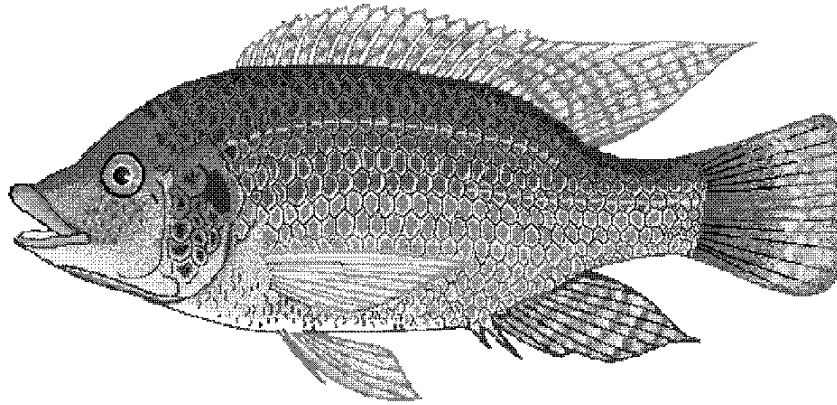


Universidade do Algarve
Faculdade de Ciências do Mar e do Ambiente

Efeito da anosmia na endocrinologia e reprodução de machos de *Oreochromis mossambicus* (Peters, 1852)

Diana Brito Costa Pereira



Mestrado em Biologia Marinha
Especialização em Biotecnologia Marinha

Faro 2008

Universidade do Algarve
Faculdade de Ciências do Mar e do Ambiente

Efeito da anosmia na endocrinologia e
reprodução de machos de *Oreochromis*
mossambicus (Peters, 1852)

Diana Brito Costa Pereira

Orientadores: Professora Doutora Teresa Modesto
Doutor Peter Hubbard

Mestrado em Biologia Marinha
Especialização em Biotecnologia Marinha

Faro 2008

O trabalho apresentado é da exclusiva responsabilidade do autor,

Aos meus pais

Agradecimentos

A todos os que contribuíram para a escrita destes agradecimentos e mais umas quantas páginas dedicadas à Ciência, o meu Real Muito Obrigada.

...*muchas gracias* a Mar Huertas... pelo curso intensivo de histologia e radioimunoensaio... por me ter feito acreditar que horas ao microscópio teriam os seus frutos... pelas sugestões e correções em “Portunhol”... pela paciência e apoio nos momentos mais desesperantes... e essencialmente, por me ter ajudado a contar a minha história...

...*thank you to* Peter Hubbard, por me ter apresentado às tilápias, pelas correções do meu inglês macarrónico e pela ajuda fundamental nos EOG's...

... muito obrigada à Professora Teresa Modesto, por me ter ajudado a encontrar um trabalho a que se pudesse chamar Tese, pelo *background support* ao longo destes meses e pelas correções e sermões acerca do excesso de vírgulas deste manuscrito...

..à Elsa Couto do lab. 2.28, pela ajuda fundamental nas extracções e RIA's, por me ter ajudado na luta contra o processador de tecidos que naquele dia resolveu não funcionar... e por todo o apoio no laboratório...

...à Nadia, Rita e Ângela do laboratório de Biologia Molecular da FERN pela ajuda prestada enquanto lá estive de volta das lâminas...

É porque os amigos são quase tudo nesta vida, um especial obrigada...

...ao abafadinho... aos **ABBA**... a Alforneiros... a Aljezur... a Almancil... ao B.A. ... ao *Balack*... ao banho 29... à *Barriguita*... a Batalha... a Beja... às bicicletas nos caminhos de cabra... à **BIOLOGIA MARINHA e PESCAS**... ao bolo brigadeiro sem farinha... ao **bolo de anis**... ao bolo de iogurte *afterhours*... ao **Cabidela**... às *cafezadas*... às caipifrutas... às caipirinhas... ao **Casal das Gambelas**... aos chocolates kinder... às **Ciências Farmacêuticas**... às Ciências do Turismo... ao **Circo do Sol**... ao circular da UFRN... a Coimbra... aos Da Weasel no Gl... aos **desfiles**... ao **Design**... ao Direito... às **entregas**... ao esparguete com arroz, salsichas e milho... aos espetinhos... à Família Feliz... a Faro... aos fãs... à **Fisioterapia**... ao *fitoplâncton*... ao Fluffy... às **fomatações**... a *Çaiá*... a Genipabu... às *home made popcorns*... ao início... às jantaras... ao Jeremias... ao **Jô e Joaquim**... ao **karakê**... a Lagos... a Leiria... a **Loures e arredores**... a Mafra... ao Marketing e Publicidade... aos mergulhos... à *Moá*... a Monchique... ao Monte Branco... ao **Moscatel**... a Moura... ao **NAS**... a Natal... às **noitadas cinematográficas**... às *noitadas no L20*... a Oeiras... ao outro lado do oceano... às *ovelhinhas*... ao Patacão... aos **PDVs**... à Pedreira... a Peniche... a Pipa... ao **poker a feijões**... a **Ponta Negra**... a Portimão... ao Porto... a Porto Covo... à Póvoa de Sta Iria... à Praia de Faro... à Praia Vale dos Homens... aos praxados... aos *praxantes*... aos **Queen**... à **Quinta da Lage**... à Ria formosa... ao **Rogil**... a S. Vicente... a *Selvador*... às Semanas Académicas... à Serra da Mina... a *Silves*... aos Tabuleiros... à **tapioca**... a **Tomar**... às tostas... à tropa... ao Ulisses...

