhados com fêmeas ovuladas. Também no peixe-dourado esta hormona ou os seus metabolitos funcionam como feromonas (Stacey *et al.*, 1987). A $17,20\beta$ -P pode induzir e manter o comportamento reprodutivo na fêmea, e a sua libertação na água pode atrair e excitar a actividade sexual do macho (Dulka *et al.*, 1987; Liley & Rouger, 1990; Yamazaki, 1990; Stacey, 1991; Stacey & Sorensen, 1991; Jobling, 1995). Alguns destes autores



propõem também que os androgénios segregados pelos testículos de machos maduros, aumentam a sensibilidade olfactiva às feromonas na água. Assim, não se exclui a hipótese dos androgénios terem um papel importante na discriminação sexual. Também a síntese de $17,20\beta$ -P testicular provoca um aumento da produção de esperma na altura da ovulação e postura (Sorensen *et al.*, 1987 in Hara, 1993).

Canário & Scott (1987 b) sugerem um possível papel comportamental/feromona da $17,20\alpha$ -P em *L. limanda*, semelhante ao da $17,20\beta$ -P no peixe-dourado. Também no peixe-dourado, ao contrário de trabalhos anteriores, Kime & Scott (1993) referem a produção de $17,20\alpha$ -P na incubação de testículos de machos em espermiacção com um precursor marcado radioactivamente; também se obteve $17,20\alpha$ -P-sulfato e testosterona-glucurónido (Kime & Scott, 1993).

Em *Pleuronectes platessa*, os peixes em espermiacção têm elevados níveis de $17,20\alpha$ -P no plasma e urina. Os espermatozóides desta espécie têm elevada actividade da enzima 20α -HSD, tal como noutras espécies de Pleuronectiformes (ex: nos ovários de *Limanda limanda*, Canário & Scott, 1989 a), de Perciformes e de Cyprinidiformes (Canário, 1992). Este autor sugere a importância da $17,20\alpha$ -P na função espermática. Foi também detectada a influência da $17,20\alpha$ -P na indução da espermiacção em anfíbios (Kobayashi *et al.*, 1993), o que pode indicar uma maior importância desta hormona do que até aqui se considerava, na regulação dos processos reprodutivos de vertebrados. Segundo Canário & Scott (1989 a) não é ainda claro o significado biológico dos esteróides 20α -hidroxilados nos teleósteos. Os resultados de Asahina *et al.*, (1993) sugerem também o papel desta hormona na regulação da espermiacção no peixe-dourado.

Também Oliveira *et al.* (1996) sugerem a $17,20\alpha$ -P sulfato como uma possível feromona liberta pelos machos de *O. mossambicus*. Esta progestina surge também correlacionada positivamente com a taxa de cortejamento.

A função das feromonas sexuais em machos de peixes é menos clara do que no caso das fêmeas. Os machos, tendo maior número de gâmetas disponíveis continuamente, ou por períodos relativamente longos, têm frequentemente a capacidade de acasalarem com maior frequência do que as fêmeas, talvez em competição com outros machos. Além disso, os machos estão mais vezes envolvidos na defesa de territórios ou ninhos, ou nos cuidados



parentais de ovos e juvenis. Devido a estas características, uma coordenação precisa da libertação de feromonas com o estado fisiológico do macho não é necessária e os sinais químicos podem ser mais persistentes (Liley, 1982). Assim, em espécies como *Blennius pavo*, *Hypsoblennius spp.*, anabantídeos e *Ictalurus*, em que os machos defendem potenciais locais de nidificação, as feromonas podem servir apenas para marcar o território e/ou atrair fêmeas para o macho (Liley, 1982). Uma situação semelhante poderia acontecer em *O. mossambicus*.

Há poucos estudos dos mecanismos de excreção dos esteróides e dos seus metabolitos, em contraste com os mamíferos. Uma das vias possíveis de emissão de feromonas é a urina (e.g. 17,20 β -P-sulfato, na truta) (Scott & Vermeirssen, 1994). É também importante saber até que ponto os peixes controlam a libertação da feromona; a bexiga pode actuar como um órgão que concentra e armazena feromonas sexuais (Canário & Scott, 1989 b; Stacey *et al.*, 1987). Estes autores encontraram uma concentração muito superior de esteróides conjugados (incluindo 17,20 β -P) na urina em relação ao plasma de *Pleuronectes platessa*.

As complexas interacções sociais mediadas por feromonas podem influenciar a produção de esperma. Machos estimulam a ovulação/ oviposição nas fêmeas e estas estimulam a espermiacção e a libertação de esperma nos machos. Esta estimulação dual ocorre no peixe-dourado. Este processo é económico: mobilização de esperma quando necessário e dupla função da 17,20 β -P e prostaglandinas envolvidas como “hormonas” na ovulação e feromonas para a estimulação do macho. Em espécies com reduzido IGS (índice gonado-somático), como as tilapias, há alguma economia de esperma que resulta de comportamentos de postura complexos (Billard, 1987 b; Billard *et al.*, 1990); assim, não devemos excluir a hipótese de comunicação química entre os indivíduos.

Na maioria das interacções mediadas quimicamente, não é claro se há comunicação no sentido mais aceite (ver Liley, 1982; Stacey, 1991), ou se um indivíduo simplesmente responde adaptativamente a produtos metabólicos ou de excreção de um conspecifico que inevitavelmente são libertos para o ambiente. Estes produtos podem fornecer informação fortuita aos conspecificos sobre o indivíduo que emite o sinal. A interpretação do significado funcional da maioria das interacções mediadas quimicamente é especulativa. Liley (1982) questiona a necessidade de especialização de estruturas responsáveis pela



síntese e libertação de feromonas nos peixes: já que a maioria dos produtos bioquímicos dos peixes são solúveis em água, há uma gama de produtos que poderiam ser percebidos (Liley, 1982). No entanto, a comunicação química na água, está restrita à transmissão de mensagens simples (que permitem por exemplo a orientação) que não envolvem a passagem de uma mensagem para outra, ou a modulação do sinal. Talvez devido a estas limitações tenha havido uma pressão selectiva fraca que favorecesse o desenvolvimento de sinais químicos especializados e órgão secretores associados (Liley, 1982). Este autor especula que estes factores terão contribuído para a natureza pouco ritualizada dos sistemas de comunicação química nos peixes, o que teria permitido aos peixes serem particularmente oportunistas na incorporação do uso de estímulos químicos fortuitos nos seus repertórios de comunicação.

