

DM.  
BAPT/MC.1

Maria do Céu da Rocha Baptista

**Estudo do efeito da administração de um androgénio não  
aromatizável e de um inibidor da aromatase nos  
comportamentos ocorridos em contextos agonísticos e sexuais  
em molly negra (Pisces, *Poeciliidae*)**

*Dissertação de Conclusão  
do Mestrado em Etologia*

Instituto Superior de Psicologia Aplicada

Lisboa, 1996



Centro de Documentação do I.S.P.A.

Telf. 886 31 84

Reg. 9553

# INDICE

*Agradecimentos*

*Resumo*

<b>Introdução</b>	1
<b>Material e Métodos</b>	11
<b>1. Material</b>	11
<i>1.1. Material Biológico</i>	11
<i>1.2. Equipamento e Condições de Manutenção</i>	11
<i>1.3. Fármacos</i>	13
<b>2. Procedimento Experimental</b>	13
<i>2.1. Interações Macho-Macho</i>	14
<i>2.2. Interações Macho-Fêmea</i>	14
<b>3. Descodificação das Filmagens</b>	14
<i>3.1. Interações Macho-Macho</i>	15
<i>3.2. Interações Macho-Fêmea</i>	15
<b>4. Testes Estatísticos</b>	18
<b>Resultados</b>	
<b>1. Tratamento com 11-cetotestosterona</b>	21
<i>1.1. Interações Macho-Macho</i>	21
<i>1.2. Interações Macho-Fêmea</i>	24
<i>1.3. Breve Síntese</i>	28
<b>2. Tratamento com hidroxandrostenediona</b>	29
<i>2.1. Interações Macho-Macho</i>	29
<i>2.2. Interações Macho-Fêmea</i>	33
<i>2.3. Breve Síntese</i>	36
<b>Discussão</b>	38
<b>Referências</b>	48

## AGRADECIMENTOS

Quero exprimir os meus sinceros agradecimentos às seguintes pessoas e instituições:

- Ao Vitor Almada (Instituto Superior de Psicologia Aplicada), orientador desta tese, que apoiou, criticou, reviu e deu sugestões na sua realização. O seu contributo vai, no entanto, muito para além deste único trabalho. Foi com ele, em 1986, que se iniciaram os meus primeiros contactos e trabalhos em Etologia, que me levaram à realização desta tese. Os seus ensinamentos, ao longo de todos estes anos, muito contribuíram para a sua elaboração.

- Ao Rui Oliveira (Instituto Superior de Psicologia Aplicada) que esteve sempre presente ao longo de todo este trabalho. Do desenho experimental à revisão e crítica do manuscrito, passando pela cedência de bibliografia, auxílio no tratamento e interpretação dos dados e na execução das figuras, o seu apoio foi constante.

- Ao Instituto Superior de Psicologia Aplicada, pelo apoio institucional que tornou possível a realização deste trabalho. Toda a parte experimental foi realizada neste instituto, tendo sido cedido todo o apoio logístico.

- Ao CEDAC, que possibilitou a execução deste manuscrito. Um agradecimento em particular à Teresa Palma pelo apoio dado nestas últimas semanas. Só a sua preocupação em que o computador estivesse livre sempre que eu dele necessitei permitiu a sua conclusão atempada.

- À Rita Borges pelos artigos recolhidos e cedidos.

- À Ana, com quem partilhei grande parte das manhãs de Setembro a Junho, para não falar dos restantes anos. Sem a sua presença e ajuda constante este trabalho ter-se-ia tornado muito mais difícil de executar.

- À Carla, pela sua presença e ajuda ao longo de todos estes anos. O seu apoio está muito para além de contribuições específicas, ..., e que foram muitas e valiosas.

- Ao Zé, que desde do início deste Mestrado me incentivou, apoiou e foi culmatando todas as minhas falhas nas outras áreas. Sem a sua ajuda, nos momentos mais difíceis, estes anos de Mestrado ter-se-iam tornado esgotantes.

Por fim, um agradecimento muito especial aos meus pais, a quem dedico esta tese. Para além de tudo, que não é possível exprimir em palavras, foram eles que sempre me estimularam e ajudaram, nas várias "escaladas" que levaram à conclusão deste Mestrado.

## *RESUMO*

No presente trabalho, pretendeu-se determinar a importância da aromatização e dos 11-cetoandrogénios nos comportamentos agonísticos e sexuais de uma espécie de Poecílideos, a molly negra. Para o efeito utilizou-se um androgénio não-aromatizável (11-cetotestosterona) e um inibidor da aromatase (hidroxiandrostenediona).

Na realização deste trabalho foram usados apenas indivíduos adultos: 120 machos e 60 fêmeas. Diariamente eram testadas três situações (controlo, 0.5 mg/l e 1.0 mg/l) para uma das substâncias, ou seja para cada série existiam três ensaios, tendo-se efectuado 8 séries para a substância 11-cetotestosterona e 12 séries para a substância hidroxiandrostenediona. Todas as observações foram gravadas em vídeo e posteriormente descodificadas. Durante a descodificação foram contabilizadas as frequências dos comportamentos ocorridos nas interacções entre macho-macho e entre macho-fêmea. Temporizou-se igualmente a duração da latência e de alguns comportamentos.

Neste trabalho, verificou-se que os machos tratados tanto com a 11-cetotestosterona como com a hidroxiandrostenediona apresentam uma maior predisposição para iniciarem as interacções macho-macho.

Por outro lado, os machos tratados com a 11-cetotestosterona manifestam com maior frequência os comportamentos considerados como característicos de interacções agonísticas em outros Poecílideos. Mas a inibição da enzima aromatase não provocou quaisquer diferenças significativas nas frequências médias dos comportamentos agonísticos dos machos tratados em relação aos controlo.

Estes dados indicam portanto, que para esta espécie, a 11-cetotestosterona é um dos esteróides que influencia os comportamentos agonísticos.

Em relação às interacções macho-fêmea não se verificaram diferenças estatisticamente significativas relevantes, nas frequências dos comportamentos ocorridos durante estas interacções. Desta forma, neste trabalho, nada se pode concluir acerca da importância da 11-cetotestosterona e da aromatase para os comportamentos considerados caracteristicamente sexuais.

## INTRODUÇÃO

Com base em estudos anteriores em mamíferos, a testosterona era associada ao macho e o estradiol à fêmea. Este facto, levou à definição de androgénios associada com os esteróides C19 e machos, e de estrogénios associada com esteróides C18 e fêmeas (Kime, 1993).

As definições químicas e biológicas tornaram-se sinónimas, ainda que, mais tarde se tenha tornado claro que, em determinados casos, a conversão de testosterona testicular em estradiol através da aromatase do cérebro era responsável pelas características masculinas. Além disso, nos Teleósteos as concentrações de testosterona no plasma são frequentemente mais elevadas nas fêmeas que nos machos (Kime, 1993). Como tal, um conceito que está agora desactualizado é o de que os esteróides sexuais são específicos de cada sexo, nomeadamente, que os androgénios são hormonas masculinas e os estrogénios são hormonas femininas (Callard, 1982).

Sendo assim, e segundo Kime (1993) tem-se, portanto, que diferenciar entre estrutura química e actividade biológica e restringir a definição de androgénio e estrogénio a esteróides com estrutura C19 e C18, respectivamente, enquanto referimos as actividades biológicas como androgénicas ou estrogénicas como apropriado, independentemente da sua estrutura química.

Existem numerosos estudos nos quais os factores endócrinos estão implicados na modulação de várias respostas comportamentais incluindo a regulação de vários aspectos do comportamento reprodutor. A relação entre o sistema endócrino e os meios físico e biológico é biunívoca: o sistema endócrino regula as respostas comportamentais necessárias ao sucesso reprodutor; mas, por seu lado, é sensível a estímulos sociais e a outros estímulos externos (Liley & Stacey, 1983; Sikkel, 1993). Por outro lado, as hormonas operam como uma parte na complexa integração do mecanismo bioquímico (Brain, 1981).

Embora o esteróide clássico dos mamíferos, estradiol, tenha um papel importante em todos os Vertebrados, incluindo os peixes, as outras hormonas principais dos mamíferos, testosterona e progesterona, têm ambas um papel bastante diferente ou nenhum nos Teleósteos (Kime, 1993). De facto, a maioria das hormonas das gónadas dos peixes

Teleósteos diferem consideravelmente das dos mamíferos (que lhes são comparáveis), tanto em estrutura como em função (Kime & Groves, 1986).

Além disso, o conhecimento que se tem sobre os esteróides clássicos dos Teleósteos deriva de estudos em Salmonídeos, os quais segundo dados recentes são, em muitos aspectos, Teleósteos atípicos. De facto, as concentrações de esteróides clássicos no plasma variam enormemente e são geralmente mais elevadas ( $100 \text{ ngml}^{-1}$ ) nos Salmonídeos do que em espécies Perciformes ( $1 \text{ ngml}^{-1}$ ), com valores intermédios nos Cipriniformes e Siluriformes ( $10 \text{ ngml}^{-1}$ ). Tal facto pode indicar que os receptores ou as proteínas de ligação diferem nos Teleósteos mais avançados e que as concentrações baixas são eficazes, ou que outros esteróides "não-clássicos" estão presentes (Kime, 1993).

Até meados dos anos 60 acreditava-se largamente que as hormonas das gónadas, particularmente os androgénios, eram as únicas hormonas envolvidas no controlo do comportamento social. Nos últimos 15 anos, no entanto, tem sido estabelecido que existem de facto muitos outros tipos de efeitos hormonais no comportamento agressivo (Leshuer, 1983). De facto, existe, uma evidência crescente de que as gónadas dos Teleósteos podem produzir um número de esteróides "não-clássicos", os quais podem ter um papel importante também na sua biologia reprodutora. Por exemplo, estudos recentes mostraram que as gónadas de *Carassius auratus* podem produzir um grande número de muitos novos esteróides (Kime, 1993). Além disso, alguns estudos em Teleósteos têm mostrado que estes produzem metabolitos da testosterona, não encontrados nos mamíferos, os quais podem ser mais potentes nos peixes do que são os androgénios (Villars, 1983).

A estimulação hormonal do comportamento reprodutor masculino nos machos de Teleósteos, à parte de ser bem diferente dos Tetrapódes, é consideravelmente diferente entre espécies distintas (Mayer *et al.*, 1994). No entanto, tal como acontece em todos os Vertebrados (com possível excepção dos Ciclostomos), uma característica fundamental do sistema endócrino dos peixes é a interdependência entre o hipotálamo, a pituitária e as gónadas: o eixo hipotálamo-pituitária-gónada (HPG) (Liley & Stacey, 1983). Bona-Gallo & Licht (1981) e Chang & Huang (1982) demonstraram, *in vitro*, que a produção de androgénios pelos testículos dos Teleósteos é estimulada pelas gonadotrofinas (Ueda *et al.*, 1984).

Seria de esperar que à semelhança de outros Vertebrados, as hormonas das gónadas desempenhassem o papel principal de mediador do comportamento reprodutor, actuando

directamente nas estruturas cerebrais que controlam certos tipos de comportamento, ou indirectamente, ao influenciarem comportamentos através do seu efeito no desenvolvimento de características sexuais secundárias. Isto é, aparentemente, o que acontece nos machos de Teleósteos em que o controlo e coordenação dos processos reprodutores, em comum com os Vertebrados superiores, é mediado por hormonas esteróides de origem nas gónadas, debaixo de um controlo directo de uma ou mais gonadotrofinas pituitárias (Liley & Stacey, 1983; Peter, 1983; Jobling, 1984; De Leeuw *et al.*, 1987; Pottinger, 1988). Por outro lado, as gónadas exercem efeitos de retroacção quer negativa quer positiva no eixo hipotálamo-pituitária-gónada e em alguns casos esta retroacção de esteróides aparece dependente da aromatização (Antonopoulou *et al.*, 1995).

Alguns estudos indicam que a secreção de gonadotrofinas está de acordo com uma regulação de retroacção negativa dos esteróides nos Teleósteos (e.g. em Salmonídeos (Crim *et al.*, 1981)). Outros trabalhos indicam que um efeito de retroacção positiva de esteróides do sexo toma um papel importante na regulação da produção e/ou secreção de gonadotrofinas em alguns Teleósteos (Crim *et al.*, 1981; Peter, 1983).

Outros estudos ainda demonstram que os androgénios aromatizáveis e os estrogénios podem ter um efeito de retroacção positiva na pituitária de peixes sexualmente imaturos de forma a provocar uma acumulação de gonadotrofinas na pituitária (Crim *et al.*, 1981).

A reprodução dos machos de Teleósteos é caracterizada pela secreção de androgénios durante a maior parte do ciclo, os quais estimulam a espermatogénese, tendo os progestogénios um papel durante a maturação final dos gâmetas, em algumas espécies (Piferrer & Donaldson, 1991; Kime, 1993). No entanto, em *Gasterosteus aculeatus* observam-se efeitos inibidores dos androgénios na espermatogénese (Mayer *et al.*, 1990a). Os estrogénios, pelo contrário, reprimem a espermatogénese e causam a degeneração dos testículos (Piferrer & Donaldson, 1991).

Existe até à data muita informação sobre androgénios e os seus efeitos biológicos nos Teleósteos. No entanto, enquanto, as hormonas androgénicas clássicas, em particular, a testosterona e a 11-cetotestosterona apresentam-se como tendo um papel importante em vários aspectos da reprodução dos machos de peixes, incluindo a maturação das gónadas, o desenvolvimento de caracteres sexuais secundários e a indução dos comportamentos reprodutores (Pasmanik & Callard, 1985; Kindler *et al.*, 1989; Mayer *et al.*, 1990a; Borg, 1994; Mayer *et al.*, 1994), existe pouca informação acerca dos restantes androgénios (Mayer *et al.*, 1990a; Kime, 1993).

Tal facto deve-se a que muitos dos trabalhos com peixes têm usado ensaios para o qual o anti-soro está disponível, e o facto de 11-cetotestosterona ser medida nos representantes da maioria das ordens de Teleósteos não indica que seja sempre o esteróide mais importante (Kime, 1993).

Assim, embora a testosterona e a 11-cetotestosterona sejam aparentemente os dois esteróides testiculares predominantes nos Teleósteos estudados (Edler *et al.*, 1971), ainda não se sabe se eles desempenham papéis igualmente importantes no desenvolvimento das características sexuais secundárias e no comportamento reprodutor, ou se a 11-cetotestosterona deve ser considerado o androgénio mais importante nos Teleósteos. Em algumas espécies como por exemplo, em *Salmo trutta* e *Oncorhynchus mykiss*, a testosterona é secretada mais cedo no ciclo do que a 11-cetotestosterona, o que sugere um papel diferente para os dois esteróides (Kime, 1993). Por outro lado, embora se tenha demonstrado que a testosterona é eficiente como androgénio, os estudos com plasma e tecidos não permitiram concluir que a testosterona seja o principal androgénio associado com o comportamento e a morfologia da reprodução (Liley & Stacey, 1983).

Além disso, a importância da testosterona no comportamento reprodutor dos peixes tem sido questionada devido a vários factores:

1) a descoberta de testosterona em fêmeas de um certo número de espécies, a níveis semelhantes ou superiores (e.g. Pleuronectídeos) aos encontrados nos machos, coloca algumas dúvidas quanto ao papel primário da testosterona como androgénio, nos peixes (Billard, 1982; Liley & Stacey, 1983; Kindler *et al.*, 1991).

2) a testosterona pode ser usada como um precursor na biossíntese de outros esteróides, como por exemplo da 11-cetotestosterona (Liley & Stacey, 1983). Esta relação pode explicar o aumento de 11-cetotestosterona observado no soro dos peixes tratados com testosterona (Kindler *et al.*, 1991).

3) foi demonstrado noutros Vertebrados que os comportamentos reprodutores podem não ser estimulados directamente pela testosterona mas pelos produtos do seu metabolismo no cérebro (exemplo, estradiol ou dihidrotestosterona) (Kindler *et al.*, 1991).

Alguns estudos indicam que a razão 11-cetotestosterona/testosterona no soro é provavelmente mais importante que as concentrações absolutas destas hormonas para a expressão de alguns comportamentos reprodutores (Kindler *et al.*, 1991).