...à minha família, pelo apoio Continental, Atlântico e Transatlântico...

... à minha madrinha, por rezar todos os dias por mim...

...à Nena, por ser uma super avó e me ter aturado desde que nasci...

... à mana morena, por ser um exemplo a seguir... e à mana loira, por me ter estabilizado sempre que pôde...

...e porque “o que tem de ser, tem muita força” e “para a frente é que é caminho”... o meu maior, mais sincero e mais puro **MUITO OBRIGADA** aos meus papás, por todo o apoio, toda a força e por terem acreditado em mim desde o primeiro dia em que decidi embarcar nesta aventura...

Resumo

Estudos recentes realizados em tilápia Moçambicana (*Oreochromis mossambicus*) sugerem a importância da comunicação química nas suas interações sociais, como o comportamento de corte e o estabelecimento de hierarquias sociais. Para estudar o efeito da ausência de detecção de estímulos químicos na função reprodutora em machos desta espécie, mediu-se em peixes anósmicos, *sham* e controlo o nível de esteróides no plasma, testou-se a potência olfactiva da sua urina, observou-se a morfologia interna dos testículos e contou-se o número de células somáticas e germinais. A medição dos níveis de testosterona (T) e 11-cetotestosterona (11-CT) no plasma foi efectuada através de radioimunoensaios, a observação da morfologia interna e contagem de células nos testículos foi feita através da realização de secções histológicas com posterior coloração com Hematoxilina-Eosina e a potência olfactiva da urina dos machos foi testada através de electro-olfactogramas (EOG) em machos conspecíficos. Após uma semana, os níveis de T e 11-CT diminuíram nos peixes anósmicos e *sham* (machos em que foi simulada a operação para indução de anosmia). Nos testículos dos peixes anósmicos houve um retrocesso na espermatogénese, acompanhado por uma diminuição do número de células germinais, após duas semanas de anosmia, efeito este que persistiu até pelo menos 30 dias após a operação. Efeitos semelhantes foram observados nos machos *sham*. No entanto, a diminuição significativa na potência olfactiva da urina observada em machos anósmicos, não ocorreu nos machos *sham*. Estes resultados sugerem a existência de uma ligação reguladora entre o olfacto e o desenvolvimento testicular nos machos e que a contínua detecção de estímulos químicos sociais através do sistema olfactivo é importante para a manutenção da função do sistema reprodutor – incluindo a produção de feromonas na urina – nos machos desta espécie.

Palavras-chave: Tilápia; *Oreochromis mossambicus*; olfacto; anosmia; feromona; comunicação química; endocrinologia; esteróides; testículos; gametogénese.

Abstract

Recent evidence suggests the importance of chemical communication in social interactions, such as courtship behaviour and the establishment of social hierarchies, in tilapia (*Oreochromis mossambicus*). To investigate the effect of the absence of chemical stimuli on the regulation of reproductive function in males, we assessed plasma androgen levels, the olfactory potency of the urine and the morphology, including numbers of germ and somatic cells, of the testes of anosmic, sham-operated and control males. The plasma levels of testosterone (T), 11-ketotestosterone (11-KT) and cortisol were measured by radioimmunoassays, the morphology and the germ and somatic cell counts were assessed by histological sectioning with Haematoxylin-Eosin staining, and the olfactory potency of the urine was assessed by recording the electro-olfactograms (EOG) in conspecific males. After one week, the plasma levels of T and 11-KT decreased in both anosmic and sham-operated fish. The testes of anosmic fish showed a reduction in spermatogenesis accompanied by a decrease of the numbers of germ and somatic cells after two weeks of anosmia, which persisted up to at least 30 days. Similar trends were also seen in sham-operated males. However, a significant decrease in the olfactory potency of the urine from anosmic males was seen which did not occur in sham-operated males. These results suggest the existence of a regulatory link between olfaction and testicular function in males; the continued detection of social chemical stimuli *via* the olfactory system is important for the maintenance of reproductive system function - including the production of the urinary pheromone - in the males of this species.

Key-words: Tilapia; *Oreochromis mossambicus*; olfaction; anosmia; pheromone; chemical communication; endocrinology; steroids; testes; gametogenesis.