Kime *et al.* (1991) salientam a grande variedade de hormonas produzidas pelos teleósteos, não se podendo assumir os esteróides medidos como os mais importantes qualitativa e quantitativamente. Estes problemas apenas podem ser resolvidos com incubações com percursos marcados radioactivamente (Kime *et al.*, 1991).

Cada vez mais estudos salientam a importância de outros esteróides, como androgénios reduzidos na posição 3 ou 5, na fisiologia da reprodução de algumas espécies (Kime 1993). Este autor chama a atenção para a grande variedade de vias biossintéticas de esteróides nos teleósteos: as medições apenas dos esteróides "clássicos" dos teleósteos podem fornecer um quadro errado da acção fisiológica e comportamental. Kime & Hyder (1983) referem em *O. mossambicus* níveis elevados de androgénios 5 β -reduzidos não conjugados e níveis de 11 β -hidroxitesterona idênticos aos de 11-KT. Kime (1982) detectou também a presença de glucurónidos 5 β -diol.

Vários trabalhos indicam que a estimulação hormonal do comportamento reprodutivo dos machos de teleósteos, para além de ser diferente dos outros tetrápodes, é consideravelmente diferente entre espécies (Mayer *et al.*, 1994). A grande diversidade filogenética limita grandemente a nossa capacidade de retirar conclusões gerais baseadas em resultados experimentais obtidos a partir de poucas espécies. A maioria dos estudos incidem em espécies de salmonídeos e no peixe-dourado, que pertencem a ordens afastadas dos perciformes (Villars, 1983). No entanto, também permitem alguma comparação entre observações. À semelhança do que acontece em muitas espécies de vertebrados, em *O.*



mossambicus os estímulos sociais têm importância na regulação dos níveis de esteróides, que por sua vez regulam os comportamentos, aumentando a eficácia das interações que se verificam frequentemente num sistema de arena.

Há que ter cuidado na interpretação dos resultados; tratam-se de níveis urinários e não plasmáticos. Seriam úteis estudos sobre a dinâmica de excreção dos esteróides, no sentido de se determinar se variações nas concentrações urinárias se devem a variações da produção testicular ou a alteração das taxas de excreção.

Na truta *S. trutta*, a pele tem receptores específicos para a T (Pottinger, 1987). A concentração de receptores no mesmo tecido-alvo pode variar temporalmente (Pottinger, 1988). Além disso, existe um sistema de ligação-esteróides no plasma de muitas espécies que pode ser importante na alteração dos níveis de hormonas livres e assim a concentração de hormona disponível para os tecidos alvos (Moll & Rosenfield, 1986 *in* Pottinger, 1988). Segundo este autor, a ligação plasmática esteróide-proteína de ligação pode ser um importante factor modulador da actividade das hormonas. Assim, os processos fisiológicos que são influenciados por hormonas podem estar sujeitos a um controle mais subtil do que simplesmente pelas flutuações nos níveis plasmáticos das hormonas (Pottinger, 1988).

A manutenção de populações mistas de tilapias rapidamente provoca sobrepopulação, devido à rápida maturação das fêmeas e à eficácia dos cuidados parentais (Bardach & Magnuson, 1980). Há tendência para se reproduzirem mais cedo, com a dimensão do corpo demasiado reduzida para ser comercializada (Torrans *et al.*, 1988; Baroiller & Jalabert, 1989). O tratamento com hormonas é um método de obtenção de populações só de machos, em que o crescimento é mais rápido (Bardach & Magnuson, 1980). Vários trabalhos têm sido realizados sobre a eficácia da administração de esteróides nesta espécie (*e.g.* Bardach & Magnuson, 1980; Hunter & Donaldson, 1983; Torrans *et al.*, 1988; Basavaraja *et al.*, 1990; Pandian & Varadaraj, 1990; Varadaraj *et al.*, 1994). No entanto, a investigação nesta área, sobre os efeitos comportamentais de tratamentos com esteróides é ainda insuficiente; segundo Liley (1980) muitas vezes a reversão comportamental não é completa, podendo haver problemas. Assim, são necessários mais trabalhos que permitam um melhor conhecimento dos processos de regulação de comportamentos associados à reprodução. São necessários estudos mais completos para a



confirmação da hipótese de libertação de feromonas pelo macho de *O. mossambicus*. É importante que se façam estudos sobre os limiares de detecção de esteróides pelos receptores (Scott *et al.*, 1994). Assim, deveria testar-se a reacção olfactiva/gustativa e comportamental das fêmeas de *O. mossambicus* a estes compostos; a comparação entre os níveis plasmáticos e urinários também seria útil.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No sistema social de arena são frequentes os contactos entre machos e entre machos e fêmeas. Nestes locais de elevadas densidades populacionais, a capacidade de reconhecimento e resposta imediata a estímulos sociais é importante para o sucesso das interacções entre os indivíduos. Os estímulos visuais são importantes na modulação de comportamentos dos machos de *O. mossambicus*, mas outros estímulos também têm influência; são necessários mais estudos sobre a importância de sinais químicos emitidos pelas fêmeas.