Porém, as descobertas realizadas nos últimos anos sugerem que a 11-cetotestosterona é o principal androgénio em muitas espécies de Teleósteos (Borg, 1994). A 11-cetotestosterona foi primeiramente isolada no plasma de *Oncorhynchus nerka* (Idler *et al.*, 1960 in Ueda *et al.*, 1984) e posteriormente foi identificada e medida no plasma de inúmeros Teleósteos (Kime, 1993). Investigações subseqüentes revelaram claros efeitos androgénicos desta hormona, mostrando-se como a mais potente na regulação do comportamento sexual masculino numa grande variedade de Teleósteos (Idler *et al.*, 1971; Idler *et al.*, 1976; Saino & Møller, 1995). Por exemplo, este esteróide foi 17 vezes mais potente do que a testosterona na indução das características sexuais secundárias do macho, na fêmea de *Oryzias latipes* (Colombo & Belvedere, 1976).

Por outro lado, foi demonstrado recentemente a existência nos peixes, tal como acontece nos mamíferos, de locais extra-gónadas (e.g. células sanguíneas) produtores de esteróides. Locais estes que podem ser importantes na regulação das concentrações de esteróides no soro. A 11-cetoandrostenediona pode ser convertida em 11-cetotestosterona, pela enzima 17 $\beta$ -hidroxiesteróide-desidrogenase. De facto, quando as células sanguíneas de *Salmo salar*, *Gasterosteus aculeatus*, *Zoarcetes viviparus*, *Carassius carassius*, *Clarias gariepinus* e *Calamoichthys calabaricus* são incubadas com triturados de 11 $\beta$ -hidroxiandrostenediona ou 11-cetoandrostenediona ocorre a conversão de 11-cetoandrostenediona em 11-cetotestosterona, indicando que a actividade da enzima estava presente nas células sanguíneas (Borg *et al.*, 1989; Mayer *et al.*, 1990a; Mayer *et al.*, 1990b; Kindler *et al.*, 1991; Mayer *et al.*, 1994). Se a enzima catalizar a conversão em ambos os sentidos, elevados níveis de 11-cetotestosterona podem dar origem a 11-cetoandrostenediona que depois é transformada em testosterona (Kindler *et al.*, 1991), o que poderá explicar o aumento dos níveis de testosterona nos machos tratados com 11-cetotestosterona.

A conversão de androgénios no sangue pode ser importante devido à sua eficácia biológica e a localização de enzimas metabolizadoras de esteróides nas células sanguíneas pode estar especialmente situada para modular os níveis de circulação de esteróides (Mayer *et al.*, 1990b).

Por outro lado, tal como a testosterona é um androgénio mais potente que a androstenediona nos mamíferos (Luttge, 1983) em analogia pode-se supor que a 11-cetotestosterona é mais potente que a 11-cetoandrostenediona nos peixes (Mayer *et al.*, 1990b).

A aromatização tem sido indicada como um factor importante nos efeitos dos androgénios nas células gonadotróficas pituitárias de juvenis de *Salmo gairdneri* e nos adultos de *Clarias gariepinus*. Nesta a aromatização parece ser importante para os efeitos de retroacção negativa na secreção de gonadotrofinas das gónadas (Antonopoulou *et al.*, 1995).

A conversão dos androgénios em estrogénios - *aromatização* - é controlada pelo complexo enzimático P-450, designado por aromatase, que pode ser detectada no cérebro de todas as classes de Vertebrados (Callard *et al.*, 1978), embora a sua actividade seja extraordinariamente elevada nos Teleósteos (100 a 1000 vezes superior que nos mamíferos e outros Vertebrados) (Callard, 1982; Pasmanik & Callard, 1985; Timmers *et al.*, 1987).

A actividade da aromatase do cérebro muda durante o desenvolvimento e é assimétrica em determinados estádios, mas a regulação da enzima ainda é pouco compreendida (Hutchison, 1993). Além disso, quer a actividade da aromatase quer a sua localização no cérebro diferem fortemente nas diferentes classes (Timmers *et al.*, 1987), mas é sempre elevada no hipotálamo e na pituitária e normalmente também no telencéfalo (Borg, 1994). Contudo, o metabolismo no cérebro de androgénios é muito mais complexo do que a análise deste único sistema enzimático pode sugerir (Hutchison, 1991).

Os androgénios não aromatizáveis não são convertidos pelas enzimas em metabolitos de estrogénio pelos sistemas biológicos típicos (Brain, 1981). A 11-cetotestosterona não é aromatizável em estrogénios, aparentemente devido a um impedimento com o sistema enzimático da aromatase (Crim, *et al.*, 1981). Assim, a testosterona, a androstenediona e a metiltestosterona são aromatizáveis e os androgénios 5 $\alpha$  e 5 $\beta$ -reduzidos, bem como 11-androgénios não o são (Borg, 1994).

A aromatização aparece como sendo um passo essencial na regulação de várias respostas neuroendócrinas e comportamentais, uma vez que os estrogénios do cérebro têm um papel central em vários processos relacionados com o sexo, tais como a diferenciação sexual, o comportamento sexual adulto e a secreção gonadotrófica (Borg, 1994).

Segundo a hipótese da aromatização os androgénios tem que ser aromatizados em estrogénios, no cérebro, para estimular o comportamento sexual (Sodersten, 1991). Os androgénios, tais como a testosterona e a androstenediona, podem ser aromatizados em estrogénios (estradiol e estrona, respectivamente) nos cérebros de muitos Vertebrados

(Balthazart & Schumacher, 1983; Hutchison & Steimer, 1983) sendo esta conversão particularmente elevada nos Teleósteos (Callard *et al.*, 1981; Callard, 1982; Andersson *et al.*, 1988; Sodersten, 1991; Antonopoulou *et al.*, 1995). Naftolin *et al.* (1971 in Balthazart & Schumacher, 1983) foram os primeiros a demonstrar que a androstenediona pode ser convertida *in vitro* em estrona, e subsequentemente em estradiol, pelo diencéfalo e pelo sistema límbico.

Tal como outros esteróides, os estrogénios não iniciam o comportamento eles próprios, mas actuam para aumentar ou diminuir a probabilidade da ocorrência do comportamento de acordo com diversas condições de estimulação exteriores (Hutchison, 1993).

Nos mamíferos o comportamento reprodutor masculino é estimulado por estrogénios e por androgénios que podem ser aromatizados em estrogénios, visto que os androgénios não aromatizáveis geralmente não são eficazes (Munro & Pitcher, 1985; Borg, 1987). No entanto, o papel da aromatase do cérebro é difícil de determinar nos machos de mamíferos, porque os efeitos no comportamento do estrogénio não podem ser imediatamente separados do androgénio (Hutchison, 1993).

Os substratos apropriados para a aromatização podem ser produzidos pelos órgãos reprodutores. Isto favorece a hipótese de que o processo de aromatização no cérebro e os efeitos comportamentais resultantes podem ser gonado-dependentes. Consequentemente, as áreas no cérebro com uma elevada actividade da aromatase podem estar envolvidas em processos reprodutores (Timmers *et al.*, 1987).

Nos Teleósteos têm sido relatadas mudanças na actividade da aromatase do cérebro, de acordo com o estado reprodutor (Andersson *et al.*, 1988). No entanto, pouco se sabe acerca de qual o esteróide endógeno específico envolvido na regulação e na expressão dos diferentes componentes individuais do comportamento reprodutor dos machos de Teleósteos (Kindler *et al.*, 1991).

A aromatase foi localizada no hipotálamo, nas áreas pré-óptica e em algumas estruturas telencefálicas associadas com o comportamento nos Vertebrados inferiores (Crim, *et al.*, 1981; Timmers *et al.*, 1987; Hutchison, 1993). Em animais superiores as áreas homólogas do cérebro têm actividade da aromatase e estes centros servem para controlar a secreção da hormona gonadotrófica, o comportamento sexual e os ciclos reprodutores

(Crim, *et al.*, 1981; Pasmanik & Callard, 1985). O telencéfalo dos Teleósteos, especialmente a sua parte ventral, tem fortes associações anatómicas com o sistema olfactivo. Existem, no entanto, várias indicações que esta parte do cérebro está também envolvida em processos reprodutores tais como comportamento sexual e libertação de gâmetas. Assim, para certas regiões no cérebro existe uma correlação positiva entre uma elevada actividade da aromatase, a reprodução e o desenvolvimento sexual (Timmers *et al.*, 1987).

A aromatase na área pré-óptica é influenciada pelo fotoperíodo e por estímulos sócio-sexuais e: 1) apresenta elevada actividade e afinidade forte ao substrato; 2) é regulada por androgénios e estrogénios, e o tipo de regulação difere de acordo com a área do cérebro; 3) é influenciada por produtos dos caminhos inactivos endógenos, 5 $\beta$ -reduzido, 5 $\beta$ -dihidrotestosterona e outros metabolitos 5 $\beta$ -reduzidos surgem como reguladores não genómicos na aromatase do cérebro (Hutchison, 1993). Assim, para além da actividade da aromatase, a actividade de 5 $\alpha$ -reductase e 17 $\beta$ -desidrogenase foi também demonstrada nos cérebros dos Teleósteos (Borg, 1994) e em contraste com a aromatase, a actividade de 5 $\alpha$ -reductase no cérebro e na pituitária é semelhante com os valores previamente relatados pelos mesmos tecidos em ratos, hamsters, pássaros e sapos. Assim, é a relação da formação de estrogénio *versus* metabolitos 5 $\alpha$ -reduzidos que distingue os Teleósteos dos outros Vertebrados (Pasmanik & Callard, 1985).

A acção da testosterona na área pré-óptica e no hipotálamo pode ser aumentada produzindo mais estrogénios activos ou pode ser diminuída produzindo mais 5 $\beta$ -dihidrotestosterona inactivo. Isto é também apoiado pela observação de que a actividade da aromatase hipotalâmica é mais elevada nos machos sexualmente activos. Em contraste, o aumento da actividade da 5 $\beta$ -reductase está associada com os défices comportamentais (Hutchison, 1993).

Uma elevada actividade da 5 $\beta$ -reductase pode reduzir a conversão da testosterona em estradiol-17 $\beta$  comportamentalmente activo, por competir com a aromatase para o mesmo substrato - *hipótese da competição*. Ou então, os metabolitos 5 $\beta$ -reduzidos podem inibir a actividade da aromatase por actuar directamente sobre a enzima - *hipótese de inibição*.

Apesar da possibilidade de que as quantidades de metabolitos activos formados localmente determinam a ocupação de receptores e assim iniciam as respostas, muito pouco é conhecido acerca de mudanças naturais na actividade enzimática e como as conversões são reguladas (Pasmanik & Callard, 1985).

A possibilidade de diferentes formas de aromatase pode complicar ainda mais a interpretação dos efeitos inibitórios dos metabolitos 5 $\beta$ -reduzidos da testosterona. Uma forma de aromatase pode ser mais sensível a baixas concentrações de inibidores do que outras (Hutchison, 1993).

Por outro lado, podem existir, entre as espécies, diferenças básicas na regulação da actividade da aromatase nas áreas do cérebro sensíveis aos esteróides (Hutchison, 1993). Além disso, existe uma diferença sexual no tipo de mecanismo regulador envolvido na indução da aromatase. As diferenças de sexo e espécie sugerem que o papel dos esteróides pode ser mais complexo do que o de um inibidor primário e pode requerer mediação por um neurotransmissor ou neuropeptídeo (Pasmanik *et al.*, 1988).

Os níveis elevados de aromatase nos tecidos neuroendócrinos dos Teleósteos recomendam-os como animais modelo para estudos futuros sobre a enzima, a sua regulação e o seu papel na governação das respostas em alvos centrais dependentes de androgénios. Uma questão que permanece, contudo, é o significado adaptativo desta elevada biossíntese de estrogénio no cérebro e na pituitária, neste grupo (Pasmanik & Callard, 1985).

Diferentes estratégias têm sido desenvolvidas de forma a separar a acção dos androgénios da dos estrogénios. Uma dessas estratégias recorre à utilização de inibidores da aromatase, uma vez que se o agente activo é o estrogénio se se inibir a sua formação a partir da testosterona os efeitos desta nos comportamentos serão atenuados (Olsen, 1983).

O inibidor da aromatase suprime, em parte, o efeito da testosterona (Andersson *et al.*, 1988). Por exemplo, o inibidor da aromatase "1,4,6-androstatriene-3,17-dione" (ATD) reduz o efeito estimulatório da testosterona na acumulação de gonadotrofinas (Antonopoulou *et al.*, 1995; Peter, 1983; Borg, 1994).

Contudo, os inibidores da aromatase, como outros fármacos, podem exhibir efeitos em locais não específicos. Este é especialmente o caso para os compostos de esteróides que se ligam irreversivelmente à aromatase nos mamíferos, mas o qual pode interferir noutro processo metabólico de esteróides ou em receptores de esteróides, como é também conhecido nos mamíferos (Antonopoulou *et al.*, 1995).

Os inibidores da aromatase têm um número diferente de efeitos, positivo e negativo na reprodução dos salmões, facto que sugere que a aromatização é fisiologicamente

importante em mecanismos diferentes, controlando a reprodução nestas espécies (Antonopoulou *et al.*, 1995).

Nos mamíferos e pássaros "4-hidroxi-4-androstene-3,17dione" (4OH) e "4-benzonitrile monohydrochloride" (CGS) têm sido referidos como inibidores mais eficazes que "1,4,6-androstatriene-3,17-dione" (ATD) (Antonopoulou *et al.*, 1995).

Com este trabalho pretende-se determinar qual a importância da aromatização e dos 11-cetoandrogénios nos comportamentos agonísticos e sexuais, utilizando-se para o efeito um androgénio não aromatizável (11-cetotestosterona) e um inibidor da aromatase (hidroxiandrostenediona).

# MATERIAL E MÉTODOS

## 1. Material

### 1.1. *Material Biológico*

Neste estudo utilizou-se uma espécie doméstica híbrida, vulgarmente designada por molly negra, que não é encontrada em estado selvagem e que se pensa que tenha resultado de um cruzamento de *Poecilia sphenops* com *Poecilia latipinna* (Miller, 1983)..

É uma espécie de água doce da família *Poeciliidae* natural da América do Sul e da América Central. Nesta espécie, tal como na maioria dos Poecilídeos, existe um dimorfismo sexual acentuado, com os machos consideravelmente mais pequenos que as fêmeas e apresentando a barbatana anal modificada, formando o gonopódio. Esta espécie é ovovivípara sendo a fertilização interna (Abrahams, 1993; Bisazza, 1993).

Em termos de táticas de acasalamento os Poecilídeos exibem duas alternativas: os machos cortejam a fêmea de forma a obter a sua cooperação durante o cópula; ou então forçam a inseminação. No entanto, em certas espécies (por exemplo em *Poecilopsis occidentalis* e *Poecilia reticulata*) o mesmo indivíduo pode usar as duas táticas dependendo das circunstâncias: capacidade competitiva ou receptividade da fêmea (Bisazza, 1993).

Na realização deste trabalho foram usados apenas indivíduos adultos: 120 machos e 60 fêmeas. Todos os peixes foram adquiridos no comércio da especialidade, sendo provenientes de aquaculturas em Singapura.

### 1.2. *Equipamento e Condições de Manutenção*

Na realização deste trabalho foram utilizados 11 aquários:

#### a) *Aquários de Manutenção*

- 2 com a capacidade de 40 l equipados, cada um deles, com filtro biológico (dois filtros de fundo com um "air-lift" cada). Estes filtros encontravam-se cobertos por uma camada de areia fina com uma altura de cerca de 5cm e à superfície uma camada de casca de ostra com cerca de 1cm. A temperatura da água manteve-se constante através do uso de um

termóstato regulado para 24.5°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ). O aquário era iluminado por uma lâmpada fluorescente de 20W, regulada automaticamente para um fotoperíodo de 12 horas diárias (LD 12:12; L 8.00-20.00; D 20.00:8.00).

Um dos aquários funcionou durante toda a experiência como um aquário de reserva onde eram colocados todos os indivíduos (machos e fêmeas), durante pelo menos quinze dias antes de serem testados experimentalmente.

No outro aquário eram colocados todos os peixes já testados.