Índice

Agradecimentos.....	V
Resumo	VII
Abstract.....	VIII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Reprodução.....	2
1.1.1. Morfologia das gónadas e espermatogénese.....	2
1.1.2. Regulação endócrina da gametogénese.....	5
1.2. Comunicação química	7
1.2.1. Estímulos químicos	9
1.2.2. Recepção dos estímulos químicos	9
1.2.3. Resposta aos estímulos.....	13
1.3. Tilapia moçambicana.....	13
1.3.1. Biologia de <i>Oreochromis mossambicus</i>	13
1.3.2. Comportamento reprodutor e comunicação química em <i>Oreochromis mossambicus</i>	15
1.4. Objectivo do trabalho	16
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
2.1. Obtenção dos espécimes.....	17
2.2. Indução de anosmia	17
2.3. Recolha de urina e plasma.....	17
2.4. Quantificação de esteróides livres no plasma	18
2.4.1. Extracção de esteróides.....	18
2.4.2. Quantificação dos esteróides	18
2.5. Recolha e histologia das gónadas	20
2.6. Medição da potência olfactiva da urina.....	21
2.6.1. Preparação dos estímulos de urina	21
2.6.2. Registo dos EOGs	22
2.6.3. Adição dos estímulos	22
2.6.4. Normalização das respostas olfactivas.....	23
2.7. Análise estatística	23
3. RESULTADOS.....	24
3.1. Níveis de esteróides no plasma	24
3.2. Histologia das gónadas	25
3.2.1. Morfologia interna.....	25

3.2.2. Contagem de células somáticas e germinais nos testículos	28
3.2.2.1. Região anterior	28
3.2.2.2. Região posterior	30
3.3. Respostas olfactivas à urina de machos.....	31
4. DISCUSSÃO.....	33
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	40
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

1. INTRODUÇÃO

Os peixes são o grupo mais ancestral dos vertebrados e os mais abundantes em termos de espécies e biomassa, tendo já sido identificadas mais de 30 000 espécies (Froese e Pauly, 2008). Estes animais podem viver em lagos, rios, estuários a mares e oceanos, encontrando-se em quase todos os habitats aquáticos concebíveis, desde nascentes que excedem os 40°C a águas antárticas a menos de 0°C, e desde elevados lagos nas montanhas até ao oceano profundo (Jobling, 1995).

Ao estarem num nível inferior da escala evolutiva quando comparados com os mamíferos, têm funções que são normalmente menos complexas e mais fáceis de estudar, permitindo entender mecanismos para a mesma função que são mais complexos em mamíferos (Fabacher e Little, 2000). Devido a isto e ao facto de, ao longo da sua história de vida, sofrerem adaptações comportamentais, bioquímicas, fisiológicas e morfológicas, os peixes têm sido muito utilizados como modelo de estudos em diversas áreas como morfologia (Very e Sheridan, 2002), toxicologia, patologia, imunologia (Villena, 2003) e genética (Gerlai, 2003), entre outras. Além das características acima mencionadas, também muitas espécies estão bem adaptadas a condições de cativeiro (Fabacher e Little, 2000), facilitando deste modo o seu estudo em laboratório.

A sua diversidade reflecte-se também numa ampla gama de processos e estratégias reprodutivas (Redding e Patiño, 2000), que diferem entre espécies na forma como os animais atraem parceiros sexuais, procedem à fecundação, asseguram e cuidam das posturas. Em geral, o processo de reprodução é cíclico e envolve a formação e maturação dos gametas, que culmina nas posturas e fecundação dos ovos. Estes eventos cíclicos são mediados por alterações endócrinas que controlam cada fase do ciclo reprodutivo (Jobling, 1995).

Os sistemas olfactivo e gustativo nos peixes compreendem as principais vias sensoriais para detecção e identificação de estímulos químicos no ambiente (Hara, 2000a) sendo cada vez mais utilizados no estudo da comunicação química. O sentido do olfacto está muito bem desenvolvido nos peixes e permite a detecção de uma enorme diversidade de compostos químicos que são libertados para a água através da urina, fluidos gonadais, fezes, pele e brânquias (Liley e Stacey, 1983). Destes compostos destacam-se algumas hormonas sexuais, incluindo esteróides, prostaglandinas e respectivos metabolitos, que são excretados para a água e detectados olfactivamente por conspécificos influenciando por esta via o seu comportamento e/ou fisiologia da

reprodução actuando como feromonas hormonais (Stacey e Sorensen, 2002). O sistema olfactivo participa ainda em diversos processos vitais como a detecção e reconhecimento de fontes de alimento, reconhecimento de rotas de migração e regulação do sistema endócrino e modelação do comportamento durante a reprodução (Hara, 2000b), sendo cada vez mais utilizados como modelos de estudo de comportamento relacionados com o olfacto (DeBose e Nevitt, 2008).

1.1. Reprodução

1.1.1. Morfologia das gónadas e espermatogénese

Os peixes teleósteos são o grupo mais diverso de entre os vertebrados, apresentando uma grande variedade de padrões de reprodução, desde espécies gonocóricas (sexos separados) a hermafroditas sequenciais (protândricas e protogínicas) e hermafroditas simultâneos. Também pode ocorrer reprodução assexuada em espécies partenogénicas, como é o caso da *Poecilia formosa* (Oliveira, 2006). Esta complexidade de estratégias da reprodução nos teleósteos é reflectida na grande variedade na morfologia das estruturas gonadais (testículos e ovários). No entanto, a nível celular, os peixes apresentam as mesmas estruturas fundamentais que os restantes grupos de vertebrados (Redding e Patiño, 2000).