Para aumentar a capacidade de resposta do macho a novos estímulos, os níveis urinários de androgénios são modulados também por estímulos emitidos pelas fêmeas; esta regulação permite ajustar os níveis hormonais que surgem associados por sua vez (principalmente a 11-KT) à regulação das respostas comportamentais adequadas. A mesma hormona poderá activar respostas comportamentais diferentes na presença de estímulos sociais diferentes. São necessários mais trabalhos para um conhecimento adequado de quais os esteróides envolvidos na regulação de comportamentos sexuais e agonísticos dos machos de *O. mossambicus*.

Embora não tenha havido variação dos níveis de progestinas, não se exclui a influência das mesmas na regulação de comportamentos; trabalhos futuros poderão testar a importância destas hormonas ou dos seus conjugados como possíveis sinalizadores das arenas reprodutoras para as fêmeas.



5. BIBLIOGRAFIA

- Altmann, J.A. (1974): Observational study of behavior: sampling methods. *Behaviour*. **49**: 227-267.
- Aronson, L.R. (1957): Reproductive and parental behavior. In: *The physiology of fishes. Vol.2*. Brown (Ed.). Acad. Press, New York: pp 271-304.
- Aronson, L.R; M. Holz-Tucker (1947): Morphological effects of castration and treatment with gonadal hormones on the female cichlid fish, *Tilapia macrocephala*. *Anat. Rec.* **47**: 572-573.
- Aronson, L.R.; A. Scharf; D. Silverman (1960): Reproductive behavior after gonadectomy in males of the cichlid fish, *Aquidens latifrons*. *Anat. Rec.*, **137**: 335.
- Asahina, K.; K. Aida; T. Higashi (1993): Biosynthesis of 17α , 20α -dihydroxy-4-pregnen-3-one from 17α -hydroxyprogesterone by Goldfish (*Carassius auratus*) Spermatozoa. *Zoological Science*. **10**: 381-383.
- Bardach, J.E. & Magnuson, J.J. (1980): Introduction and perspectives. In: *Fish behavior and its use in the capture and culture of fishes*. ICLARM Conference Proceedings 5. J. Bardach, J.J. Magnuson, R.C. May, J.M. Reinhart (Eds). pp:1-31.
- Baroiller, J.-F. & B. Jalabert (1989): Contribution of research in reproductive physiology to the culture of tilapias. *Aquat. Living Resour.* **2**: 105-116.
- Barry, T.; K. Aida; I. Hanyu.(1989): Effects of 17α , 20β -dihydroxy-4-pregnen-3-one on the in vitro production of 11-ketotestosterone by testicular fragments of the common carp, *Cyprinus carpio*. *The Journal of Experimental Zoology*. **251**, 117-120.
- Barry, T.; A.J.G. Santos; K. Furukawa; K. Aida; I. Hanyu (1990): Steroid profiles during spawning in male common carp. *Gen. Comp. Endocrinol.* **80**: 223-231.
- Basavaraja, N.; M.C. Nandeeshha; T.J. Varghese; P. Keshavanath; G.K. Srikanth (1990): Induction of sex reversal in *Oreochromis mossambicus* by diethylstilbestrol. *J. Appl. Ichthyol.* **6**: 46-50.
- Billard, R. (1982): Reproductive physiology and fish culture. *Proc. of the International Symposium on Reproductive Physiology of fish*. Wageningen, the Netherlands. pp 1-2.
- Billard, R. (1986): Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species. *Reprod. Nutr. Dévelop.* **26** (4): 877-920.
- Billard, R. (1987 a): Fish reproductive physiology, fish culture and fisheries: concluding remarks. *Proceedings of the IIIrd International Symposium on Reproductive Physiology of Fish, St. Johns, Newfoundland, Canada, August 1987*. In D.R. Idler; L.W. Crim; J.M. Walsh (Eds). Marine Sciences Research Laboratory, St. John's, Newfoundland, Canada. pp: 316-318.
- Billard, R. (1987 b): Testis growth and spermatogenesis in teleost fish: the problem of the large interspecies variability in testis size. *Proceedings of the IIIrd International Symposium on Reproductive Physiology of Fish, St. Johns, Newfoundland, Canada, August 1987*. In D.R. Idler; L.W. Crim; J.M. Walsh (Eds). Marine Sciences Research Laboratory, St. John's, Newfoundland, Canada. pp: 183-186.
- Billard, R.; C. Bry; C. Gillet (1981): Stress, environment and reproduction in teleost fish. In: *Stress and fish*. A.D. Pickering (Ed). Academic Press, London. pp: 185-208.
- Billard, R.; A. Fostier; C. Weil; B. Breton (1982): Endocrine control of spermatogenesis in teleost fish. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **39**: 65-79.
- Billard, R.; F. Le Gac; M. Loir (1990): Hormonal control of sperm production in teleost fish. In : *Progress in Comparative Endocrinology* . A. Eppele, C. Scanes, M. Stetson (Eds). Wiley-Liss, Inc. pp: 620-626.
- Blüm, V.;K. Fiedler (1965): Hormonal control of reproductive behavior in some cichlid fishes. *Gen. Comp. Endocrinol.* **5**: 186-196.