#### *b) Aquários de Observação*

- 3 com a capacidade de 10 l equipados, cada um deles, com uma pedra difusora, um termóstato regulado para uma temperatura de 24.5°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ), uma lâmpada fluorescente de 20 W e uma placa de fundo em acrílico branco. Esta placa foi colocada apenas com a finalidade de durante as filmagens e descodificação das mesmas, os peixes serem facilmente detectados e observados.

Nestes aquários foram colocados, durante a realização da experiência, todos os peixes a serem observados.

*Nota:* Estes aquários foram igualmente utilizados durante a fase preparatória do trabalho, em que através de observação *ad libitum* se elaborou o etograma desta espécie.

#### *c) Aquários de Tratamento*

- 6 aquários de 2 l equipados com pedra difusora.

Estes 6 aquários encontravam-se colocados dentro de um açafate que continha água e um termóstato regulado para uma temperatura de 24.5°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ).

Todos estes aquários se encontravam separados uns dos outros por uma folha de plástico cinzenta opaca de forma a impossibilitar a visualização entre os diferentes indivíduos a serem testados.

Os três machos a serem testados diariamente eram colocados nestes aquários, cada um deles com a respectiva diluição da substância a testar e controle.

Diariamente e de manhã todos os indivíduos eram alimentados *ad libitum* com flocos ("TretaMin").

### **1.3. Fármacos**

Na realização deste trabalho utilizou-se um androgénio não aromatizável, 11-cetotestosterona, e um inibidor da aromatase, hidroxiandrosteniona (4-"androstend"-4-ol-3,17- diona). Para ambos foi usada uma diluição de 0.5 mg/l e 1.0 mg/l, em que o solvente foi o DMF (N,N-dimetilformamida), o qual foi utilizado também para controlo de ambas as substâncias.

Todos os fármacos foram adquiridos directamente da "Sigma".

As substâncias foram testadas separadamente, embora o procedimento usado tenha sido idêntico.

## **2. Procedimento Experimental**

Diariamente eram testadas três situações (controlo, 0.5 mg/l e 1.0 mg/l) para uma das substâncias, ou seja para cada série existiam 3 ensaios.

Para o efeito, os três machos a serem testados eram colocados em "banho" (via imersão) durante 24 horas, na substância a testar, nas respectivas diluições e controlo.

Após as 24 horas os machos eram retirados aleatoriamente, de forma a anular o efeito da hora do dia, de 30 em 30 minutos e colocados nos Aquários de Observação apenas com a pedra difusora e visualmente isolados uns dos outros.

As experiências eram realizadas sempre de manhã sensivelmente a partir das 9 horas.

O trabalho decorreu de Setembro de 1995 a Junho de 1996 tendo-se efectuado 8 séries para a substância 11-cetotestosterona e 12 séries para a substância hidroxiandrostenediona.

De forma a obter um registo completo das diferentes interações, recorreu-se à gravação em vídeo para uma posterior análise.

Usou-se uma câmara de vídeo VHS-C (Panasonic), colocada sobre um tripé e durante a gravação mantinha-se um plano fixo que abrangia toda a área do aquário em sistema de auto-focagem.

A gravação tinha início sensivelmente 90 minutos após a colocação dos machos nos aquários ("período de ambientação" às novas condições, que foi determinado numa fase

preparatória do trabalho) e era realizada pela mesma ordem com que estes tinham sido colocados nos respectivos aquários.

### ***2.1. Interações Macho-Macho***

Para a gravação das interações macho-macho colocava-se o macho intruso num dos aquários. Procurava-se que este macho tivesse dimensões semelhantes às do macho a ser testado (residente), visto que as dimensões relativas dos oponentes podem determinar a dominância das interações (Snelson Jr., 1982; Beacham, 1987; Wazlavek & Figler, 1989; Zhuikov, 1993).

De seguida, media-se o tempo decorrido até à primeira interação (latência), altura em que se iniciava a gravação que tinha uma duração de 15 minutos. Após este tempo o macho intruso era retirado e medido.

Este procedimento era repetido de uma forma idêntica para os outros dois machos, usando-se sempre intrusos "naif" e respeitando a ordem inicial e os intervalos de tempo.

### ***2.2. Interações Macho-Fêmea***

Na gravação das interações macho-fêmea, que se processava após as interações macho-macho, ao macho tratado (residente) que se encontrava no aquário, juntavam-se três fêmeas retiradas ao acaso do aquário de reserva. A utilização de três fêmeas em vez de uma deve-se ao facto de não ser possível determinar o estado de receptividade destas, o qual sofre alterações cíclicas (Liley & Wishlow, 1974).

Media-se a latência e de seguida, iniciava-se a gravação que tinha a duração de 15 minutos. No final da gravação retiravam-se as fêmeas e o macho, o qual era medido.

Este procedimento era igualmente repetido para os outros dois machos, utilizando-se sempre as mesmas fêmeas.

## **3. Descodificação das Filmagens**

Utilizando um videogravador e uma televisão, os registos de vídeo obtidos foram analisados com a imagem em "tempo real".

Na descodificação das filmagens todos os comportamentos dados e recebidos pelo macho residente eram anotados em folhas de registo.

### ***3.1. Interações Macho-Macho***

Nas observações entre machos (residente/intruso) foram anotadas as frequências dos seguintes comportamentos: exibição, aproximação, afastamento, recuo, perseguição, investida, toque, toque caudal, posição relativa, arquear o corpo, fuga, extensão de pélvicas e gonopódio e toque bucal. Além disso, para os comportamentos exibição, afastamento, perseguição, posição relativa e arquear o corpo, foram temporizadas as respectivas durações.

Na tabela 1 encontram-se descritos os diferentes comportamentos analisados durante as interações macho-macho. Semelhantes comportamentos foram descritos para outras espécies de Poecílideos (Baird, 1968; Clark *et al.*, 1954).

### ***3.2. Interações Macho-Fêmea***

Nas observações entre machos e fêmeas foram anotadas as frequências dos seguintes comportamentos: exibição, aproximação, afastamento, recuo, seguir, toque bucal, extensão de pélvicas e gonopódio, tentativa de cópula, sigmóide, investida, toque, toque caudal e arquear o corpo. Foram temporizadas ainda as durações dos comportamentos exibição, afastamento, seguir e arquear o corpo.

Na tabela 2 apresenta-se a descrição dos diferentes comportamentos analisados durante as interações macho-fêmea

Tabela 1. Descrição dos comportamentos ocorridos durante as interações macho-macho.

Comportamentos	Descrição
Exibição	O indivíduo apresenta-se com a dorsal aberta, em maior ou menor amplitude. Por vezes, verifica-se a abertura simultânea da barbatana caudal.
Aproximação	Movimento em direcção ao oponente em natação lenta.
Afastamento	Perante a abordagem do oponente o indivíduo afasta-se em natação normal.
Recuo	Na presença do oponente o indivíduo movimenta-se em natação lenta no sentido da região posterior do corpo.
Perseguição	Natação rápida e em direcção ao oponente em fuga.
Investida	O indivíduo desloca-se em direcção ao oponente em natação rápida. Pode aproximar-se do oponente (que se encontra na sua vizinhança ou distante) em posição frontal, lateral ou posterior em relação ao corpo deste.
Toque	Quando na sequência de uma investida ocorre um contacto da região frontal do indivíduo em diferentes pontos do oponente.
Toque Caudal	O indivíduo em posição paralela ou anti-paralela, curva a região posterior do corpo batendo de seguida com a caudal na região posterior ou anterior, respectivamente, do corpo do oponente.
Posição Relativa	O indivíduo na proximidade de outro, em posição paralela, anti-paralela ou perpendicular, mantém-se imóvel na coluna de água batendo as peitorais. As restantes barbatanas encontram-se recolhidas.
Arquear o Corpo	O indivíduo na proximidade do outro, flecte a parte posterior e anterior para o mesmo lado, adoptando uma posição côncava em relação ao oponente, com as barbatanas todas recolhidas ou com a barbatana dorsal aberta. Esta posição pode manter-se mesmo após o afastamento do oponente.
Fuga	Natação rápida na direcção contrária à do oponente.
Extensão de Pélvicas e Gonopódio	O indivíduo imóvel na coluna de água ou em natação lenta estende as pélvicas e o gonopódio. Este comportamento pode ocorrer em séries.
Toque Bucal	O indivíduo aproxima-se por trás e por baixo do oponente tocando com a boca na região genital deste.

*Nota:* O comportamento de fuga nunca foi observado no macho residente.

Tabela 2. Descrição dos comportamentos ocorridos durante as interações macho-fêmea.

<b>Comportamentos</b>	<b>Descrição</b>
Exibição	O macho apresenta-se com a dorsal aberta, em maior ou menor amplitude. Por vezes, verifica-se a abertura simultânea da barbatana caudal.
Aproximação	Movimento em direcção à fêmea em natação lenta.
Afastamento	Perante a abordagem da fêmea o macho afasta-se em natação lenta ou rápida.
Recuo	Na presença da fêmea o macho movimenta-se em natação lenta no sentido da região posterior do corpo.
Seguir	Movimento na direcção da fêmea que se afasta em ritmo normal de natação. O macho mantém-se sempre na proximidade da fêmea.
Toque Bucal	O macho aproxima-se por trás e por baixo da fêmea tocando com a boca na região genital da fêmea.
Extensão de Pélvicas e Gonopódio	O macho imóvel na coluna de água ou em natação lenta estende as pélvicas e o gonopódio. Este comportamento pode ocorrer em séries.
Tentativa de Cópula	O macho na proximidade da fêmea e apresentando extensão do gonopódio, roda sobre o eixo longitudinal, aproximando o gonopódio da região genital desta, podendo ou não tocar-lhe.
Sigmóide	O macho na proximidade da fêmea flexa a parte anterior e posterior do corpo para lados opostos. As barbatanas dorsal e anal encontram-se abertas.
Investida	O macho desloca-se em direcção à fêmea em natação rápida. Pode aproximar-se da fêmea (que se encontra na sua vizinhança ou distante) em posição frontal, lateral ou posterior em relação ao corpo desta.
Toque	Quando na sequência de uma investida ocorre um contacto da região frontal do macho em diferentes pontos da fêmea (com excepção da região genital).
Toque Caudal	O macho em posição paralela ou anti-paralela, curva a região posterior do corpo batendo de seguida com a caudal na região posterior ou anterior, respectivamente, do corpo da fêmea.
Arquear o Corpo	O macho na proximidade da fêmea, flexa a parte posterior e anterior para o mesmo lado, adoptando uma posição côncava em relação à fêmea, com as barbatanas todas recolhidas ou com a barbatana dorsal aberta.

## 4. Testes Estatísticos

A análise estatística dos dados foi efectuada com o Programa Statistica (versão 4.0).

De acordo com o desenho experimental, pretendia-se para cada substância testar a hipótese nula de não haver alterações comportamentais nos indivíduos tratados em relação ao controlo, aplicando uma estatística de F ou análise de variância (ANOVA) (Zar, 1984).

Dado que os níveis das variáveis independentes eram fixos e escolhidos especificamente (controlo, 0.5 mg/l e 1.0 mg/l) utilizou-se o Modelo I ("*fixed effects model*") (Zar, 1984).

Decidiu-se como teste *a priori* utilizar as Comparações Planeadas de modo a verificar as diferenças estatísticas entre os pares controlo *versus* 0.5 mg/l e controlo *versus* 1.0 mg/l (Winer *et al.*, 1991).

Para as variáveis dependentes em que não se verificavam os pressupostos da ANOVA (normalidade e homogeneidade da variância) foi realizada uma transformação logarítmica, particularmente eficiente para normalizar as distribuições. Para evitar os valores iguais a zero ou muito próximos utilizou-se  $\log(X+1)$  (Winer *et al.*, 1991).

Nas situações em que, mesmo após a transformação, não se verificaram os pressupostos, recorreu-se à estatística não-paramétrica Kruskal-Wallis a fim de evitar as suposições relativas à normalidade e homogeneidade da variância, necessárias à prova paramétrica F, e também para aumentar a generalidade dos resultados (Marascuilo & Serllin, 1988; Siegel, 1975).

A prova de Kruskal-Wallis, é uma prova extremamente útil para decidir se  $k$  amostras independentes provêm de populações diferentes. Os valores amostrais quase que invariavelmente diferem entre si, e o problema é decidir se essas diferenças entre as amostras significam diferenças efectivas entre as populações, ou se representam apenas variações casuais, que podem ser esperadas entre amostras aleatórias de uma mesma população. A prova supõe que a variável em estudo tenha distribuição inerente contínua e exige mensuração no mínimo ao nível ordinal (Siegel, 1975).

A prova de Kruskal-Wallis é mais eficiente do que a extensão da prova de mediana, porque utiliza mais as informações contidas nas observações, convertendo os "scores" em postos ao invés de simplesmente dicotomizá-los em "acima" e "abaixo" da mediana. Assim, de acordo com Siegel (1975) quando os dados são tais que qualquer uma das duas provas

pode ser aplicada, a prova de Kruskal-Wallis é mais eficiente porque utiliza mais as informações contidas nas observações.

A prova de Kruskal-Wallis parece ser a mais eficiente das provas não-paramétricas para  $k$  amostras independentes. Tem poder-eficiência de  $3/\pi = 95,5$  por cento quando comparado com a prova F (a mais poderosa prova paramétrica) (Siegel, 1975).

Nas tabelas 3 e 4 apresentam-se os testes estatísticos (comparações planeadas sem transformação, com transformação logarítmica, com transformação  $\log(X+1)$  e teste Kruskal-Wallis) utilizados para os diferentes comportamentos, nos dois tipos de interações e para os dois tratamentos.

Tabela 3. Testes estatísticos para os diferentes comportamentos para o tratamento com 11-cetotestosterona. (DT - Duração Total; DM - Duração Média; rec. - recebido).

Tipo de Teste	Comparações Planeadas			Kruskal-Wallis
Tipo de Interação	Sem Transformação	Transformação Logarítmica	Transformação Log (X+1)	
Macho-Macho	Aproximação Afastamento Recuo Perseguição Investida Toque Arquear o Corpo Aproximação (rec.) Arquear o Corpo (DT)	Latência Exibição Exibição (DM)	Toque Caudal Posição Relativa Ext. Pélvicas e Gonopódio Arquear o Corpo Toque Bucal Investida (rec.) Toque (rec.) Perseguição (DT e DM) Afastamento (DT e DM)	Toque Caudal (rec.) Exibição (DT)
Macho-Fêmea	Exibição Aproximação Seguir Toque Bucal Ext. Pélvicas e Gonopódio Tentativa de Cópula Toque Arquear o Corpo Exibição (DT e DM) Seguir (DT e DM) Afastamento (DT e DM)	Latência Recuo	Afastamento Sigmóide Investida Toque Caudal Aproximação (rec.) Toque (rec.) Arquear o Corpo (DT e DM)	Toque Caudal (rec.)

Tabela 4. Testes estatísticos para os diferentes comportamentos para o tratamento com hidroxiandrostenediona. (DT - Duração Total; DM - Duração Média; rec. - recebido).

Tipo de Teste	Comparações Planeadas			Kruskal-Wallis
Tipo de Interação	Sem Transformação	Transformação Logarítmica	Transformação Log (X+1)	
Macho-Macho	Aproximação Afastamento Perseguição Investida Ext. Pélvicas e Gonopódio Exibição (DT e DM) Perseguição (DT) Afastamento (DT) Arquear o Corpo (DT e DM) Posição Relativa (DT e DM)	Latência Exibição	Recuo Toque Toque Caudal Posição Relativa Arquear o Corpo Toque Bucal Toque (rec.) Toque Caudal (rec.) Perseguição (DM)	Aproximação (rec.) Investida (rec.) Afastamento (DM)
Macho-Fêmea	Latência Exibição Recuo Seguir Toque Bucal Ext. Pélvicas e Gonopódio Tentativa de Cópula Toque Arquear o Corpo Exibição (DT e DM) Seguir (DT e DM) Arquear o Corpo (DM)	Aproximação	Afastamento Investida Toque Caudal Aproximação (rec.) Toque (rec.) Toque Caudal (rec.) Afastamento (DT e DM) Arquear o Corpo (DT)	Investida (rec.)