Nos machos, os órgãos envolvidos na reprodução são os testículos que, nos teleósteos, são geralmente órgãos pares alongados (diferenciados por vezes em testículo anterior e posterior), adjacentes à bexiga gasosa que se estendem dorsalmente por quase todo o comprimento da cavidade peritoneal. Os testículos comunicam com o ducto espermático principal (vaso deferente) que termina na cloaca ou ânus (Billard, 1990; Lahnsteirner, 2003). Os testículos estão circundados e suspensos por uma fina camada de tecido conjuntivo denominada mesorquium. Apesar de poderem variar de espécie para espécie, distinguem-se dois tipos básicos principais de estrutura testicular: tubular e lobular, definidas com base na distribuição e diferenciação das células germinais (Grier, 1981; Billard *et al.*, 1982).

Os testículos tubulares (Fig. 1A) encontram-se apenas no grupo dos Ateriniformes (e.g. *Poecilia reticulata*). Nestes peixes, os túbulos seminíferos estão orientados para uma cavidade/lúmen central, onde os espermatozóides são libertados. As células germinais primárias estão localizadas no terminal cego dos túbulos, enquanto

que as células em estados mais desenvolvidos se encontram ao longo do túbulo em direção ao ducto espermático (Nagahama, 1993).

Os testículos do tipo lobular (Fig. 1B) são os mais comuns nos teleósteos e são compostos por numerosos lóbulos, separados entre si por uma camada fina de tecido conjuntivo fibroso e por compartimentos intersticiais. Estes compartimentos contêm células de Leydig, fibroblastos e vasos sanguíneos e linfáticos (Nagahama, 1983).

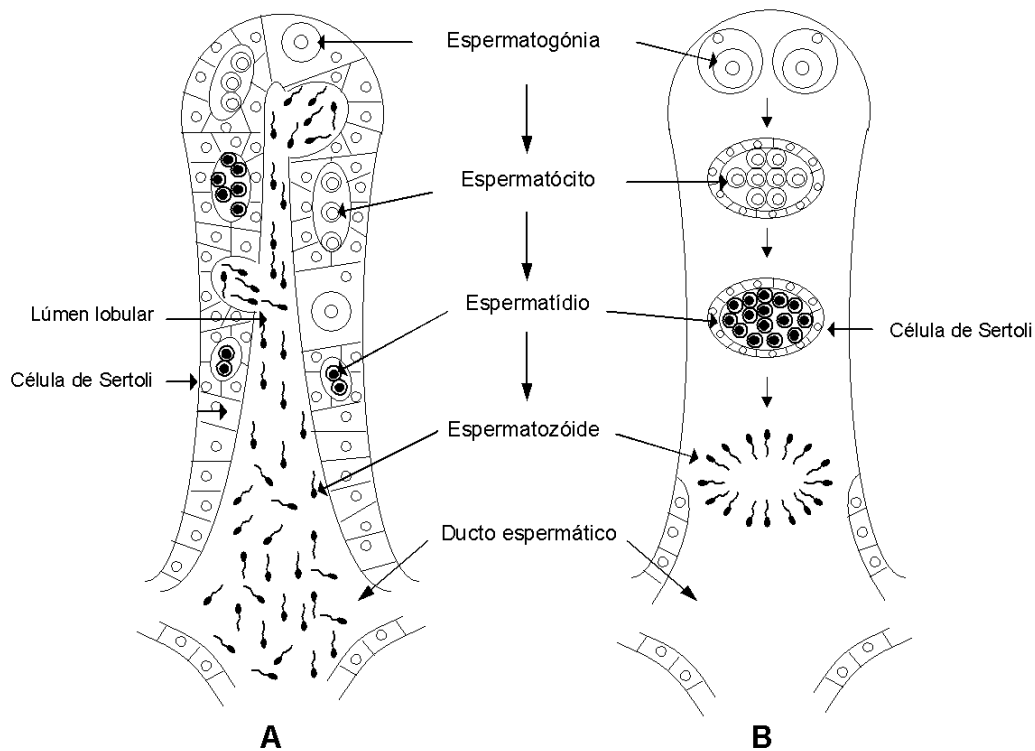


Fig. 1. Diagrama representativo dos dois tipos de estrutura dos testículos de peixes teleósteos. A) tipo lobular. B) tipo tubular. (Adaptado de Nagahama, 1983). Para mais detalhes, ver texto.

Os lóbulos contêm células germinais em diferentes estados de desenvolvimento (que produzem gâmetas) e células somáticas. A produção de gâmetas masculinos é denominada espermatogênese e inclui processos de proliferação mitótica, divisão meiótica e diferenciação de células germinais, desde as células primárias diplóides (espermatogônias), até aos gâmetas maduros haplóides (espermatozóides) (Redding e Patino, 1993).