- Borg, B.; W.G.E.J. Schoonen; J.G.D. Lambert (1989): Steroid metabolism in the testes of the breeding and nonbreeding three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **73**: 40-45.
- Brutton, M.N. & R.E. Bolt (1975): Aspects of the biology of *Tilapia mossambica* Peters (Pisces: Cichlidae) in a natural freshwater lake (Lake Sibaya, South Africa). *J. Fish. Biol.* **7**: 423-445.
- Callard, G.V. (1982): Aromatase in the teleost brain and pituitary: role in hormone action. In *Proceedings of the International Symposium on Reproductive Physiology of Fish*. Wageningen, The Netherlands, 2-6 August 1982. C.J.J. Ritcher & H.J.T. Goos (Eds.). Pudoc, Wageningen. pp: 40-43.
- Callard, G.V.; Z. Petro, K. Ryan (1978): Conversion of androgen to estrogen and other steroids in the vertebrate brain. *Am. Zool.* **18** : 511-523.
- Callard, G.V.; Z. Petro; K.J. Ryan; J.B. Clairborne (1981): Estrogen synthesis in *in vitro* and *in vivo* in the brain of a marine teleost (*Myoxocephalus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **43**: 243-255.
- Canário, A.V.M. (1991): Sex steroids in marine flatfish. In *Proceedings of the Fourth International symposium on the reproductive physiology of fish, Univ. east anglia, Norwich, U.K., 7-12 July 1991* A.P. Scott, J.P. Stumper, D.E. Kime, M.S. Rolfe (Eds.). FishSymp 91 Norwich, U.K. pp: 71-73
- Canário, A.V.M. (1992): $17\alpha, 20\alpha$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one, a male sex hormone? *2nd International Symposium on Fish Endocrinology Abstracts*. p.81.
- Canário, A.V.M.; A.P. Scott (1987a): $17\alpha, 20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one: the oocyte maturation-inducing steroid in dab, *Limanda limanda*. *Proceedings of the IIIrd International Symposium on Reproductive Physiology of Fish, St. Johns, Newfoundland, Canada, August 1987*. In D.R. Idler; L.W. Crim; J.M. Walsh (Eds). Marine Sciences Research Laboratory, St. John's, Newfoundland, Canada. pp: 250.
- Canário, A.V.M.; A.P. Scott (1987b): Synthesis of $17\alpha, 20\alpha$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one by teleost ovaries. *Proceedings of the IIIrd International Symposium on Reproductive Physiology of Fish, St. Johns, Newfoundland, Canada, August 1987*. In D.R. Idler; L.W. Crim; J.M. Walsh (Eds). Marine Sciences Research Laboratory, St. John's, Newfoundland, Canada. pp: 251.
- Canário, A.V.M.; A.P. Scott (1989a): Synthesis of 20α -hydroxylated steroids by ovaries of the dab (*Limanda limanda*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **76**: 147-158.
- Canário, A.V.M.; A.P. Scott (1989b): Conjugates of ovarian steroids, including $17\alpha, 20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one (maturation-inducing steroid) accumulate in the urine of a marine teleost (plaice; *Pleuronectes platessa*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **123**: R1-R4.
- Canário, A.V.M.; A.P. Scott (1989 c): Radioimmunoassay investigations of 20β -hydroxylated steroids in maturing/ovulating female rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **74**, 77-84.
- Chen, L-C. & R. Martinich (1975): Pheromonal stimulation and metabolite inhibition of ovulation in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Fish. Bull.* **73** (4): 889-894.
- Clarke, D.J.; S.G. George; B. Burchell (1991): Glucuronidation in fish. *Aquat. Toxicol.* **20**: 35-56.
- Colombo, L.; P. Belvedere (1976): Endocrine aspects of reproduction in teleost fishes. *Archo Oceanogr. Limnol.* **18 suppl. 3**: 273-293.
- Colombo, L.; P. Belvedere; A. Marconato; F. Bentivegna (1982): Pheromones in teleost fish. In *Proceedings of the International Symposium on Reproductive Physiology of Fish*. C.J.J. Ritcher & H.J.T. Goos (Eds.). Wageningen, The Netherlands, 2-6 August 1982. Pudoc, Wageningen. pp: 84-94.
- Davis, R.E.; J.I. Morrell; D.W. Pfaff. (1977): Autoradiographic localization of sex steroid-concentrating cells in the brain of the teleost *Macropodus opercularis* (Osteichthyes: Belontiidae). *Gen. Comp. Endocrinol.* **33**: 496-505.
- De Leeuw, R.; H.J.T.H. Goos; P.G.W.J. Van Oordt (1987): The regulation of gonadotropin release by neurohormones and gonadal steroids in the african catfish, *Clarias gariepinus*. *Aquaculture.* **63**: 43-58.
- Demski, L.S. & P.J. Hornby (1982): Hormonal control of fish reproductive behavior: brain-gonadal steroid interactions. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **39**: 36-47.