No Capítulo dos Resultados as diferenças estatisticamente significativas entre o controlo *versus* 0.5 mg/l e o controlo *versus* 1.0 mg/l encontram-se assinaladas nas figuras, da seguinte forma: \* =  $p < 0.1$ , \*\* =  $p < 0.5$ ; \*\*\* =  $p < 0.01$  e \*\*\*\* =  $p < 0.001$ .

## RESULTADOS

### 1. Tratamento com 11-cetotestosterona

Neste tratamento, e como já foi referido no Capítulo Material e Métodos, efectuaram-se 8 réplicas das séries ( $n = 8$ ), tanto nas interacções macho-macho como nas interacções macho-fêmea.

#### 1.1. Interacções Macho-Macho

Na figura 1 encontram-se os valores das durações das latências e os respectivos desvios padrão para os indivíduos dos diferentes tratamentos (controlo, 0.5 mg/l e 1.0 mg/l de diluição).

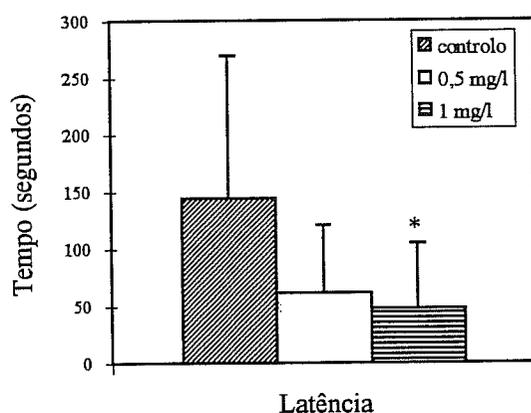


Figura 1. Valores de latência para os diferentes tratamentos.

Os valores das frequências médias (número de actos que ocorreram durante os 15 minutos de cada série) e respectivos desvios padrão dos diferentes comportamentos analisados neste trabalho e iniciados pelo macho residente encontram-se nas figuras 2, 3 e 4.

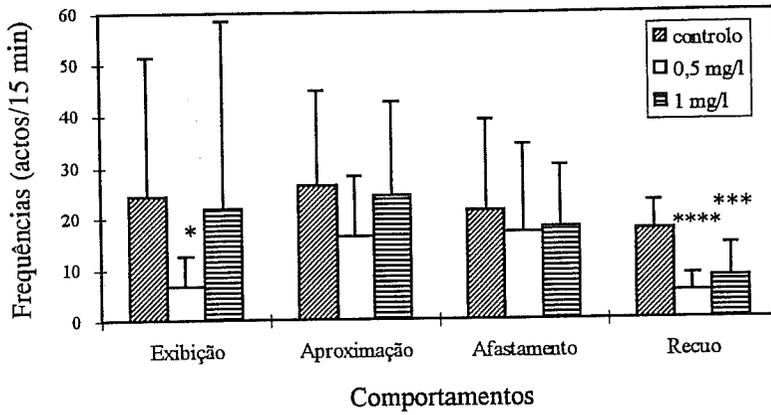


Figura 2. Valores das frequências dos comportamentos exibição, aproximação, afastamento e recuo.

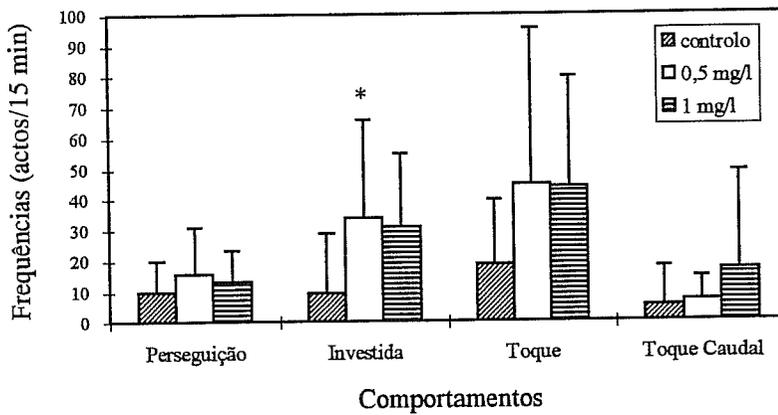


Figura 3. Valores das frequências dos comportamentos perseguição, investida, toque e toque caudal.

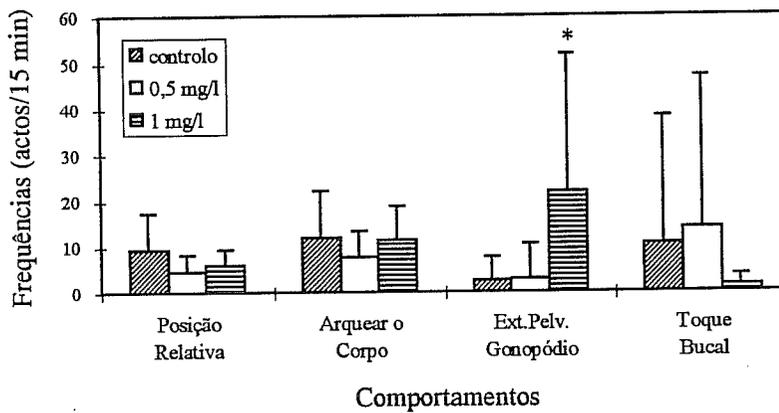


Figura 4. Valores das frequências dos comportamentos posição relativa, arquear o corpo, extensão de pélvicas e gonopódio e toque bucal.

O comportamento de tentativa de cópula apresentou uma frequência média de 1.75 nos indivíduos da diluição 0.5 mg/l e o comportamento de sigmóide 0.875 nos indivíduos da diluição 1.0 mg/l.

Na figura 5 observam-se os valores das frequências médias e respectivos desvios padrão dos diferentes comportamentos iniciados pelo macho intruso (recebidos pelo residente).

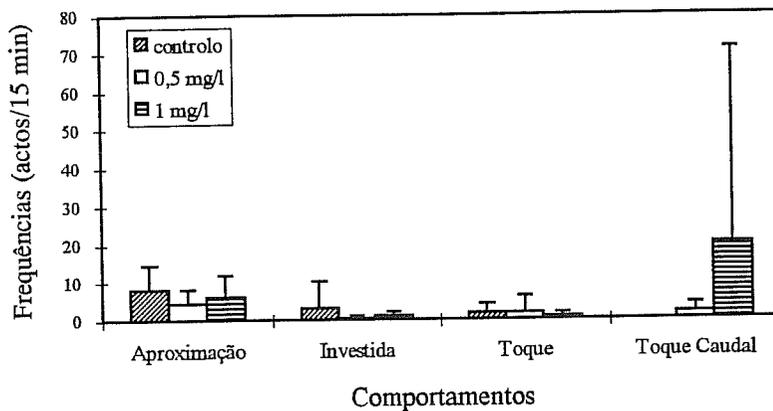


Figura 5. Valores das frequências dos comportamentos aproximação, investida, toque e toque caudal. O comportamento toque caudal apresenta uma significância de  $p < 0.1$  com o teste Kruskal-Wallis.

O comportamento de perseguição iniciado pelo macho intruso só se observou nos indivíduos do controlo e teve uma frequência média de 0.5.

Os valores das durações totais e das durações médias e os respectivos desvios padrão dos comportamentos temporizados encontram-se nas figuras 6, 7a e 7b.

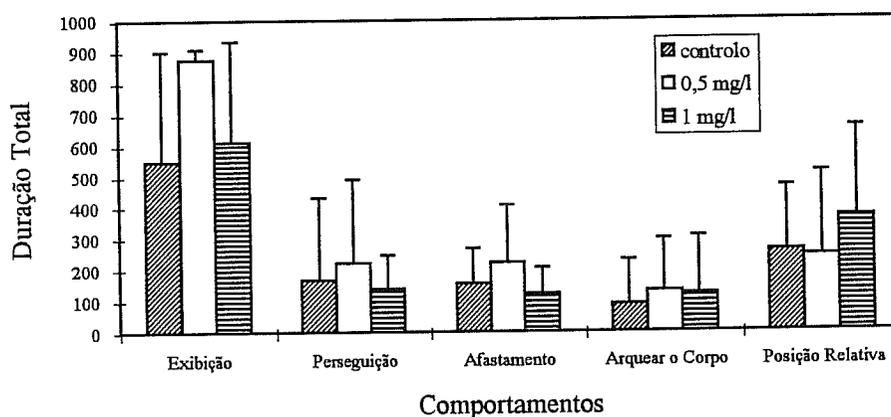


Figura 6. Valores da duração total dos comportamentos exibição, perseguição, afastamento, arquear o corpo e posição relativa. O comportamento exibição apresenta uma significância de  $p < 0.1$  com o teste Kruskal-Wallis.

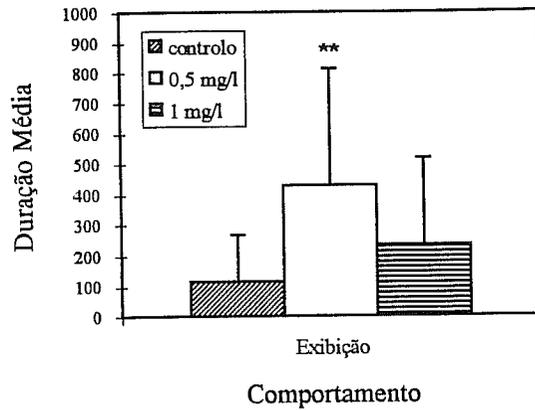


Figura 7a. Valores da duração média do comportamento exibição.

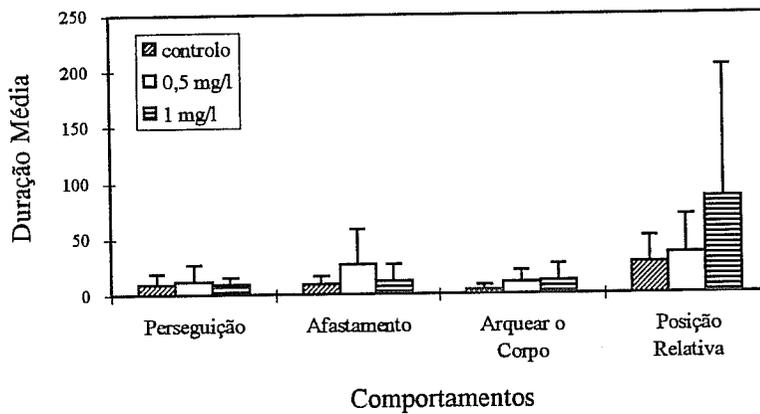


Figura 7b. Valores da duração média dos comportamentos, perseguição, afastamento, arquear o corpo e posição relativa.

## 1.2. Interações Macho-Fêmea

Na figura 8 observam-se os valores das durações das latências e os respectivos desvios padrões para os indivíduos dos diferentes tratamentos.

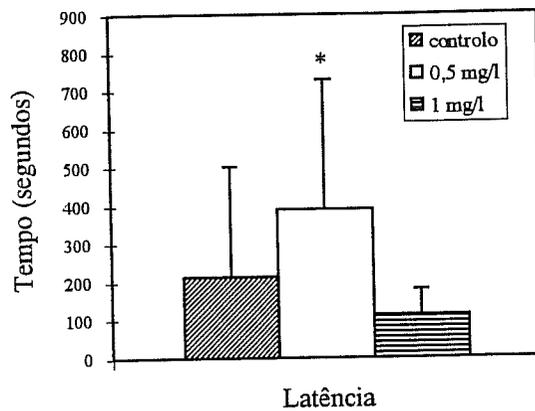


Figura 8. Valores de latência para os diferentes tratamentos.

Nas figuras 9, 10 e 11 encontram-se as frequências médias e os desvios padrão dos diferentes comportamentos realizados pelos machos em relação às fêmeas.

Na figura 12 observam-se os valores das frequências e respectivos desvios padrão dos diferentes comportamentos realizados pelas fêmeas em relação ao macho.

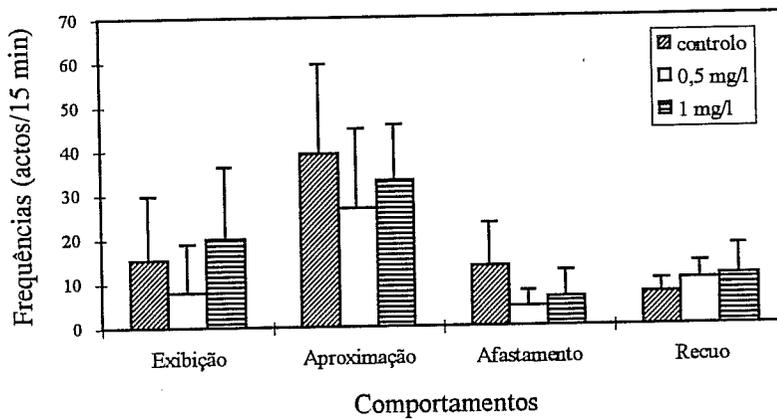


Figura 9. Valores das frequências dos comportamentos exibição, aproximação, afastamento e recuo.

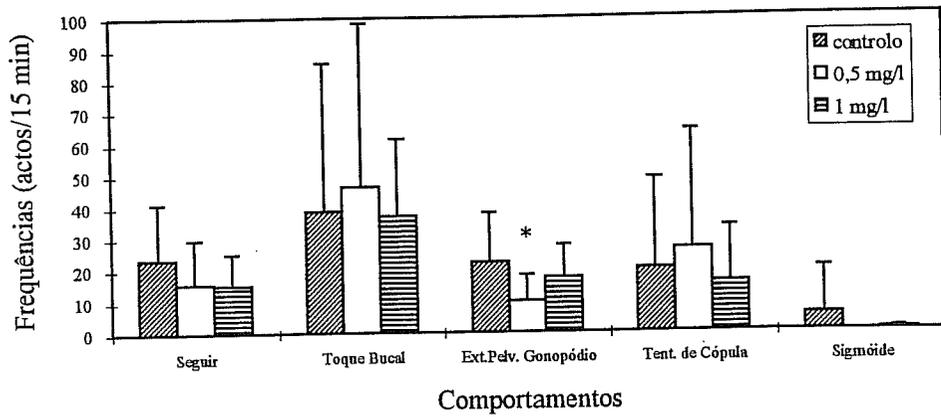


Figura 10. Valores das frequências dos comportamentos seguir, toque bucal, extensão de pélvicas e gonopódio, tentativa de cópula e sigmóide.

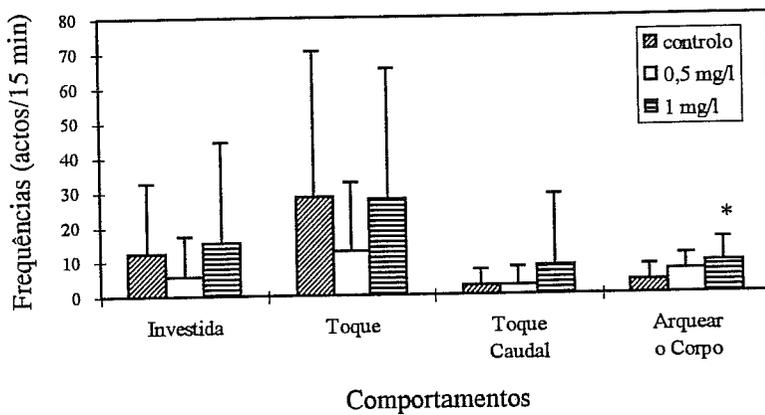


Figura 11. Valores das frequências dos comportamentos investida, toque, toque caudal e arquear o corpo.

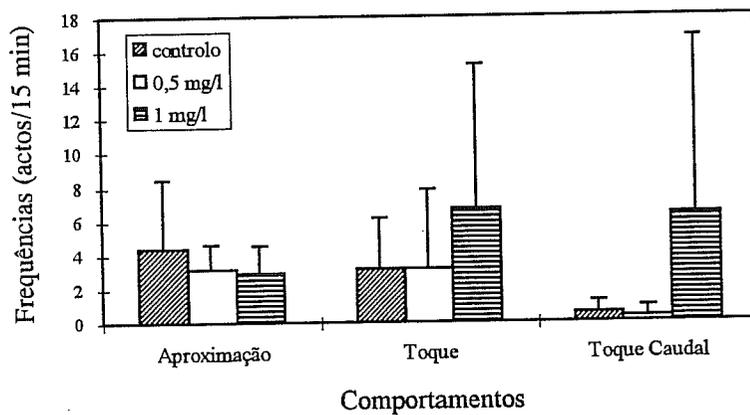


Figura 12. Valores das frequências dos comportamentos aproximação, toque e toque caudal.