Durante o processo de proliferação mitótica, as espermatogônias primárias (SpgA) sofrem divisão mitótica, passando a espermatogônias B (SpgB) que, por sua

vez, se diferenciam em espermatócitos primários (SpcI). (Fig. 2). Estes, por divisão meiótica, originam duas células filhas, os espermatócitos secundários (Spc II). Uma segunda divisão meiótica converte estes em espermatídeos (Spd) que, por sua vez, se vão diferenciar em espermatozóides, (Spz) através de um processo denominado espermiogénese, no qual há uma reorganização dos núcleos e citoplasma dos espermatídeos e também o desenvolvimento de flagelos (Nagahama, 1983; Nóbrega *et al.*, 2008). Os espermatozóides maduros são libertados no lúmen central e, após espermição - processo de remoção do citoplasma e organelos desnecessários aos espermatozóides - são conduzidos aos ductos deferentes que terminam na abertura urogenital (Billard, 1990).

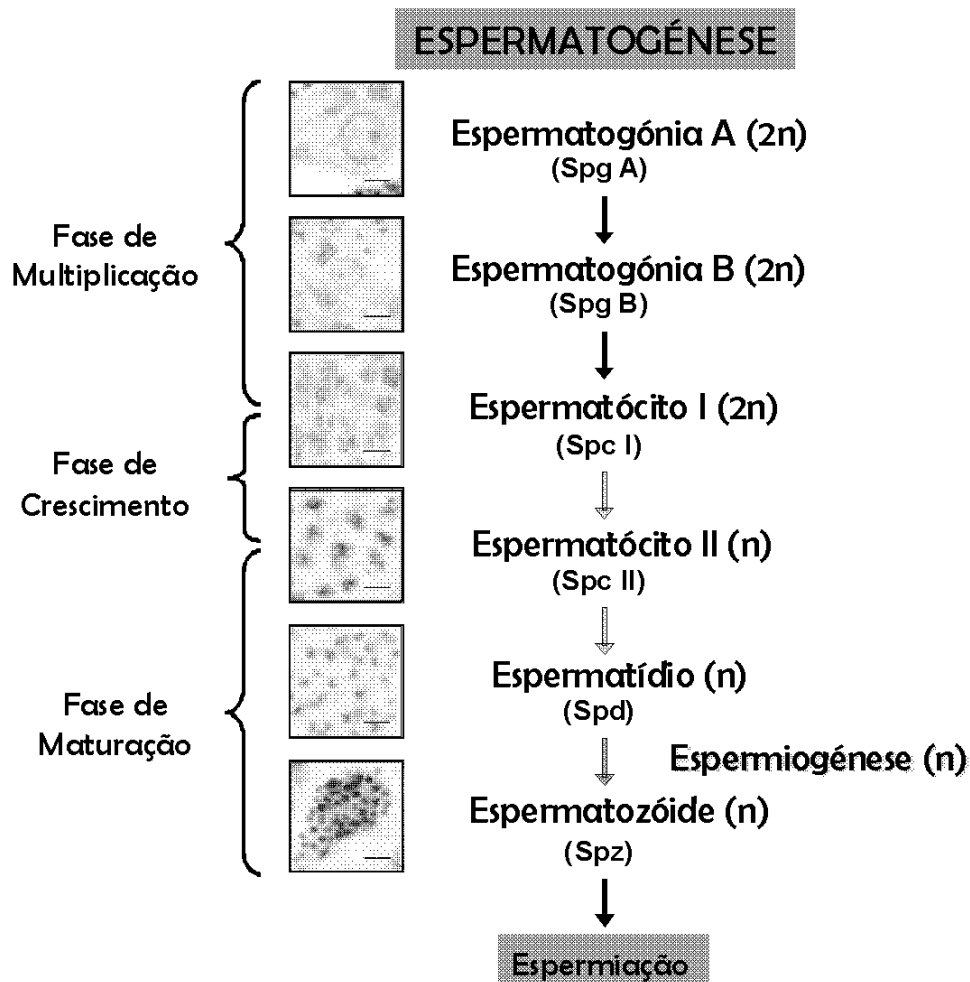


Fig. 2. Gametogénese em machos tilápia Moçambicana. Setas a preto indicam mitoses, a amarelo indicam meiose e a azul espermiogénese. 2n, células diplóides; n, células haplóides. Barra de escala = 10µm.

As células somáticas consistem em células de Sertoli (intra-lobulares) e células de Leydig (intersticiais) e têm diferentes distribuições, consoante a espécie (Blazer, 2002). As células de Sertoli estão directamente associadas às células germinais, as quais sustentam fisicamente e alimentam, através da modificação do micro-ambiente químico (Redding e Patiño, 1993) e também participam na fagocitose e transporte de metabolitos (Nagahama, 1983). As células de Leydig podem estar isoladas ou em pequenos grupos nos interstícios dos lóbulos e têm como função produzir esteróides sexuais (como a testosterona e 11-cetotestosterona). Este facto está demonstrado por estudos histoquímicos que mostram que a 17 β -hidroxiesteróide desidrogenase (17 β -HSD), é uma enzima envolvida na síntese de hormonas esteróides, nestas células, em vertebrados (Jasra *et al.*, 2007; Nóbrega e Quagio-Grassiotto, 2007). Estes esteróides sexuais activam a gametogénese e expressão de caracteres sexuais secundários (Redding e Patiño, 1993).