- Dulka, J.G.; N.E. Stacey; P.W. Sorensen; G.J. Van Der Kraak (1987): A steroid sex pheromone synchronizes male-female spawning readiness in goldfish. *Nature*. **325**: 251-253.
- Erickson, C.J. (1985): Mrs. Harvey's parrot and some problems of socioendocrine response. In *Perspectives in ethology. Vol.6: Mechanisms*. Plenum Press. P. Bateson; P. Klopfer (Eds). New York and London.pp:261-285.
- Fostier, A.; F. Le Gac; M. Loir (1987): Steroids in male reproduction. *Proceedings of the IIIrd International Symposium on Reproductive Physiology of Fish, St. Johns, Newfoundland, Canada, August 1987*. In D.R. Idler; L.W. Crim; J.M. Walsh (Eds). Marine Sciences Research Laboratory, St. John's, Newfoundland, Canada. pp: 239-245.
- Fryer, G. & T.D. Iles (1972): *The cichlid fishes of the great lakes of Africa*. Their biology and evolution. Oliver & Boyd. Edinburgh.pp: 173-205.
- Fujii, R. (1993): Coloration and chromatophores. In: *The physiology of fishes*. D. Evans (Ed.). Marine Science Series. pp:535-560.
- Godwin, J.R.; P. Thomas (1993): Sex change and steroid profiles in the protandrous anemonefish *Amphiprion melanopus* (Pomacentridae, Teleostei). *Gen. Comp. Endocrinol.* **91**: 144-157.
- Goodenough, J.; B. McGuire; R. Wallace (1993): *Perspectives on animal behavior*. John Wiley & Sons Inc. New York. pp: 189-240.
- Hara, T. J. (1993): Chemoreception. In: *The physiology of fishes*. D. Evans (Ed.). Marine Science Series. pp:191-218.
- Harding, C.F. & B. K. Follett (1979): Hormone changes triggered by aggression in a natural population of blackbirds. *Science*. **203**(2): 918-920.
- Hinde, R. (1970): *Animal behaviour. A synthesis of ethology and comparative psychology*. 2nd Ed. McGraw-Hill Book Comp. pp: 228-256.
- Honda, H. (1980): Female sex pheromone of rainbow trout, *Salmo gairdneri*, involved in courtship behaviour. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* **46** (9): 1109-1112.
- Hourigan, T.F.; M. Nakamura; Y. Nagahama; K. Yamauchi; E.G. Grau (1991): Histology, ultrastructure, and in vitro steroidogenesis of the testes of two male phenotypes of the protogynous fish, *Thalassoma duperrey* (Labridae). *Gen. Comp. Endocrinol.* **83**: 193-217.
- Hunter, G.A.; E.M. Donaldson (1983): Hormonal sex control and its application to fish culture. In: Hoar, Randall, Donaldson (Eds.). *Fish physiology. Vol. IX part B (Behavior and fertility control)*. Academic Press. pp: 223-291.
- Huntingford, F.A. & A. K. Turner (1987): *Animal conflict*. Chapman & Hall, London, New York. pp: 59-128.
- Hutchison, J.B. (1991): How does the environment influence the behavioural action of hormones? In *The development and integration of behaviour*. P. Bateson (Ed.). Cambridge univ. Press. Cambridge. pp: 149-169.
- Hutchison, J.B. (1993): Aromatase: neuromodulator in the control of behavior. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* **44** (4-6): 509-520.
- Hutchison, J.B. & R.E. Hutchison (1983): Hormonal mechanisms of mate choice in birds. In: *Mate choice*. P. Bateson (Ed.). Cambridge univ. Press. pp: 389-405.
- Idler, D.R.; D.A. Horne; G.B. Sangalang (1971): Identification and quantification of the major androgens in testicular and peripheral plasma of atlantic salmon (*Salmo salar*) during sexual maturation. *Gen. Comp. Endocrinol.* **16**: 257-267.
- Idler, D.R.; R. Reinboth; J.M. Walsh; B. Truscott (1976): A comparison of 11-hydroxytestosterone and 11-ketotestosterone in blood of ambisexual and gonochoristic teleosts. *Gen. Comp. Endocrinol.* **30**: 517-521.
- Jobling, M. (1995): *Environmental biology of fishes*. Chapman & Hall. Fish and fisheries Series 16. 455 pp.
- Kah, O. (1986): Central regulation of reproduction in teleosts. *Fish Physiol. Biochem.* **2** (1-4): 25-34.



- Kah, O.; I. Anglade; E. Leprêtre; P. Dubourg; D. Monbrison (1993): The reproductive brain in fish. *Fish Physiol. Biochem.* **11** (1-6): 85-97.
- Kime, D.E. (1980): Androgen biosynthesis by the testes of the goldfish *Carassius auratus* *in Vitro*: the effect of temperature on the formation of steroid glucuronides. *Gen. Comp. Endocrinol.* **41**: 164-172.
- Kime, D.E. (1982): The control of gonadal androgen biosynthesis in fish. In *Proceedings of the International Symposium on Reproductive Physiology of Fish*. Wageningen, The Netherlands, 2-6 August 1982. C.J.J. Ritcher & H.J.T. Goos (Eds.). Pudoc, Wageningen. pp:95-98.
- Kime, D.E. (1987): The steroids. In: *Fundamentals of comparative vertebrate endocrinology*. I. Chester-Jones, P.M. Ingleton, J.G. Philips (Eds). Plenum Press, New York. pp: 3-56.
- Kime, D.E. (1993): "Classical" and "non-classical" reproductive steroids in fish. *Rev. Fish Biol. Fish.* **3**: 160-180.
- Kime, D.E. & M. Hyder (1983): The effect of temperature and gonadotropin on testicular steroidogenesis in *Sarotherodon (Tilapia) mossambicus* *in Vitro*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **50**: 105-115.
- Kime, D.E. & N.J. Manning (1982): Seasonal patterns of free and conjugated androgens in the brown trout *Salmo trutta*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **48**: 222-231.
- Kime, D.E & A.P. Scott (1993): *In vitro* synthesis of 20 α -reduced and of 11- and 21- oxygenated steroids and their sulfates by testes of the goldfish (*Carassius auratus*): testicular synthesis of corticosteroids. *Fish Physiol. Biochem.* **11** (1-6): 287-292.
- Kime, D.E.; K.P. Lone; A. Al-Mazouk (1991): Seasonal changes in serum steroid hormones in a protandrous teleost, the sobaity (*Sparidentex hasta* Valenciennes). *J. Fish Biol.* **39**: 745-753.
- Kindler, P.M.; D.P. Philipp; M.R. Gross; J.M. Bahr (1989): Serum 11-ketotestosterone and testosterone concentrations associated with reproduction in male bluegill (*Lepomis macrochirus*: Centrarchidae). *Gen. Comp. Endocrinol.* **75**: 446-453.
- Kobayashi, T.; N. Sakai; S. Adachi, K. Asahina, H. Iwasawa, Y. Nagahama (1993): 17 α ,20 α -dihydroxy-4-pregnen-3-one is the naturally occurring spermiation-inducing hormone in the testis of a frog, *Rana nigromaculata*. *Endocrinology.* **133** (1): 321-327.
- Lam, T.J.; A.D. Munro (1987): Environmental control of reproduction in teleosts: an overview. In *Proceedings of the IIIrd International Symposium on Reproductive Physiology of Fish, St. Johns, Newfoundland, Canada, August 1987*. D.R. Idler; L.W. Crim; J.M. Walsh (Eds). Marine Sciences Research Laboratory, St. John's, Newfoundland, Canada. pp: 279-288.
- Lambert, J.G.D.; W.G.E.J. Schoonen; P.G.W.J. Van Oordt (1987): Steroid glucuronides in the vesicle of the african catfish In *Proceedings of the IIIrd International Symposium on Reproductive Physiology of Fish, St. Johns, Newfoundland, Canada, August 1987*. D.R. Idler; L.W. Crim; J.M. Walsh (Eds). Marine Sciences Research Laboratory, St. John's, Newfoundland, Canada. pp: 162.
- Leitz, T.; R. Reinboth (1985): *In vitro* bioconversion of [¹⁴C] Androstenedione by testes of the siamese fighting fish *Betta splendens* Regan (Anabantoidae, Belontiidae). *Gen. Comp. Endocrinol.* **58**: 471-477.
- Levy, M.; L.R. Aronson (1955): Morphological effects of castration and hormone administration in the male cichlid fish, *Tilapia macrocephala*. *Anat. Rec.* **122**: 450-451.
- Liley, N.R. (1969): Hormones and reproductive behavior in fishes. In Hoar & Randall (Eds.). *Fish Physiology*. Vol. III. Acad. Press. 73-116.
- Liley, N.R. (1980): Patterns of hormonal control in the reproductive behavior of fish, and their relevance to fish management and culture programs. In: *Fish behavior and its use in the capture and culture of fishes*. J. Bardach, J.J. Magnuson, R.C. May, J.M. Reinhart (Eds). ICLARM Conference Proceedings 5. pp:210-245.
- Liley, N.R. (1982): Chemical communication in fish. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **39**: 22-35.
- Liley, N.R.; J.R. Cardwell; Y. Rouger (1987): Current status of hormones and sexual behavior in fish. In *Proceedings of the IIIrd International Symposium on Reproductive Physiology of Fish, St. Johns, Newfoundland, Canada, August 1987*. D.R. Idler; L.W. Crim; J.M. Walsh (Eds). Marine Sciences Research Laboratory, St. John's, Newfoundland, Canada. pp: 174-148.