Observaram-se outros comportamentos realizados pelas fêmeas em relação aos machos, mas sem grande significado: seguir com uma frequência média de 0.25 e apenas na diluição 1 mg/l; investida com uma frequência média de 2.0 nos indivíduos controlo e por último sigmóide com frequências médias de 0.25 e 4.875 para a diluição de 0.5 mg/l e 1.0 mg/l, respectivamente.

Nas figuras 13, 14a e 14b encontram-se os valores das durações totais e durações médias, respectivamente, bem como os valores de desvio padrão, para os comportamentos em que se procedeu à sua temporização.

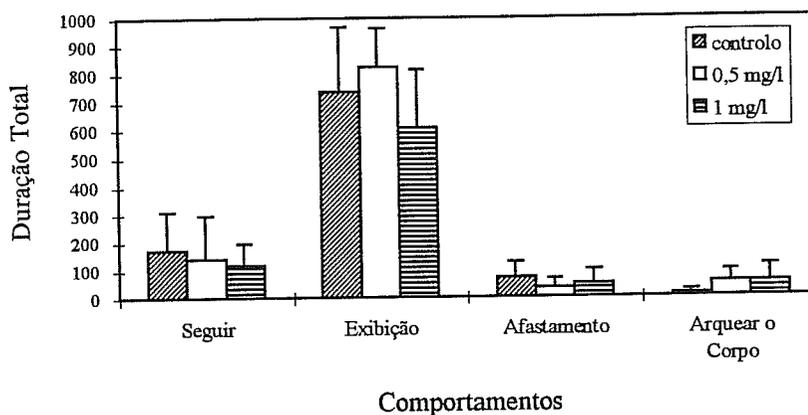


Figura 13. Valores da duração total dos comportamentos seguir, exibição, afastamento e arquear o corpo.

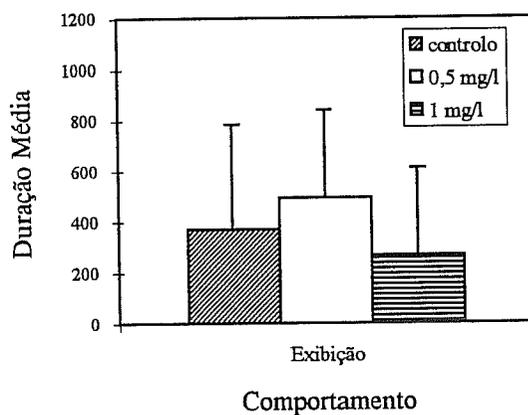


Figura 14a. Valores da duração média do comportamento exibição.

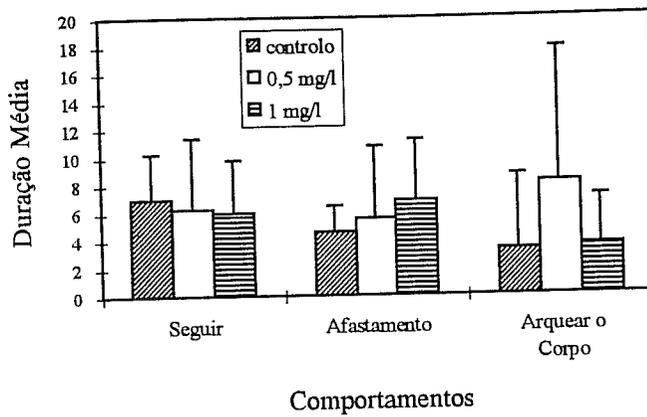


Figura 14b. Valores da duração média dos comportamentos seguir, afastamento e arquear o corpo.

### 1.3. Breve Síntese

Na tabela 5 encontram-se de uma forma resumida os comportamentos cujas diferenças se revelaram estatisticamente significativas, tanto através das comparações planeadas como pelo teste de Kruskal-Wallis.

Tabela 5. Resumo das comparações estatisticamente significativas para o tratamento 11-cetotestosterona.

<i>Tipo de Interação</i>	<i>Comportamentos</i>	<i>Nível de Significância</i>	<i>Comparações</i>
Macho-Macho	Latência	$p < 0.1$	Controlo > Diluição 1.0 mg/l
	Exibição	$p < 0.1$	Controlo > Diluição 0.5 mg/l
	Recuo	$p < 0.01$	Controlo > Diluição 1.0 mg/l
	Recuo	$p < 0.001$	Controlo > Diluição 0.5 mg/l
	Investida	$p < 0.1$	Controlo < Diluição 0.5 mg/l
	Extensão Pélvicas e Gonopódio	$p < 0.1$	Controlo < Diluição 1.0 mg/l
	Toque Caudal (recebido)	$p < 0.1$	Kruskal-Wallis
	Duração Total da Exibição	$p < 0.1$	Kruskal-Wallis
	Duração Média da Exibição	$p < 0.05$	Controlo < Diluição 0.5 mg/l
Macho-Fêmea	Latência	$p < 0.1$	Controlo < Diluição 0.5 mg/l
	Extensão Pélvicas e Gonopódio	$p < 0.1$	Controlo > Diluição 0.5 mg/l
	Arquear o Corpo	$p < 0.1$	Controlo < Diluição 1.0 mg/l

## 2. Tratamento com hidroxandrostenediona

Para este tratamento o número de réplicas de séries para as interações macho-macho e macho-fêmea foi de 12 ( $n = 12$ ).

### 2.1. Interações Macho-Macho

Na figura 15 observam-se os valores das latências e respectivos desvios padrão para os indivíduos dos diferentes tratamentos.

Nas figuras 16, 17 e 18 encontram-se as frequências médias e os desvios padrão dos diferentes comportamentos iniciados pelo macho residente.

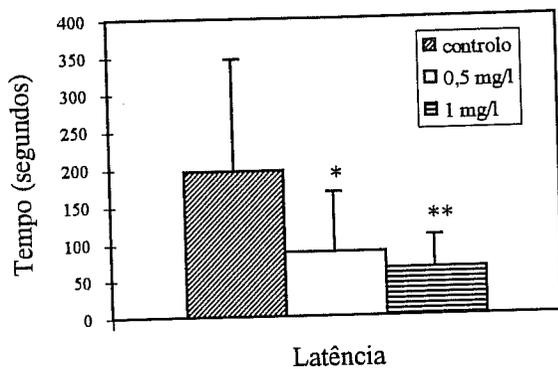


Figura 15. Valores de latência para os diferentes tratamentos.

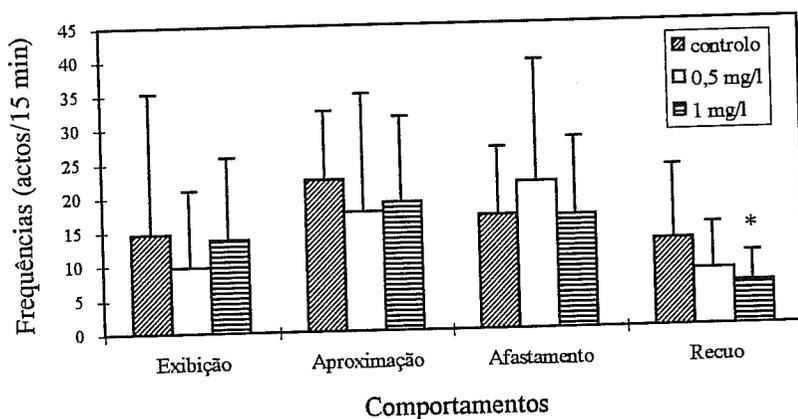


Figura 16. Valores das frequências dos comportamentos exibição, aproximação, afastamento e recuo.

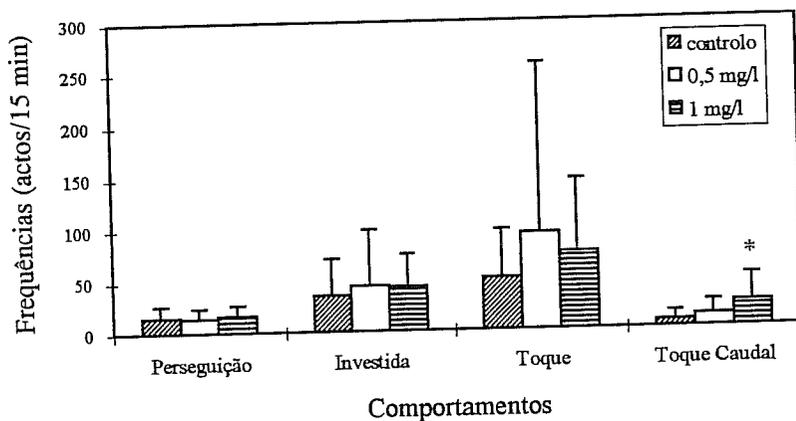


Figura 17. Valores das frequências dos comportamentos perseguição, investida, toque e toque caudal.

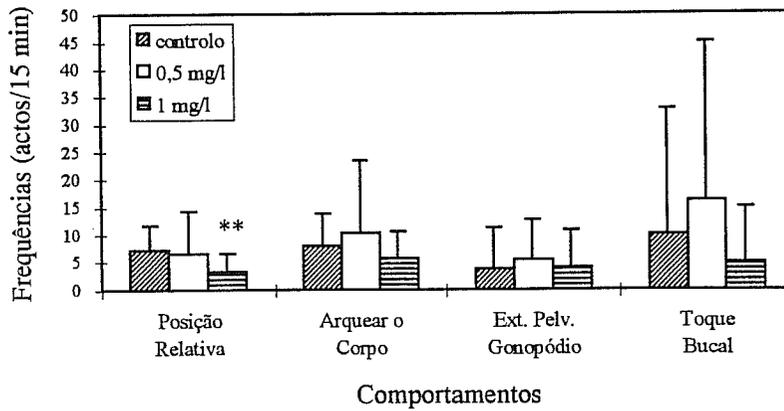


Figura 18. Valores das frequências dos comportamentos posição relativa, arquear o corpo, extensão de pélvicas e gonopódio e toque bucal.

O comportamento tentativa de cópula apresentou uma frequência média de 2.412 e 0.25 para os indivíduos da diluição 0.5 mg/l e 1.0 mg/l, respectivamente. Observou-se para o comportamento de sigmóide uma frequência média de 0.667 e 0.25 para os indivíduos controle e da diluição 0.5 mg/l, respectivamente.

Os valores das frequências médias e desvios padrão dos diferentes comportamentos iniciados pelo macho intruso (recebidos pelo residente) apresentam-se na figura 19.

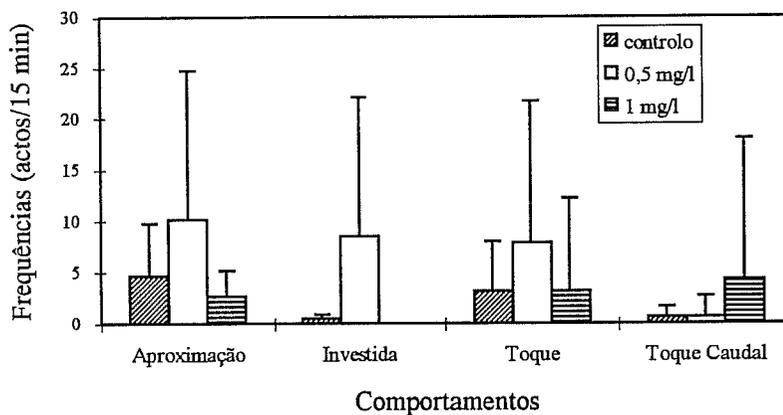


Figura 19. Valores das frequências dos comportamentos aproximação, investida, toque e toque caudal. O comportamento investida apresenta uma significância de  $p < 0.5$  com o teste Kruskal-Wallis.

O comportamento de perseguição iniciado pelo macho intruso teve uma frequência média de 1.333 e 0.417, respectivamente para os indivíduos de diluição 0.5 mg/l e 1.0 mg/l.

Nas figuras 20, 21a e 21b observam-se, respectivamente, os valores das durações totais e durações médias, bem como os desvios padrão, para os comportamentos em que se procedeu à sua temporização.

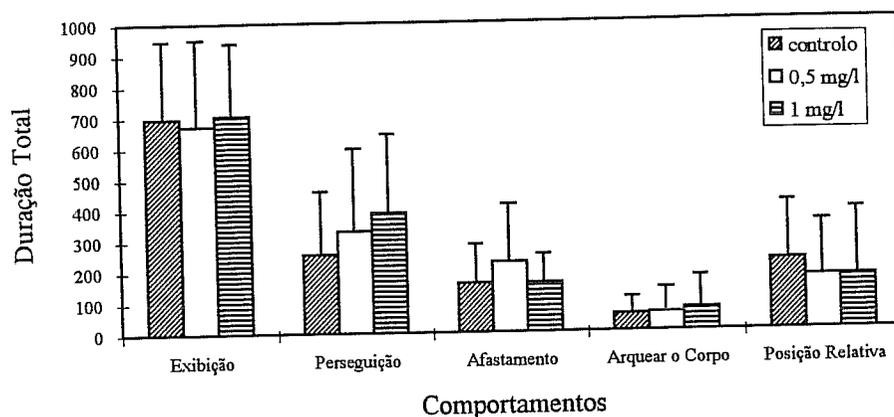


Figura 20. Valores da duração total dos comportamentos exibição, perseguição, afastamento, arquear o corpo e posição relativa.

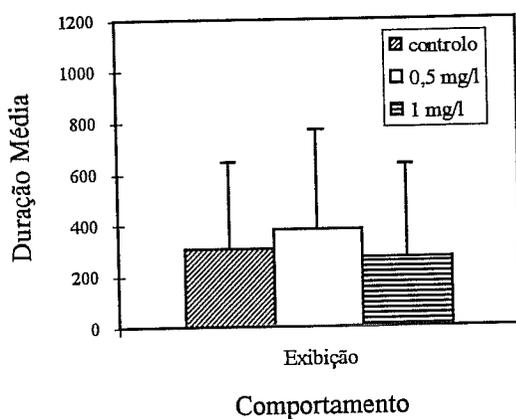


Figura 21a. Valores da duração média do comportamento exibição.

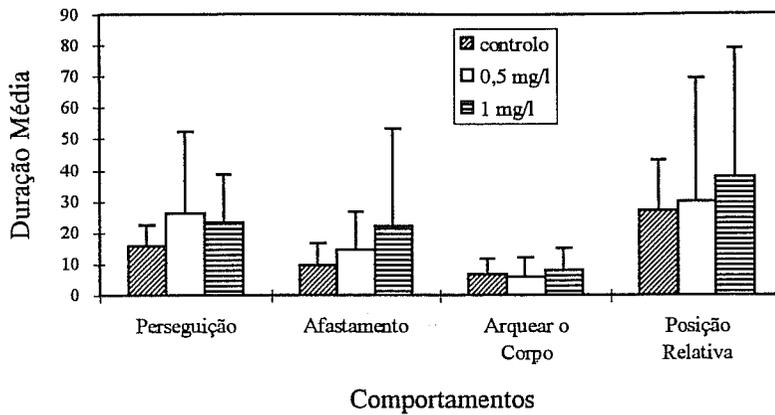


Figura 21b. Valores da duração média dos comportamentos perseguição, afastamento, arquear o corpo e posição relativa.

## 2.2. Interações Macho-Fêmea

Os valores das durações das latências e desvios padrão para os indivíduos dos diferentes tratamentos encontram-se na figura 22.

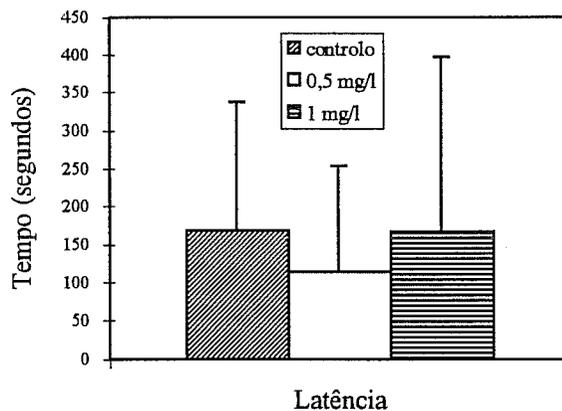


Figura 22. Valores de latência para os diferentes tratamentos.