1.1.2. Regulação endócrina da gametogénese

Nos teleosteos, o eixo hipotálamo-pituitária-gónada (eixo HPG) regula o desenvolvimento endócrino e a função reprodutora das gónadas durante todas as fases de vida dos peixes (Fig. 3) (Weltzien *et al.*, 2004). A detecção de estímulos sensoriais externos ou internos induz neurónios especializados no hipotálamo a libertarem pulsos de hormona libertadora de gonadotropinas, GnRH, que, por sua vez, vai induzir a secreção de gonadotropinas da glândula pituitária, FSH - hormona estimuladora do folículo - e LH - hormona luteinizante (anteriormente denominadas gonadotropinas I e II - GTH I e GTH II) (Schulz e Miura, 2002). Estas, por sua vez, estimulam a secreção de hormonas esteróides a nível das gónadas e promovem a espermatogénese (Liley, 1969; Swanson *et al.*, 2003).

Eixo Hipotálamo-Pituitária-Gónada

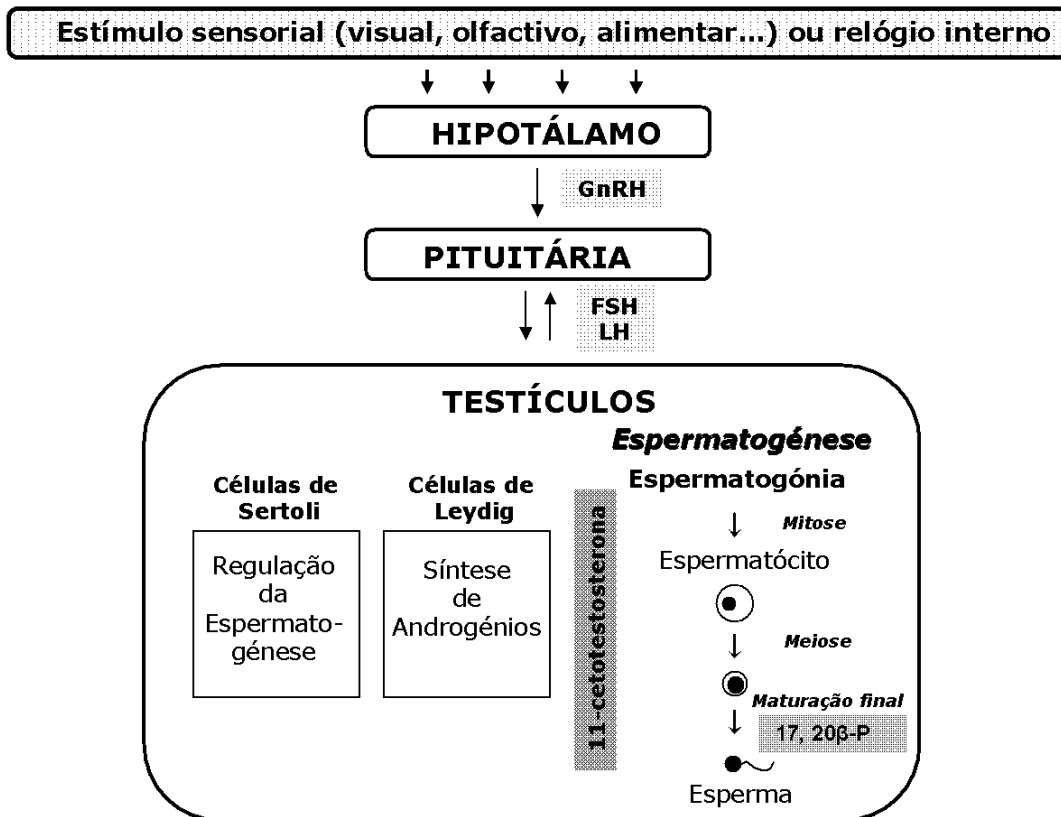


Fig. 3. Regulação endócrina da espermatogénese pelo eixo hipotálamo-pituitária-gónada (eixo HPG). GnRH – hormona libertadora de gonadotropinas; FSH – hormona estimuladora do folículo; LH – hormona luteinizante; 17, 20 β -P - 17 α , 20 β -dihidroxi-4-pregnene-3-ona (cortesia de Huertas, 2008).

Os esteróides sexuais são responsáveis pela coordenação da produção de gâmetas, comportamento sexual, fertilização e, por vezes, cuidado parental (Liley e Stacey, 1983).

Nos machos, as principais hormonas esteróides envolvidas na reprodução são androgénios, que são sintetizados nas células de Leydig (Yaron, 1995). A sua síntese pode ainda ocorrer em células de Sertoli, que podem aumentar ou mesmo substituir a síntese de esteróides por parte das células de Leydig (Pudney e Callard, 1984).

Os principais androgénios variam de espécie para espécie e do estado de desenvolvimento das gónadas mas incluem, normalmente, a testosterona, 11-cetotestosterona (11-CT) e androstenediona (AD) (Borg, 1994). A testosterona promove a diferenciação de células germinais (Garcia-López *et al.*, 2006), influencia a secreção de FSH e LH em ambos os sexos (Dubois *et al.*, 1998) e também induz a formação de caracteres sexuais masculinos (Liley, 1969). Este androgénio, apesar de ser funcional

em muitas espécies, em outras funciona apenas como precursor da síntese de 11-cetotestosterona (Liley e Stacey, 1983).