- Liley, N.R. & Rouger, Y. (1990): Plasma levels of gonadotropin and 17α , 20β -dihydroxy-4-pregnen-3-one in relation to spawning behaviour of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish Biol.* **37**: 699-711.
- Liley, N.R.; N.E. Stacey (1983): Hormones, pheromones, and reproductive behavior in fish. In : *Fish Physiology. Vol. LX - Reproduction. Part. B - Behavior & fertility control..* W.S. Hoar, D.J. Randall, E.M. Donaldson (Ed). Acad. Press. 1-63.
- Lovari, S; R.E. Hutchison; J.B. Hutchison (1994): Sexual assessment in the male dove: behavioural and physiological effects of choice without interaction. *Anim. Behav.* **47**: 109-116.
- Matty, A.J. (1985): *Fish. Endocrinology*. Croom Helm ed., 138-173.
- Mayer, I.; B. Borg; R. Schulz (1990a): Conversion of 11-ketoandrostenedione to 11-ketotestosterone by blood cells of six fish species. *Gen. Comp. Endocrinol.* **77**: 70-74.
- Mayer, I.; B. Borg; R. Schulz (1990b): Seasonal changes in and effect of castration/ androgen replacement on the plasma levels of five androgens in the male three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus* L. *Gen. Comp. Endocrinol.* **79**: 23-30.
- Mayer, I.; N.R. Liley; B. Borg (1994): Stimulation of spawning behavior in castrated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by 17α , 20β -dihydroxy-4-pregnen-3-one, but not by 11-ketoandrostenedione. *Horm. Behav.* **28**: 181-190.
- Mol, K.; N. Byamungu; B. Cuisset; Z. Yaron; M. Ofir; Ch. Mélard; M. Castelli; E.R. Kühn (1994): Hormonal profile of growing male and female diploids of the blue tilapia, *Oreochromis aureus*, reared in intensive culture. *Fish Physiol. Biochem.* **13** (3): 209-218.
- Moore, F.L. (1987): Regulation of reproductive behaviors. In: *Hormones and reproduction in fishes, amphibians and reptiles*. Norris, D.; R. Jones (Eds). Plenum Press. New York and London. 461-504.
- Myrberg, Jr., A.A. (1980): Sensory mediation of social recognition processes in fishes. In: *Fish behavior and its use in the capture and culture of fishes*. J. Bardach, J.J. Magnuson, R.C. May, J.M. Reinhart (Eds). ICLARM Conference Proceedings 5. pp:146-178.
- Neil, E.H. (1964): An analysis of color changes and social behavior of *Tilapia mossambica*. Univ. California Publ. in Zoology. **75** (1): 1-58.
- Oliveira, R.F.; V.C. Almada; A. Canário (1996): Social modulation of sex steroid concentrations in the urine of male cichlid fish *Oreochromis mossambicus*. *Horm. Behav. in press*.
- Pandian, T.J. & K. Varadaraj (1990): Techniques to produce 100% male Tilapia. *Naga*. **13** (3): 3-5.
- Pankhurst, N.W. & C.W. Barnett (1993): Relationship of population density, territorial interaction and plasma levels of gonadal steroids in spawning male demoiselles *Chromis dispilus* (Pisces: Pomacentridae). *Gen. Comp. Endocrinol.* **90**: 168-176.
- Pasmanik, M.; G.V. Callard (1985): Aromatase and 5α -reductase in the teleost brain, spinal cord, and pituitary gland. *Gen. Comp. Endocrinol.* **60**: 244-251.
- Pasmanik, M.; B. A. Schlinger; G.V. Callard (1988): *In vivo* steroid regulation of aromatase and 5α -reductase in goldfish brain and pituitary. *Gen. Comp. Endocrinol.* **71**: 175-182.
- Peter, R. E. (1982): Neuroendocrine control of reproduction in Teleosts. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **39**: 48-55.
- Pinheiro, M. (1980): Observações etológicas em *Sarotherodon mossambicus* (Peters) (Pisces, Cichlidae). *Sep. Garcia de Orta, Sér. Zool.* **9** (1-2): 13-50.
- Pottinger, T.G. (1987): Androgen binding in the skin of mature male brown trout, *Salmo trutta* L. *Gen. Comp. Endocrinol.* **66**: 224-232.
- Pottinger, T.G. (1988): Seasonal variation in specific plasma- and target-tissue binding of androgens, relative to plasma steroid levels, in the brown trout, *Salmo trutta* L. *Gen. Comp. Endocrinol.* **70**: 334-344.
- Rastogi, R.K.; G. Chieffi (1975): The effects of antiandrogens and antiestrogens in nonmammalian Vertebrates. *Gen. Comp. Endocrinol.* **26**: 79-91.