Nas figuras 23, 24 e 25 observam-se as frequências médias e os desvios padrão dos diferentes comportamentos realizados pelos machos em relação às fêmeas.

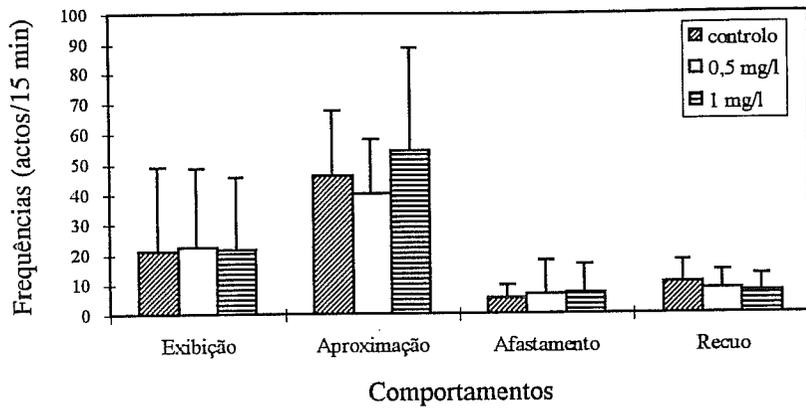


Figura 23. Valores das frequências dos comportamentos exibição, aproximação, afastamento e recuo.

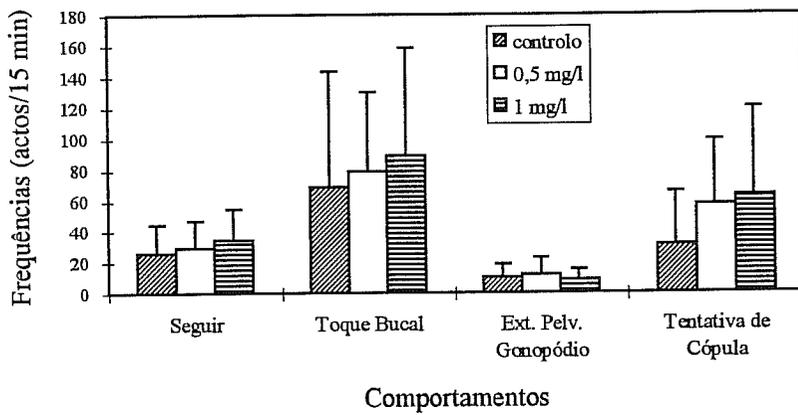


Figura 24. Valores das frequências dos comportamentos seguir, toque bucal, extensão de pêlvicas e gonopódio e tentativa de cópula.

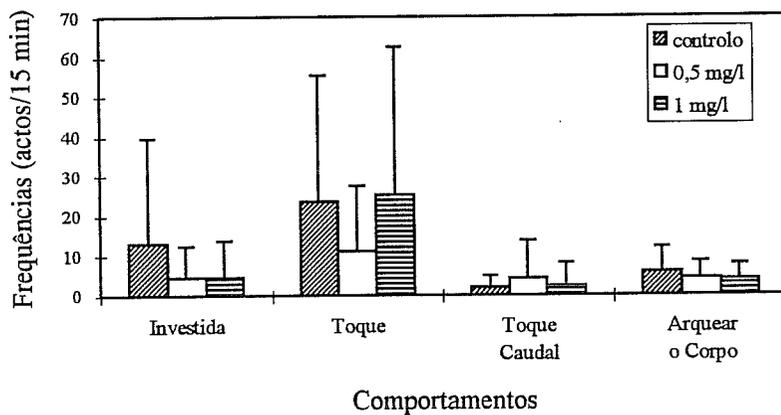


Figura 25. Valores das frequências dos comportamentos investida, toque, toque caudal e arquear o corpo.

O comportamento sigmóide apresentou uma frequência média de 1, 1.25 e 2.583 para o controlo, diluição de 0.5 mg/l e diluição de 1.0 mg/l, respectivamente.

Na figura 26 observam-se os valores das frequências médias e respectivos desvios padrão dos diferentes comportamentos realizados pelas fêmeas em relação aos machos.

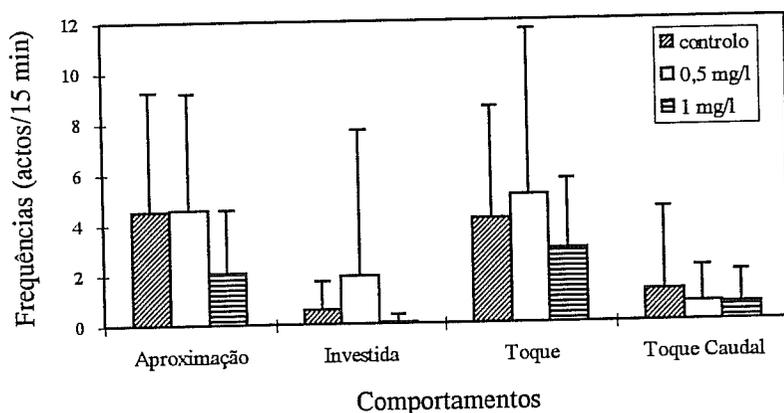


Figura 26. Valores das frequências dos comportamentos aproximação, investida, toque e toque caudal.

Os valores das durações totais e durações médias e os valores de desvio padrão, para os comportamentos temporizados encontram-se, respectivamente, nas figuras 27, 28a e 28b.

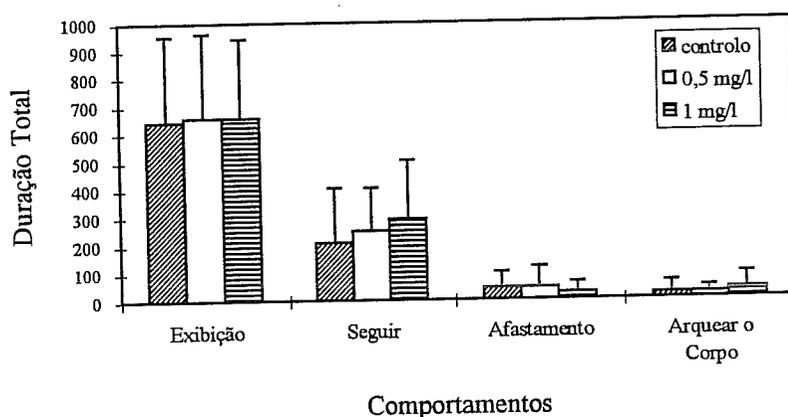


Figura 27. Valores da duração total dos comportamentos exibição, seguir, afastamento e arquear o corpo.

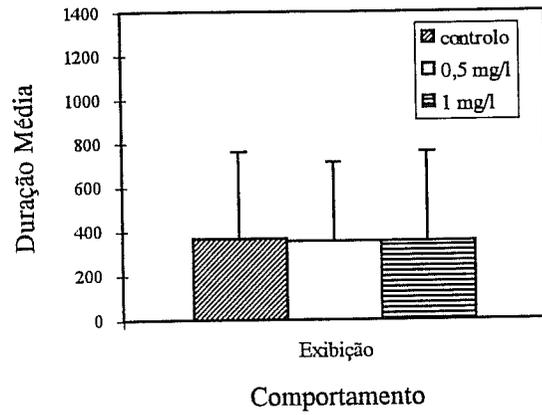


Figura 28a. Valores da duração média do comportamento exibição.

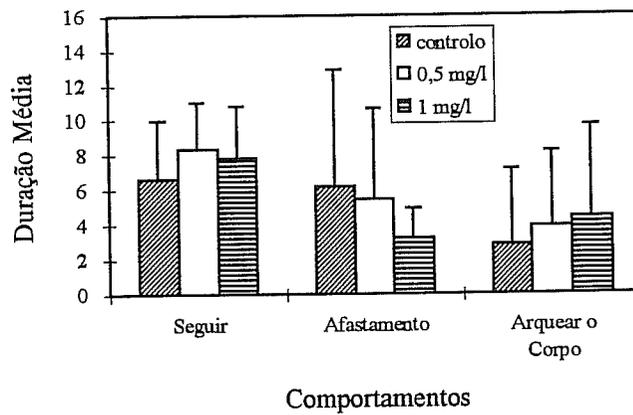


Figura 28b. Valores da duração média dos comportamentos seguir, afastamento e arquear o corpo.

### 2.3. Breve Síntese

Na tabela 6 apresentam-se, de uma forma resumida, os comportamentos cujas diferenças se revelaram estatisticamente significativas, tanto através das comparações planeadas como pelo teste de Kruskal-Wallis.

Tabela 6. Resumo das comparações estatisticamente significativas para o tratamento hidroxianrostenediona.

<i>Tipo de Interação</i>	<i>Comportamentos</i>	<i>Nível de Significância</i>	<i>Comparações</i>
Macho-Macho	Latência	$p < 0.1$	Controlo > Diluição 0.5 mg/l
	Latência	$p < 0.05$	Controlo > Diluição 1.0 mg/l
	Recuo	$p < 0.1$	Controlo > Diluição 1.0 mg/l
	Toque Caudal	$p < 0.1$	Controlo < Diluição 1.0 mg/l
	Posição Relativa	$p < 0.05$	Controlo > Diluição 1.0 mg/l
	Investida (recebida)	$p < 0.05$	Kruskal-Wallis

## DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho revelaram que tanto para o tratamento com a 11-cetotestosterona como para o tratamento com hidroxandrostenediona os machos tratados apresentam uma latência inferior à dos machos controlo, nas interações macho-macho, sendo as diferenças estatisticamente significativas (ver tabela 5 e 6 do Capítulo Resultados). Tal facto, indica uma maior predisposição dos machos tratados para iniciarem as interações macho-macho.

Para o tratamento com a 11-cetotestosterona as frequências dos comportamentos exibição, aproximação, afastamento, recuo, posição relativa, arquear o corpo, aproximação recebida e investida recebida são mais baixas nos machos tratados, com o mínimo para os machos de 0.5 mg/l. As diferenças revelaram-se estatisticamente significativas apenas para os comportamentos exibição e recuo (ver tabela 5 do Capítulo Resultados).

Pelo contrário, as frequências dos comportamentos perseguição, investida e toque, bem como as durações totais dos comportamentos exibição, perseguição, afastamento e arquear o corpo e as durações médias dos comportamentos exibição e afastamento revelaram-se mais elevadas nos machos tratados que nos machos controlo com o máximo para os indivíduos de 0.5 mg/l. As diferenças foram estatisticamente significativas apenas para os comportamentos investida e duração total e média da exibição (ver tabela 5 do Capítulo Resultados).

Também, as frequências dos comportamentos toque caudal, extensão de pélvicas e gonopódio, toque caudal recebido pelo macho residente e duração média da posição relativa se revelaram mais elevadas nos machos tratados do que no controlo, mas nestes casos com o máximo para os indivíduos de 1.0 mg/l. Os comportamentos extensão de pélvicas e gonopódio e toque caudal recebido revelaram diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0.1$ , para ambos).

Verifica-se assim, que os machos tratados com a 11-cetotestosterona além de apresentarem uma maior predisposição para iniciarem as interações macho-macho (como os machos tratados com hidroxandrostenediona) também manifestam com maior frequência os comportamentos caracteristicamente agonísticos. De facto estes comportamentos são considerados como característicos de interações agonísticas em outros Poecíledeos (e.g. *Poeciliopsis occidentalis* (Constantz, 1975); *Poecilia velifera* (Bildsoe, 1988)), em que os

dominantes perseguem durante mais tempo e fazem mais toques (Beaugraud *et al.*, 1984; Bildsoe, 1988). Embora o comportamento extensão de pélvicas e gonopódio seja essencialmente sexual (Bildsoe, 1988) também se manifesta em interacções agonísticas, tal como tem sido referido para outros Poecilídeos, como por exemplo, *Xiphophorus maculatus* e *X. helleri* (Clark *et al.*, 1954).

Em relação ao tratamento com hidroxiandrostenediona e nas interacções macho-macho, as frequências dos comportamentos recuo e posição relativa apresentam valores máximos nos indivíduos controlo e mínimos nos indivíduos tratados com 1.0 mg/l, sendo para ambos as diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0.1$  e  $p < 0.5$ , respectivamente).

Pelo contrário, as frequências dos comportamentos toque caudal e investida recebida apresentam-se com valores mínimos nos indivíduos controlo e máximos nos indivíduos tratados com 1.0 mg/l, sendo as diferenças estatisticamente significativas, respectivamente  $p < 0.1$  e  $p < 0.5$ .

No entanto, as diferenças encontradas não permitem concluir que haja uma clara distinção entre os indivíduos tratados com hidroxiandrostenediona e os não tratados nos comportamentos caracteristicamente agonísticos.

A motivação para o comportamento agonístico e sexual depende não só de causas externas mas também do estado interno, especialmente dos níveis hormonais (Colgan, 1986), existindo numerosos exemplos que ilustram os vários aspectos da relação entre as hormonas e o comportamento (Liley, 1969). Segundo Brain (1981) as diferentes hormonas (ou os seus metabolitos) podem estar implicadas na modulação da agressão em diferentes tipos de ataque nas diferentes espécies.

Em muitos machos de Vertebrados, o comportamento agressivo é influenciado por mudanças nos níveis circulantes de androgénio (Moore, 1988). A pesquisa nos mamíferos sugere que o eixo pituitária-gónadas está envolvido no comportamento agressivo, especialmente quando o comportamento está associado com a reprodução (Villars, 1983). No entanto, comparado com os mamíferos, existe pouca informação disponível referente aos factores hormonais envolvidos na regulação do comportamento agressivo dos peixes (Villars, 1983). Todavia, certos dados indicam que tais influências são semelhantes às dos mamíferos e aves. Mas, até para os dados sobre mamíferos e aves permanece por esclarecer se as mudanças hormonais afectam a reacção agressiva e/ou sexual ou são apenas produtos sem consequências biológicas.

Até à data, os estudos experimentais não permitiram a identificação, com alguma certeza, do esteróide "natural" das gónadas que se encontra mais directamente envolvido na regulação do comportamento de peixes não manipulados (Liley & Stacey, 1983). Mas a vasta pesquisa com os Teleósteos explorando os factores hormonais envolvidos na agressão focou-se no sistema pituitária-gónadas e até agora existe apenas evidência limitada que as hormonas das gónadas estão directamente envolvidas no comportamento agressivo das espécies estudadas (Villars, 1983). Por exemplo, em algumas espécies de Teleósteos com comportamento agressivo típico, as hormonas das gónadas são factores importantes (Higby *et al.*, 1991). Por exemplo, os androgénios podem afectar directamente a frequência de comportamentos agressivos em alguns Ciclídeos e Anabantídeos (Villars, 1983).

Segundo Liley & Stracey (1983), o comportamento agressivo não-reprodutor parece ser independente do controle das gónadas, existindo poucos dados experimentais que apoiem a ideia de que a pituitária se encontra directamente envolvida na causalidade do comportamento agressivo.

Infelizmente, no presente muito pouco é conhecido acerca dos efeitos dos androgénios no comportamento agressivo dos peixes e em particular nos Poecílideos. Hannes *et al.* (1984) verificaram que em *Xiphophorus helleri* existem mudanças nas concentrações de androgénio, quer no sangue quer em todo o corpo, como resultado da actividade de combate.

Neste trabalho verificou-se, como já foi referido, que a 11-cetotestosterona aumentou de uma forma estatisticamente significativa a frequência dos comportamentos agonísticos.