A 11-cetotestosterona é um potente androgénio nos peixes e regula a diferenciação sexual das gónadas (Nakamura, 1981; Piferrer *et al.*, 1993), o dimorfismo sexual masculino (Borg, 1994), secreção de gonadotropinas (Antonopoulou *et al.*, 1999) e espermatogénese (Miura *et al.*, 1996). Os peixes, podem ainda produzir nos testículos outro tipo de hormonas esteróides como estrogénios e progesteronas (17P - 17 α -hidroxi-4-pregnene-3-ona e 17,20 β -P - 17 α ,20 β -dihidroxi-4-pregnene-3-ona) estando estas últimas implicadas na maturação dos gâmetas (Fostier *et al.*, 1983; Barry *et al.*, 1993).

A clara correlação entre ciclos gonadais, níveis de esteróides gonadais e a manifestação de comportamento reprodutor sugerem que as hormonas gonadais têm um papel fundamental no aparecimento e desenvolvimento do mesmo (Liley e Stacey, 1983). A relação temporal entre os androgénios do plasma e a desova/espermiação sugerem que estes regulam a expressão de comportamentos reprodutores nos peixes. Durante a época não reprodutora, anterior à recrudescência testicular, os níveis de testosterona e 11-cetotestosterona são baixos ou mesmo indetectáveis. Depois, começam a aumentar com o crescimento dos testículos, espermatogénese e desenvolvimento de caracteres sexuais secundários masculinos, alcançando níveis máximos antes ou durante a época de postura, após a qual começam a diminuir e a 17,20 β -P começa a aumentar (Borg, 1994).

Este padrão geral pode tornar-se mais complexo devido ao facto de estas hormonas serem fortemente influenciadas por estímulos sócio-sexuais como interacções sexuais com outros machos (Cardwell e Liley, 1991; Dijkstra *et al.*, 2007), a presença de uma fêmea activa reprodutora (Oliveira *et al.*, 1996; Borges *et al.*, 1998) e factores associados a *nesting* e cuidado parental (Detrich *et al.*, 2005; Rodgers *et al.*, 2006; Desjardins *et al.*, 2008).

1.2. Comunicação química

A comunicação é definida como sendo a “interacção entre um *senalizador*, que produz um estímulo sensorial ou *senal*, e um receptor, que adquire o sinal e toma uma decisão comportamental consequente” (Rosenthal e Lobel, 2005).

Nos peixes, a comunicação pode ser visual (Gonçalves *et al.*, 2000), eléctrica, sendo os únicos animais a utilizá-la (Arnegard e Hopkins, 2003), acústica (Webb *et al.*, 2008) mecânica (Sargent *et al.*, 1998), química (Hara, 1992), ou utilização conjunta das mesmas (Moller, 2002).

O conhecimento completo dos mecanismos envolvidos na comunicação química implica o estudo, descrição e compreensão de quatro aspectos principais: o **senalizador**, o **estímulo químico** utilizado em questão, o **receptor** do estímulo químico e a **resposta** derivada à detecção deste (Fig. 4).

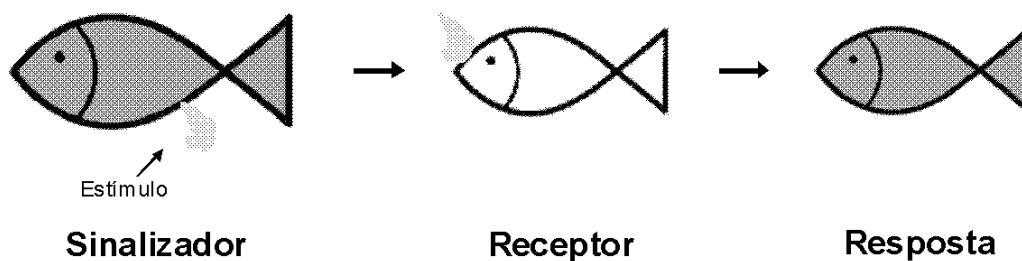


Fig. 4. Exemplo de comunicação química em peixes. O sinalizador emite um estímulo químico (ex. urina) que, ao ser detectado pelo receptor, provoca neste uma resposta, manifestada pela alteração da sua coloração.

É difícil saber quando é que os estímulos químicos produzidos pelos peixes são sinais químicos que evoluíram no contexto da comunicação química entre indivíduos (feromonas) ou simplesmente são bioproductos resultantes dos processos fisiológicos. (Rosenthal e Lobel, 2005). O conhecimento e compreensão dos mecanismos envolvidos na comunicação química começou com Darwin (1887), que foi o primeiro a reconhecer que odores libertados pelos organismos exerciam efeitos específicos nos conspécíficos. Desde então, a experiência prática na determinação de respostas de organismos à libertação de determinadas substâncias por conspécíficos, levou à definição conceptual de “feromonas” que, apesar de ter sofrido controvérsias ao longo dos anos, são definidas actualmente como sendo “substâncias libertadas por conspécíficos provocando uma resposta fisiológica e/ou comportamental inata no receptor” (Stacey e Sorensen, 2002).