- Redding, J.M. & R. Patiño (1993): Reproductive physiology. *In The physiology of fishes*. D. Evans (Ed.). Marine Science Series. 503-533.
- Reinboth, R. (1980): Behavioral aspects of sex inversion in certain fishes. *In: Fish behavior and its use in the capture and culture of fishes*. J. Bardach, J.J. Magnuson, R.C. May, J.M. Reinhart (Eds). ICLARM Conference Proceedings 5. pp:271-286.
- Resink, J.W.; W.G.E.J. Schoonen; R. Van Den Hurk; W.J.A.R. Viveen; J.G.D. Lambert (1987a): Seasonal changes in steroid metabolism in the male reproductive organ-system of the african catfish, *Claria gariepinus*. *Aquaculture*. 63: 59-76.
- Resink, J.W.; R. Van den Hurk, R.C. Peters; P.G.W.J. Van Oordt (1987b): Steroid glucuronides as sex attracting pheromones in the african catfish, *Claria gariepinus*. *In Proceedings of the IIIrd International Symposium on Reproductive Physiology of Fish, St. Johns, Newfoundland, Canada, August 1987*. D.R. Idler; L.W. Crim; J.M. Walsh (Eds). Marine Sciences Research Laboratory, St. John's, Newfoundland, Canada. pp: 163
- Resink, J.W.; W.G.E.J. Schoonen; P.C.H. Albers; D.M. Filé; C.D. Notenboom; R. Van Den Hurk; P.G.W.J. Van Oordt (1989): The chemical nature of sex attracting pheromones from the seminal vesicle of the african catfish, *Clarias gariepinus*. *Aquaculture*. 83: 137-151.
- Rouse, E.; C. J. Coppenger; P. R. Barnes (1977): The effect of an androgen inhibitor on behavior and testicular morphology in the stickleback *Gasterosteus aculeatus*. *Horm. Behav.* 8: 8-18.
- Saad, A.; J. Dépêche (1987): In vitro effect of salmon gonadotropin on the testicular synthesis of androgens and of a progestin, 17α -hydroxy- 20β -dihydroxiprogesterone, in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Reprod. Nutr. Dévelop.* 27 (2A): 423-439.
- Sachs, B.D.; R.L. Meisel (1988): The physiology of male sexual behavior. *In: The physiology of reproduction*. E. Knobil; J. Neill *et al.*(eds.). Raven Press, Ltd., New York. pp: 1393-1485.
- Sakai, N.; H. Ueda; N. Suzuki; Y. Nagahama (1989): Steroid production by amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*) testes at different developmental stages. *Gen. Comp. Endocrinol.* 75, 231-240.
- Schoonen, W.G.E.J.; J.C.M. Granneman; J.G.D. Lambert; P.G.W.J. Van Oordt (1987): Steroidogenesis in the testes and seminal vesicles of spawning and non-spawning african catfish, *Clarias gariepinus*. *Aquaculture*. 63: 77-88.
- Schreibman, M.; S. Holtzman; L. Cepriano (1990): The life cycle of the brain-pituitary-gonad-axis in teleosts. *In Progress in Comparative Endocrinology* (Epple, A.; Scanes, C.G., Stetson, M. Eds). pp: 399-408.
- Scott, A.P. (1987): Reproductive endocrinology of fish. *In: Fundamentals of comparative vertebrate endocrinology*. I Chester Jones; P.M. Ingleton; G.Philips. Plenum Press. New York. pp: 223-256.
- Scott, A.P.; S.M. Baynes (1982): Plasma levels of sex steroids in relation to ovulation and spermiation in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *In Proceedings of the International Symposium on Reproductive Physiology of Fish*. Wageningen, The Netherlands, 2-6 August 1982. C.J.J. Ritcher & H.J.T. Goos (Eds.). Pudoc, Wageningen. pp:103-106.
- Scott, A. P. & N.R. Liley (1994): Dynamics of excretion of $17\alpha,20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one 20-sulphate, and of the glucuronides of testosterone and 17β -oestradiol, by urine of reproductively mature male and female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Fish Biol.* 44: 117-129.
- Scott, A. P.; N.R. Liley; E.L.M. Vermeirssen (1994): Urine of reproductively mature female rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), contains a priming pheromone wich enhances plasma levels of sex steroids and gonadotropin II in males. *J. Fish Biol.* 44: 131-147.
- Scott, A.P.; P.A. Sorensen; N.R. Liley; A. Moore (1992): 20-sulfated sex steroids: their synthesis, release and potential role as reproductive pheromones. *In The 2nd. International symposium on fish endocrinology (Abstracts), 1-4 June Palais du Grand large, Saint-Malo, france*. P84.
- Scott, A.P.; R.J. Turner (1991): $17\alpha,20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one 20-sulphate: a major metabolite of the oocyte maturation-inducing steroid in plaice (*Pleuronectes platessa*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *In Proceedings of the Fourth International symposium on the reproductive physiology of fish, Univ. east anglia, Norwich, U.K., 7-12 July 1991* A.P. Scott, J.P. Stumper, D.E. Kime, M.S. Rolfe (Eds.). FishSymp 9|Norwich, U.K. pp:



- Scott, A.P. & E.L.M. Vermeirssen (1994): Production of conjugated steroids by teleost gonads and their role as pheromones. *Persp. Comp. Endocrinol.*: 645-654.
- Siegel, S. & N.J. Castellan, Jr. (1988): *Nonparametric statistics for the behavioral sciences*. 2nd ed. McGraw-Hill Int. Ed. 399 pp.
- Sikkel, P. (1993): Changes in plasma androgen levels associated with changes in male reproductive behavior in a brood cycling marine fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* **89**: 229-237.
- Silverman, H.I. (1978 a): Changes in male courting frequency in pairs of the cichlid fish, *Sarotherodon (Tilapia) mossambicus*, with unlimited or with only visual contact. *Behav. Biol.* **23**: 189-196.
- Silverman, H.I. (1978 b): Effects of different levels of sensory contact upon reproductive activity of adult male and female, *Sarotherodon (Tilapia) mossambicus* (Peters); Pisces: Cichlidae. *Anim. Behav.* **26**: 1081-1090.
- Stacey, N.E. (1983): Hormones and reproductive behaviour in teleosts. In: *Control processes in fish physiology*. (Rankin, J.C.; T.J. Pitcher; R. Duggan Eds.). Croom Helm, London & Canberra. 117-129.
- Stacey, N.E. (1991): Hormonal pheromones in fish: status and prospects. In *Proceedings of the Fourth International symposium on the reproductive physiology of fish, Univ. east anglia, Norwich, U.K., 7-12 July 1991* A.P. Scott, J.P. Stumper, D.E. Kime, M.S. Rolfe (Eds.). FishSymp 91 Norwich, U.K. pp: 177-181.
- Stacey, N.E. & P.W. Sorensen (1991): *Hormonal pheromones: recent developments and potential for aquaculture*. 13th Conference European Soc. Comp. Physiol. Biochem. Antibes. 169.
- Stacey, N.E.; P.W. Sorensen; J.G. Dulka; G.J. Van Der Kraak; T.J. Hara (1987): Teleost sex pheromones: recent studies on identity and function. In *Proceedings of the IIIrd International Symposium on Reproductive Physiology of Fish, St. Johns, Newfoundland, Canada, August 1987*. D.R. Idler; L.W. Crim; J.M. Walsh (Eds). Marine Sciences Research Laboratory, St. John's, Newfoundland, Canada. pp: 150-153.
- Torrans, L; F. Meriwether; F. Lowell; B. Wyatt; P. Gwinup (1988): Sex-reversal of *Oreochromis aureus* by immersion in mibolerone, a synthetic steroid. *J. World Aquacult. Soc.* **19** (3): 97-102.
- Trewavas, E. (1983): *Tilapiine fishes of the genera Sarotherodon, Oreochromis and Danakilia*. Trustees of the British Museum (Natural History). 583 pp.
- Ueda, H.; G. Young, L. W. Crim, A. Kambegawa; Y. Nagahama (1983): $17\alpha, 20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one: plasma levels during sexual maturation and in vitro production by the testes of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **51**: 106-112.
- van Weerd, J.H.; A.B.J. Bongers; R. Schulz; M. Sukkel; C.J.J. Richter (1991): Plasma androgen levels in castrated adult male African catfish, *Clarias gariepinus*, in relation to pheromonal stimulation of ovarian growth in pubertal conspecifics. *Aquaculture*. **97**: 97-107.
- Varadaraj, K.; S. Kumari; T.J. Pandian (1994): Comparison of conditions for hormonal sex reversal of Mozambique Tilapias. *The Progressive Fish-Culturist*. **56**: 81-90.
- Vilia, P.N. (1995): Identificação e doseamento de esteróides sexuais em machos de dourada (*Sparus aurata*) estimulados com LHRH_A. Dissertação apresentada para obtenção do grau de mestre. U.A.L.Faro. 79 pp.
- Villars, T.A. (1983): Hormones and aggressive behavior in teleost fishes. In: *Hormones and aggressive behavior*. B.B. Svare (Ed.). Plenum press. New York and London. pp: 407-433.
- Wendelaar Bonga, S.E. (1993): Endocrinology. In: *The physiology of fishes*. D. Evans (Ed.). Marine Science Series. 469-501.
- Wingfield, J.C. & P. Marler (1988): Endocrine basis of communication in reproduction and aggression. In *The Physiology of Reproduction*. E. Knobil; J. Neill et al. (Eds). Raven press, Ltd., N.Y. pp: 1647-1677.
- Yamazaki, F. (1990): The role of urine in sex discrimination in the goldfish *Carassius auratus*. *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ.* **41** (4): 155-161.



- Yeung, W.S.B. & T.H. Chan (1987): A radioimmunoassay study of the plasma levels of sex steroids in the protandrous, sex-reversing fish *Rhabdosargus sarba* (Sparidae). *Gen. Comp. Endocrinol.* **66**: 353-363.
- Yeung, W.S.B.; H. Chen; S.T.H. Chan (1993): The in vitro metabolism of radioactive Androstenedione and testosterone by the gonads of the protogynous *Monopterus albus* at different sexual phases: a time-course and seasonal study. *Gen. Comp. Endocrinol.* **89**: 313-322.
- Yoshikuni, M.; Y. Nagahama (1991): Endocrine regulation of gametogenesis in fish. *Bull. Inst. Zool., academia Sinica, Monograph.* **16**: 139-172.