Em relação à via da aromatização verifica-se, por exemplo, que em *Gasterosteus aculeatus*, ao nível do cérebro, ocorre a conversão de androstenediona em testosterona e nos estrogéneos estrona e estradiol, o que está de acordo com o que se tem verificado noutros Teleósteos (Borg & Mayer 1995). Por exemplo, os homogeneizados do cérebro de *Salmo salar* convertem androstenediona em testosterona, estrona e 17 $\beta$ -estradiol (Andersson *et al.*, 1988). No entanto, não é claro se o estradiol tem um efeito inibidor directo no comportamento agonístico (então nesse caso, o ratio testosterona:estradiol pode ser mais importante do que os níveis absolutos das hormonas individuais na regulação do comportamento) ou se afecta a agressão indirectamente, inibindo a secreção de gonadotrofina pituitária e por isso a testosterona das gónadas, através de retroacção negativa (Munro & Pitcher, 1985).

Munro & Pitcher (1985) verificaram que em *Aequidens pulcher* (Ciclídeo) o estradiol inibe a agressão já que reduz a frequência total dos encontros agonísticos.

No presente trabalho, a inibição da enzima aromatase, com a previsível diminuição da conversão em estradiol não provocou quaisquer diferenças significativas nas frequências médias dos comportamentos agonísticos dos machos tratados em relação aos controlo.

Podendo-se concluir que neste caso a inibição da produção do estradiol não é relevante, em relação aos comportamentos agonísticos. Estes dados indicam portanto, que para esta espécie, a 11-cetotestosterona é um dos esteróides que influencia os comportamentos agonísticos.

Em relação aos esteróides sexuais dos Poecílideos os dados não se revelam coerentes.

Nos testículos de *Poecilia latipinna*,  $3\alpha$  e  $3\beta$ -hidroxi- $5\beta$ -produtos foram os principais metabolitos *in vitro* de testosterona e no plasma a 11-cetotestosterona não foi detectada, enquanto os níveis de testosterona e  $11\beta$ -hidroxitestosterona raramente excederam  $1 \text{ ngml}^{-1}$  e não se apresentam correlacionados com o peso das gónadas, sugerindo que os metabolitos reduzidos podem ter um maior papel que o androgénio clássico (Kime, 1993).

van den Hurk & Lambert (1977) identificaram em *Poecilia latipinna* a 11-cetotestosterona,  $11\beta$ -hidroxiandrostenediona e androstenediona como metabolitos de androstenediona, no entanto, as concentrações eram muito baixas, sendo os principais metabolitos a testosterona e a androstenediona (60%). Estes dois compostos, no entanto, não foram identificados de forma rigorosa e podem ter sido confundidos com metabolitos  $5\beta$  uma vez que possuem a mesma polaridade (Kime & Groves, 1986).

Por outro lado, Kime & Groves (1986) incubaram testículos de *Poecilia latipinna* com triturados de testosterona e descobriram que não havia compostos 11-oxigenados excepto possivelmente  $5\beta$ -androstane- $3\beta, 11\beta, 17\beta$ -triol. Todos os metabolitos identificados eram  $5\beta$ -reduzidos livres ou esteróides conjugados. Ainda segundo estes autores, nesta espécie, nos machos, os esteróides reduzidos poderão desempenhar o papel normalmente associado com a testosterona e os seus derivados 11-oxigenados. De facto, os resultados obtidos com *Poecilia latipinna* confirmaram dados recentes que indicavam que as hormonas esteróides, frequentemente consideradas como características dos machos de teleósteos, como a testosterona e os seus derivados 11-oxigenados, poderão não se encontrar presentes em todas as classes de Vertebrados (Borg, 1994). Os androgénios  $5\beta$ -reduzidos, que nesta

experiência foram os principais metabolitos encontrados, também foram isolados noutras espécies de teleósteos (Kime & Groves, 1986).

Zentel (1988 *in* Kime & Groves, 1986) no entanto, detectou 11-cetotestosterona no soro do macho de *Poecilia velifera* usando RIA. Em juvenis de mollys e de guppies a 11-cetotestosterona, via água, estimulou a espermatogénese.

A possível ausência de 11-androgénios nos Poecilídeos revela-se importante uma vez que muitos peixes de aquário populares estão nesta família, a qual, por esta razão, tem sido extensivamente usada em experiências funcionais com androgénios (Borg, 1994), como foi o caso deste trabalho.

Nas interações macho-fêmea e no tratamento com a 11-cetotestosterona os indivíduos tratados com 0.5 mg/l apresentam valores de latência estatisticamente superiores aos do controlo ( $p < 0.1$ ), o que pode indicar uma menor predisposição para iniciarem a interacção.

Além disso e para o mesmo tratamento as frequências dos comportamentos aproximação, afastamento, extensão de pélvicas e gonopódio e toque apresentam valores máximos para os indivíduos do controlo e mínimos para os indivíduos tratados a 0.5 mg/l. No entanto, apenas para a frequência do comportamento extensão de pélvicas e gonopódio a diferença se revelou estatisticamente significativa ( $p < 0.1$ ).

Por outro lado, a frequência do comportamento arquear o corpo é maior nos machos tratados que no controlo, sendo a diferença estatisticamente significativa ( $p < 0.1$ ) entre os indivíduos do controlo e os indivíduos tratados com 1.0 mg/l.

Nas interações macho-fêmea e para o tratamento com hidroxiandrostenediona não se revelaram quaisquer diferenças significativas, entre os indivíduos controlo e os indivíduos tratados (tanto 0.5 mg/l como 1.0 mg/l), para os diferentes comportamentos estudados, neste trabalho. Tal facto indica que a hidroxiandrostenediona não influencia de forma significativa os comportamentos considerados caracteristicamente como sexuais.

A correlação que existe entre os ciclos das gónadas, os níveis de esteróides das gónadas e o aparecimento de comportamento reprodutor, sugere que as hormonas das gónadas deverão desempenhar uma função causal fundamental, no aparecimento e desenvolvimento do comportamento reprodutor. No entanto, e por exemplo para o caso dos

mamíferos e das aves, um assunto complicado e para o qual ainda não se obteve uma resposta clara no presente é qual o(s) metabolito(s) da testosterona que são activos no cérebro para activar o comportamento? Em todas as espécies de aves examinadas, tanto os metabolitos do androgénio como do estrogénio parecem desempenhar um papel na activação do comportamento sexual do macho, mas a importância relativa dos metabolitos de androgénio e de estrogénio varia de espécie para espécie. Em algumas espécies os androgénios desencadeiam alguns comportamentos, os estrogénios desencadeiam outros e são necessárias ambas as classes de hormonas para se desencadear o repertório normal dos comportamentos de corte nos machos (Harding, 1983).

Estudos realizados em machos de várias espécies de Teleósteos demonstraram que existe uma forte correlação entre o ciclo e o comportamento reprodutor e as quantidades de androgénios no plasma ou a nível testicular: um aumento relativamente brusco nos androgénios coincide com a espermatogénese e portanto, provavelmente com a rapidez de resposta comportamental (comportamento reprodutor) (Liley & Stacey, 1983; Pankhurst & Barnett, 1993).

Nos peixes, níveis elevados de esteróides das gónadas encontram-se em associação com o comportamento de desova ou corte e posse e protecção de territórios reprodutores (Pankhurst & Barnett, 1993), existindo uma correlação entre o aumento de 11-cetotestosterona e o desenvolvimento sexual (Edler *et al.*, 1971).

No geral, os estudos mostram que durante a época da desova os machos adultos reprodutores têm os níveis de gonadotrofinas, 11-cetotestosterona e testosterona mais elevados (Billard, 1982; Kindler *et al.*, 1989). É provável que a mais elevada produção de androgénio nos machos reprodutores do que nos não reprodutores seja devida a diferenças na secreção gonadotrófica. Ultraestruturalmente, as células gonadotróficas parecem ser mais eficazes nos machos reprodutores (Borg *et al.*, 1989). Por outro lado, a baixa produção de androgénios nos machos após a reprodução está de acordo com a ausência de caracteres sexuais secundários (Borg *et al.*, 1989).

Além disso, os estudos em que os peixes foram tratados com androgénios exógenos, sugerem que as hormonas estarão habitualmente envolvidas na estimulação e/ou manutenção do comportamento reprodutor (Liley & Stacey, 1983; Pankhurst & Barnett, 1993). Neste aspecto, os peixes macho são semelhantes a outros Vertebrados onde existe evidência de acção de hormonas como moduladoras do comportamento reprodutor nos anfíbios, répteis, aves e mamíferos. Porém, devido ao pequeno número de estudos sobre peixes é menos claro

quais os papéis que as hormonas desempenham em eventos comportamentais na reprodução dos peixes (Pankhurst & Barnett, 1993). No entanto, embora os estudos sejam poucos, eles indicam que os 11-androgénios são mais eficientes do que os outros androgénios na estimulação do comportamento reprodutor nos machos de Teleósteos. Isto é de alguma maneira surpreendente considerando que os 11-androgénios são não aromatizáveis e que nos mamíferos a aromatização é muitas vezes de importância crítica para os efeitos dos androgénios no comportamento reprodutor (Borg, 1994).

De facto, os níveis no plasma descobertos em várias investigações indicam um papel importante dos 11-cetoandrogénios sugerindo que a 11-cetotestosterona e a 11-cetoandrostenediona (um precursor da 11-cetotestosterona) são os androgénios mais importantes (Mayer *et al.*, 1990b). Em *Gasterosteus aculeatus* e em *Lepomis macrochirus* os 11-cetoandrogénios são mais eficazes que a testosterona (Idler *et al.*, 1976; Mayer *et al.*, 1994). Em experiências de campo, Kindler *et al.* (1991) mostraram que 11-cetotestosterona tinha um maior efeito do que testosterona em desencadear o comportamento de pré-desova em machos com ninho (*L. macrochirus*) (Saino & Møller, 1995). Contudo, Idler *et al.* (1976) mostraram que em algumas espécies de Perciformes (*Serranus cabrilla*, *Diplodus sarga*, *Pagellus acarne* e *P. erythrinus*) a 11 $\beta$ -hidroxitestosterona que é um possível precursor de 11-cetotestosterona pode estar presente em concentrações significativas enquanto 11-cetotestosterona não é detectável (Leitz & Reinboth, 1985; Kime, 1993). Em estudos realizados com *Salmo salar* e com outras espécies de peixes, verificou-se que a 11-cetotestosterona é o esteróide testicular mais directamente associado com o início da actividade reprodutora (Edler *et al.*, 1971; Colombo & Belvedere, 1976; Liley & Stacey, 1983; Billard *et al.*, 1982 *in* Ueda *et al.*, 1984). Uma série de outros investigadores sugerem que a 11-cetotestosterona poderá ser o androgénio mais potente na indução de características sexuais morfológicas (Idler *et al.*, 1961; Arai, 1967 *in* Liley & Stacey, 1983).

Por outro lado, a 11-cetoandrostenediona tem sido identificada em incubações de testículos de muitos Teleósteos, mas não em todos. Contudo, é apenas em *Gasterosteus aculeatus* que parece ser o principal androgénio formado pelos testículos e, nesta espécie foram encontrados efeitos de estimulação da 11-cetoandrostenediona no comportamento reprodutor (Andersson *et al.*, 1988). A 11-cetotestosterona, o único produto identificado, formado da 11-cetoandrostenediona, estava presente em pequenas quantidades. Por outro lado, os machos apanhados na época de reprodução tinham níveis mais elevados no plasma de 11-cetotestosterona do que de 11-cetoandrostenediona (Borg *et al.*, 1989; Mayer *et al.*, 1990b). Os níveis de 11-cetotestosterona estabelecem uma relação próxima com o

desenvolvimento das características sexuais secundárias e o comportamento reprodutor do macho (Mayer *et al.*, 1990a).

Sabe-se que o desenvolvimento de características sexuais secundárias, encontra-se sob controlo endócrino. Em geral, características como a coloração nupcial, são temporárias e só aparecem durante o período reprodutor. No entanto, certas componentes estruturais são permanentes, ficando completamente desenvolvidas quando a maturidade é atingida. Estas permanecem como características sexualmente dimórficas, mesmo nos peixes fora do período reprodutor (exemplo: o gonopódio dos Poecilídeos) (Liley & Stacey, 1983).

Numerosas investigações têm demonstrado a eficiência dos androgénios exógenos no desenvolvimento de características sexuais secundárias, e no aparecimento de comportamento reprodutivo masculino em machos intactos ou castrados, juvenis e fêmeas. Estes resultados deixam poucas dúvidas quanto ao papel fundamental que os androgénios têm na manutenção de todos os aspectos do comportamento reprodutor do macho (Liley & Stacey, 1983).

Em *Fudulus heterochitus* parece muito provável que os níveis elevados de 11-cetotestosterona, no soro, nos machos parentais estejam associados com o desenvolvimento de caracteres sexuais secundários e comportamentos parentais específicos, tais como formação de colónias, construção do ninho e/ou corte das fêmeas (Kindler *et al.*, 1989).

Verifica-se também um efeito negativo da castração nos caracteres sexuais secundários (que são sazonais) e no comportamento reprodutor (Borg, 1985). Chizinsky mostrou que em *Xiphophorus maculatus* existia uma menor actividade sexual nos machos castrados do que nos outros machos, mas a actividade sexual não se tornou totalmente extinta após a castração (Hammes *et al.*, 1984).

De facto, em todas as espécies estudadas a castração reduz drasticamente os níveis no plasma de testosterona e 11-cetotestosterona (Cardwell & Liley, 1991), embora não desaparecem completamente. No entanto, alguns passos da síntese de 11-cetotestosterona podem acontecer extratesticularmente. Por exemplo, a conversão de 11-cetoandrostenediona em 11-cetotestosterona pode ocorrer no sangue (Borg, 1994).

Além disso, os resultados das experiências de castração/substituição confirmaram a importância de 11-cetotestosterona enquanto os outros androgénios aparecem menos críticos. Em *Gasterosteus aculeatus*, por exemplo, a castração baixa os níveis de 11-

cetotestosterona no plasma, enquanto os implantes de 11-cetoandrostenediona resultaram na elevação dos níveis de 11-cetotestosterona. Por outro lado, a ineficácia da 11-cetoandrostenediona no comportamento reprodutor de algumas espécies está em contraste com a alta eficácia da cápsulas de 11-cetoandrostenediona em repor todos os aspectos do comportamento reprodutor masculino em machos castrados de *Gasterosteus aculeatus* (Mayer *et al.*, 1994).

Os Poecílideos têm sido usados em numerosos estudos nos quais a atenção foi centrada nos efeitos das hormonas esteróides nos caracteres sexuais morfologicamente secundários e na determinação do sexo (Liley, 1983), estando bem estabelecido que o tratamento de fêmeas com androgénios induz o desenvolvimento do gonopódio e da coloração característica dos machos (Schreck, 1974 *in* Liley & Stacey, 1983).

Por outro lado, a testosterona pode ser transformada em estrogénios quer directamente ou via transformação em androstenediona e estrona, a qual é subsequentemente convertida em estradiol. O estradiol só ou em combinação com 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona é um componente muito activo o qual desencadeia o comportamento sexual masculino em aves e mamíferos (Balthazart & Schumacher, 1983). Por exemplo, o comportamento copulatório nos ratos castrados pode ser activado quer por testosterona quer por estradiol (Callard, 1982) e nos pássaros o estradiol é capaz de desencadear o comportamento sexual do macho (Massa *et al.*, 1983). Assim, há um efeito estimulador no comportamento reprodutor por parte dos androgénios aromatizáveis (Dorner, 1983; Borg, 1985).

Deste modo, o processo de aromatização parece estar criticamente envolvido na indução por testosterona do comportamento do sexo masculino e por exemplo, numerosas experiências têm mostrado que a injeção do inibidor da aromatase "androstatrienedione" em machos castrados previne a activação do comportamento copulatório enquanto este mesmo inibidor tem pouco ou nenhum efeito nos machos castrados tratados directamente com o metabolito activo, estradiol (Balthazart & Schumacher, 1983).

No presente trabalho não se verificaram quaisquer diferenças estatisticamente significativas, relevantes, nas frequências dos comportamentos ocorridos durante as interacções macho-fêmea. Desta forma, e para esta espécie, nada se pode concluir acerca da importância da 11-cetotestosterona e da aromatase para os comportamentos considerados caracteristicamente sexuais.

Além disso, os vários resultados recentes sugerem que o padrão esteroidogénico dos Teleósteos, poderá encontrar-se longe da uniformidade (Kime & Groves, 1986).

Ao longo da evolução dos Vertebrados, tem havido uma tendência para esteróides cada vez mais simples e menos hidroxilados, possivelmente como reflexo de um aumento da especificidade dos receptores hormonais. Seria surpreendente se esta tendência não aparecesse também nos Teleósteos (uma classe tão diversa ao nível evolutivo e reprodutivo). Os Poecilídeos, que representam uma estratégia reprodutiva muito diferente à da maioria dos Teleósteos ovíparos, são particularmente interessantes (Kime & Groves, 1986).

Por outro lado, existe o perigo de assumir que todo o comportamento reprodutor têm de ser regulado por hormonas. É possível que apenas algumas componentes do reportório do comportamento estejam sob controlo hormonal, enquanto outras actividades as quais estão normalmente associadas com a reprodução podem estar casualmente ligadas a actividades reguladas por hormonas sem serem elas próprias influenciadas pelas hormonas (Liley, 1969). Além disso, os resultados dos estudos em *Lepomis macrochirus* indicam que os androgénios envolvidos na reprodução desta espécie podem estar sujeitos a alguma desconhecida mudança metabólica extra-gónadas. Esta possibilidade implica uma grande complexidade nas interacções entre os vários esteróides e a sua expressão no comportamento reprodutor, não só nesta espécie mas nos machos de Teleósteos em geral (Kindler *et al.*, 1991).

A literatura revela uma diversidade considerável na regulação hormonal do comportamento reprodutor, mesmo assim relativamente poucas espécies foram estudadas. Isso prova ser virtualmente impossível desenhar alguma conclusão geral acerca do papel de qualquer hormona ou o controlo de qualquer classe de comportamento (Liley, 1969).

## REFERÊNCIAS

- Abrahams, M.V. (1993). The trade-off between foraging and courting in male guppies. *Anim. Behav.*, **45**: 673-681.
- Andersson, E., Borg, B. & Lambert, J.G.D. (1988). Aromatase activity in brain and pituitary of immature and mature atlantic salmon (*Salmo salar* L.) Parr. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **72**: 394-401.
- Antonopoulou, E.; Mayer, I.; Berglund, I. & Borg, B. (1995). Effects of aromatase inhibitors on sexual maturation in Atlantic salmon, *Salmo salar*, male parr. *Fish Physiology and Biochemistry*, **14** (1): 15-24.
- Baird, R.C. (1968). Aggressive behavior and social organization in *Mollienesia latipinna* le Sueur. *The Texas Journal of Science*, **20** (2): 157-176.
- Balthazart, Y. & Schumacher, M. (1983). Testosterone metabolism and sexual differentiation in quail, pp. 237-260. In Balthazart, J.; Prove, E. & Gilles, R. (Eds.): *Hormones and behaviour in higher vertebrates*. Springer-Verlag, New York.
- Beacham, J.L. (1987). The relative importance of body size and aggressive experience as determinants of dominance in pumpkinseed sunfish, *Lepomis gibbosus*. *Animal Behaviour*, **36** (2): 621-623.
- Beaugrand, J.P.; Caron, J. & Comeau, L. (1984). Social organization of small heterosexual groups of green swordtails (*Xiphophorus helleri*, Pisces, *Poeciliidae*) under conditions of captivity. *Behaviour*, **91**.
- Bildsoe, M. (1988). Aggressive, sexual and foraging behaviour in *Poecilia velifera* (Pisces: *Poeciliidae*) during captivity. *Ethology*, **79**: 1-12.
- Billard, R. (1982). The reproductive cycle in teleost fish. *Riv. it Piscic. Ittiop. - A. XVII*, **2**: 50-67.
- Bisazza, A. (1993). Male competition, female mate choice and sexual size dimorphism in poeciliid fishes, pp. 257-286. In: Huntingford, F.A. & Torricelli, P. (Eds.): *Behavioural Ecology of Fishes*. Academic Publishers, Switzerland.
- Borg, B. (1987). Stimulation of reproductive behavior by aromatizable and non-aromatizable androgens in the male three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. *Proc. V Congr. europ. Ichthyol.*, Stockholm, 1985. 269-271.
- Borg, B. (1994). Androgens in teleost fishes. *Comp. Biochem. Physiol.*, **109C**(3): 219-245.
- Borg, B. & Mayer, I. (1995). Androgens and behaviour in three-spined stickleback. *Behaviour*, **132** (13-14): 1025-1035.
- Borg, B.; Scoonen, W.G.E.J. & Lambert, J.G.D. (1989). Steroid metabolism in the testes of the breeding and nonbreeding three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **73**: 40-45.
- Brain, P.F. (1981). Hormones and aggression in infra-human vertebrates, pp. 181-213. In Brain, P.F. & Benton, D. (Eds.): *The biology of aggression*. Sijthoff & Noorhoff, Alphen aan den Rijn.
- Callard, G.V. (1982). Aromatase in the teleost brain and pituitary: role in hormone action. In Richter, C.J.J. & Goos, H.J. (Eds.): *Reproductive Physiology of Fish*. Pudoc. Wageningen.

- Callard, G.V.; Petro, Z. & Ryan, K.J. (1978). Conversion of androgen to estrogen and other steroids in the vertebrate brain. *Am. Zool.*, **18**: 511-523.
- Callard, G.V.; Petro, Z.; Ryan, K.J. & Claiborne, J.B. (1981). Estrogen synthesis *in vitro* and *in vivo* in the brain of a marine teleost (*Myoxocephalus*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, **43**: 243-255.
- Cardwell, J.R. & Liley, N.R. (1991). Androgen control of social status in males of a wild population of stoplight parrotfish, *Sparisoma viride* (Scaridae). *Hormones and behavior*, **25**: 1-18.
- Clark, E; Aronson, L.R. & Gordon, M. (1954). Mating behavior patterns in two sympatric species of Xiphophorin fishes: their inheritance and significance in sexual isolation. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, **103** (2): 139-225.
- Colgan, P. (1986). The motivational basis of fish behaviour, pp.23-46. In Pitcher, T.J (Ed.). *The Behavior of Teleost Fishes*.
- Colombo, L. & Belvedere, P. (1976). Endocrine aspects of reproduction in teleost fishes. *Archo Oceanogr. Limmol.* **18** suppl. 3: 273- 293.
- Constantz, G.D. (1975). Behavioral ecology of mating in the male gila topminnow, *Poeciliopsis occidentalis* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae). *Ecology*, **56**: 966-977.
- Crim, L.W.; Peter, P.F. & Billard, R. (1981). Onset of gonadotropic hormone accumulation in the immature trout pituitary gland in response to estrogen or aromatizable androgen steroid hormones. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **44**: 374-381.
- De Leeuw, R.; Goos, H. & Van Oordt, P. (1987). The regulation of gonadotropin release by neurohormones and gonadal steroids in the african catfish, *Clarias gariepinus*. *Aquaculture*. **63**: 43-58.
- Dorner, G. (1983). Hormone-dependent brain development and behaviour, pp. 204-217. In Balthazart, J.; Prove, E. & Gilles, R. (Eds.): *Hormones and behaviour in higher vertebrates*. Springer-Verlag, New York.
- Edler, D.R.; Horne, D.A. & Sangalang, G.B. (1971). Identification and quantification of the major androgens in testicular and peripheral plasma of Atlantic salmo (*Salmo salar*) during sexual maturation. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **16**: 257-267.
- Hannes, R.P.; Franck, D. & Liemann, F. (1984). Effects of rank-order fights on whole-body and blood concentrations of androgens and corticosteroids in the male swordtail (*Xiphophorus helleri*). *Z. Tierpsychol.*, **65**: 53-65.
- Harding, C.F. (1983). Hormonal specificity and activation of social behaviour in the male zebra finch, pp. 275-289. In Balthazart, J.; Prove, E. & Gilles, R. (Eds.): *Hormones and behaviour in higher vertebrates*. Springer-Verlag, New York.
- Higby, M.; Beulig, A. & Dwyer, J. (1991). Exogenous testosterone and social experiences each the development of aggressive behavior in *Cyprinodon variegatus*. *Aggressive Behavior*, **17**: 229-239.
- Hutchison, J.B. (1991). How does the environment influence the behavioural action of hormones? In Bateson, P. (Ed.): *The development and integration of behaviour*. Cambridge University Press.

- Hutchison, J.B. & Steimer, T.H. (1983). Hormone-mediated behavioural transitions: a role for brain aromatase, pp. 261-274. *In* Balthazart, J.; Prove, E. & Gilles, R. (Eds.): *Hormones and behaviour in higher vertebrates*. Springer-Verlag, New York.
- Idler, D.R.; Horne, D.A. & Sangaland, G.B. (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.; Reinboth, R.; Walsh, J.M. & Truscott, B. (1976). A comparison of 11-hydroxytestosterone and 11-ketotestosterone in blood of ambisexual and gonochoristic teleosts. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **30**: 517-521.
- Jobling, M. (1984). Reproduction, pp. 297-355. *In* *Environmental Biology of Fishes*. Fish and Fisheries Series 16. Chapman & Hall.
- Kime, D.E. (1993). "Classical" and "non-classical" reproductive steroids in fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, **3**: 160-180.
- Kime, D.E. & Groves, D.J. (1986). Steroidogenesis by gonads of a viviparous teleost, the sailfin molly (*Poecilia latipinna*), *in vitro* and *in vivo*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **63**: 125-133.
- Kindler, P.M.; Bahr, J.M. & Philipp, D.P. (1991). The effects of exogenous 11-ketotestosterone testosterone, and cyproterone acetate on prespawning and parental care behaviors of male bluegill. *Hormones and Behavior*, **25**: 410-423.
- Kindler, P.M.; Philipp, D.P.; Gross, M.R. & Bahr, J.M. (1989). Serum 11-ketotestosterone and testosterone concentrations associated with reproduction in male bluegill (*Lepomis macrochirus*: Centrarchidae). *Gen. Comp. Endocrinol.*, **75**: 446-453.
- Leitz, T. & Reinboth, R. (1985). *In vitro* bioconversion of [<sup>14</sup>C] androstenedione by testes of the siamese fighting fish *Betta splendens* Regan (Anabantoidei, Belontiidae). *Gen. Comp. Endocrinol.*, **58**: 471-477.
- Leshner, A.I. (1983). Pituitary-adrenocortical effects on intermale agonistic behavior pp. 27-38. *In* Svare, B.B. (Ed.): *Hormones and Aggressive Behavior*, Plenum Press, New York & London
- Liley, N.R. (1969). Hormones and reproduction behavior in fishes, pp. 73-116. *In* Hoar, W.S. & Randall, D.J. (Eds.): *Fish Physiology - III*, Academic Press, New York.
- Liley, N.R. & Stacey, N.E. (1983). Hormones, pheromones, and reproductive behavior in fish, pp. 1-49. *In* Hoar, W.S.; Randall, D.J. & Donaldson, E.M. (Eds.): *Fish Physiology-IX (B)*, Academic Press, New York.
- Liley, N. & Wishlow, W. (1974). The interaction of endocrine and experimental factors in the regulation of sexual behaviour in the female guppy *Poecilia reticulata*. *Behaviour*, **48**: 185-214.
- Luttge, W.G. (1983). Molecular mechanism of steroid hormone actions in the brain, pp. 247-312. *In* Svare, B.B. (Ed.): *Hormones and Aggressive Behavior*, Plenum Press, New York & London.
- Marascuilo, L. & Serllin, R. (1988). *Statistical methods for the social & behavioral sciences*. Freeman & Company, New York.

- Massa, R.; Battoni, L. & Lucini, V. (1983). Brain testosterone metabolism and sexual behaviour in birds, pp. 230-236. In Balthazart, J.; Prove, E. & Gilles, R. (Eds.): *Hormones and behaviour in higher vertebrates*. Springer-Verlag, New York.
- Mayer, I.; Borg, B. & Schulz, R. (1990a). 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.; Borg, B. & Schulz, R. (1990b). Conversion of 11-ketoandrostenedione to 11-ketotestosterone by blood cells of six fish species. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 77: 70-74.
- Mayer, I.; Liley, N.R. & Borg, B. (1994). Stimulation of spawning behavior in castrated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by 17 $\alpha$ , 20 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one, but not 11-ketoandrostenedione. *Hormones and behavior*, 28: 181-190.
- Miller, R.R. (1983). Checklist and key to the mollies of Mexico (Pisces: Poeciliidae: *Poecilia*, subgenus *Mollienesia*). *Copeia*, 3: 817-822.
- Moore, M.C. (1988). Testosterone control of territorial behavior: tonic-release implants fully restore seasonal and short-term aggressive responses in free-living castrated lizards. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 70: 450-459.
- Munro, A.D. & Pitcher, T.J. (1985). Steroid hormones and agonistic behavior in a cichlid teleost, *Aequidens pulcher*. *Hormones and behavior*, 19: 353-371.
- Olsen, K.L. (1983). Genetic determinants of sexual differentiation, pp. 138-158. In Balthazart, J.; Prove, E. & Gilles, R. (Eds.): *Hormones and behaviour in higher vertebrates*. Springer-Verlag, New York.
- Pankhurst, N.W. & Barnett, C.W. (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. & Callard, G.V. (1985). Aromatase and 5 $\alpha$ -reductase in the teleost brain, spinal cord, and pituitary gland. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 60: 244-251.
- Pasmanik, M.; Schlinger, B.A. & Callard, G.V. (1988). *In vivo* steroid regulation of aromatase and 5 $\alpha$ -reductase in goldfish brain and pituitary. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 71: 175-182.
- Peter, R. (1983). The brain and neurohormones in teleost reproduction. In Hoar, W.; Randall, D. & Donaldson, E. (Eds.): *Fish Physiology - IX(A)*. Academic Press, New York.
- Piferrer, F. & Donaldson, E. (1991). Dosage-dependent differences in the effect of aromatizable and nonaromatizable androgens on the resulting phenotype of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Fish Physiology and Biochemistry*. 9 (2): 145-150.
- Saino, N. & Møller, A.P. (1995). Testosterone correlates of mate guarding, singing and aggressive behaviour in male barn swallows, *Hirundo rustica*. *Anim. Behav.*, 49: 465-472.
- Siegel, S. (1975). *Estatística não-paramétrica (para as ciências do comportamento)*. McGraw-Hill, São Paulo.
- Sikkel, P.C. (1993). Changes in plasma androgen levels associated with changes in male reproduction behavior in a brood cycling marine fish. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 89: 229-237.

- Snelson, F.F. Jr. (1982). Indeterminate growth in males of the sailfin molly, *Poecilia latipinna*. *Copeia*, **2**: 296-304.
- Sodersten, P. (1991). Testosterone metabolism and sexual behavior in male rats. In Archer, T. & Hansen, S. (Eds.): *Behavioural Biology. Neuroendocrine Axis*. Lawrence Erlbaum Associates, Publishers, New Jersey.
- Timmers, R.J.M.; Lambert, J.G.D.; Peute, P.; Vulling, H.G.B. & Van Oordt, P.G.W.J. (1987). Localization of aromatase in the brain of the male african catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell), by microdissection and biochemical identification. *The journal of comparative neurology*, **258**: 368-377.
- Ueda, H.; Kambegawa, A. & Nagahama, Y. (1984). *In vitro* 11-ketotestosterona and 17 $\alpha$ , 20 $\beta$ - dihydroxy-4-pregnen-3-one production by testicular fragments and isolated sperm of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *The Journal of experimental zoology*. **231**: 435-439.
- Villars, T.A. (1983). Hormones and aggressive behavior in teleost fishes, pp. 407-433. In Svare, B.B. (Ed.): *Hormones and Aggressive Behavior*, Plenum Press, New York & London.
- Wazlavsek, B. & Figler, M. (1989). Territorial prior residence, size asymmetry, and escalation of aggression in convict cichlids (*Cichlasoma nigrofasciatum* Gunther). *Aggressive behavior*, **15**: 235-244.
- Winer, B.J.; Brown, D.R.; Michels, K.M. (1991). *Statistical principals in experimental design*. 3rd. Edition, Series in Psychology, McGraw-Hill, New York.
- Zar, J.H. (1984). *Biostatistical Analysis*. 2<sup>nd</sup> Edition. Prentice-Hall.
- Zuikov, A. Y. (1993). Avoidance learning and aggression in guppies. *Anim. Behav.*, **45**: 826-827.