Nos peixes, além de células *club*, que libertam feromonas de alarme (Smith, 1992), existem alguns grupos, como os caracídeos, que têm tecido epidérmico glandular de ambos os lados do pedúnculo caudal coberto com escamas modificadas na barbatana caudal que formam uma “bomba feromonal” (Bushman e Burns, 1994). Em blenídeos

macho, a glândula anal liberta feromonas que são atractivas para as fêmeas (Barata *et al.*, 2002). Os peixes podem ainda libertar as feromonas via urina (Oliveira *et al.*, 1996; Rocha e Reis-Henriques, 1996; Yambe *et al.*, 2006), bilis (Truscott, 1983; Labadie e Buzinski, 2006), fluidos gonadais (Lambert *et al.*, 1986) ou brânquias (Vermeirssen e Scott, 1996). A urina pode ser libertada em pulsos (Curtis e Wood, 1991; Almeida *et al.*, 2005) e conter concentrações elevadas de compostos feromonais (Barata *et al.*, 2007).

1.2.1. Estímulos químicos

Os estímulos químicos utilizados pelos animais aquáticos são normalmente substâncias solúveis que são libertadas directamente na água. A sua difusão e transmissão é 10 000 vezes menor na água que em terra, reduzindo dramaticamente o espaço activo de recepção do sinal por parte do receptor, apoiando-se os peixes nas correntes da água, movimento do corpo, ventilação das brânquias, para que o composto se propague melhor (Rosenthal e Lobel, 2005).

As substâncias identificadas até agora utilizadas na comunicação química, detectadas pelos peixes são aminoácidos livres, esteróides sexuais, ácidos biliares e prostaglandinas (Laberge e Hara, 2001). A acção feromonal de esteróides, prostaglandinas e seus metabolitos (feromonas hormonais) está descrita para diversas espécies de peixes, como gobídeos, ciprinídeos e salmonídeos (Stacey, 2003), estando envolvidas na sincronização da reprodução dos peixes (Stacey e Sorensen, 2002). No entanto, a sua função feromonal sexual (desde a identificação da feromona, acção, quantidade e via de excreção) apenas está amplamente estudada principalmente em duas espécies: o peixe-vermelho (Sorensen *et al.*, 2005) e a lampreia (Li *et al.*, 2003; Yun *et al.*, 2003). Contudo, também se têm realizado ao longo do tempo estudos em outras espécies de peixes como peixe zebra, carpa e tilápia (Souza *et al.*, 1998; Kobayashi e Nakanishi, 1999; Gerlach, 2006).

1.2.2. Recepção dos estímulos químicos

Estando imersos no seu ambiente físico e químico, os peixes detectam estímulos químicos através de dois canais principais de quimiorrecepção, o paladar e o olfacto (Bardach e Villars, 1974), sendo as feromonas detectadas exclusivamente pelo sistema olfactivo (Handani e Doving, 2007). Nos teleósteos, os órgãos olfactivos estão

colocados normalmente na região dorsal da cabeça, entre a boca e os olhos (Bardach e Villars, 1974), não havendo contacto directo entre o sistema olfactivo e o respiratório (Hara, 2000b). A água, contendo o estímulo químico, forma uma corrente que passa pelos órgãos olfactivos, circulando na câmara olfactiva, através das narinas de entrada e saída de água (Zeiske *et al.*, 1992).

O sistema olfactivo contém três componentes neuroanatômicos: o epitélio olfactivo, os bolbos olfactivos e os terminais olfactivos no telencéfalo e hipotálamo. O epitélio olfactivo cobre a superfície da roseta olfactiva, localizada no par de cápsulas nasais, que contém células de suporte não sensoriais e neurónios primários sensoriais, também designados neurónios do receptor olfactivo (ORNs) (Valentincic e Koce, 2000). Estes dividem-se em três classes, ciliados (forma alongada, compridos), microvilosos (forma alongada, curtos) e *crypt* (forma ovoide), e respondem a informação de odores exteriores detectados pelo epitélio olfactivo (Morita e Finger, 1998; Hansen e Zielinski, 2005). Estes neurónios possuem finos axónios que terminam no bolbo olfactivo em estruturas sinápticas específicas, designadas glomérulos. Nestas estruturas, milhares de axónios fazem contacto com alguns neurónios secundários (células mitrais) que, por sua vez, são projectados para regiões mais centrais do cérebro, no telencéfalo e hipotálamo, através do tracto olfactivo medial (*medial olfactory tract* - MOT) e do tracto olfactivo lateral (*lateral olfactory tract* - LOT) (Fig. 5) (Hamdani e Doving, 2007). Pouco se sabe acerca do processamento da informação proveniente de odores, no entanto, acredita-se que o glomérulo olfactivo processa a identidade do odor através de um sistema de mapeamento espacial, suplementado por um esquema de codificação temporal (*temporal coding scheme*), como já observado em insectos (Laurent 1999). Existe também a possibilidade de odores com especial significado, como as feromonas, serem discriminados por receptores especializados e vias neuronais associadas (Stacey e Sorensen, 2002).

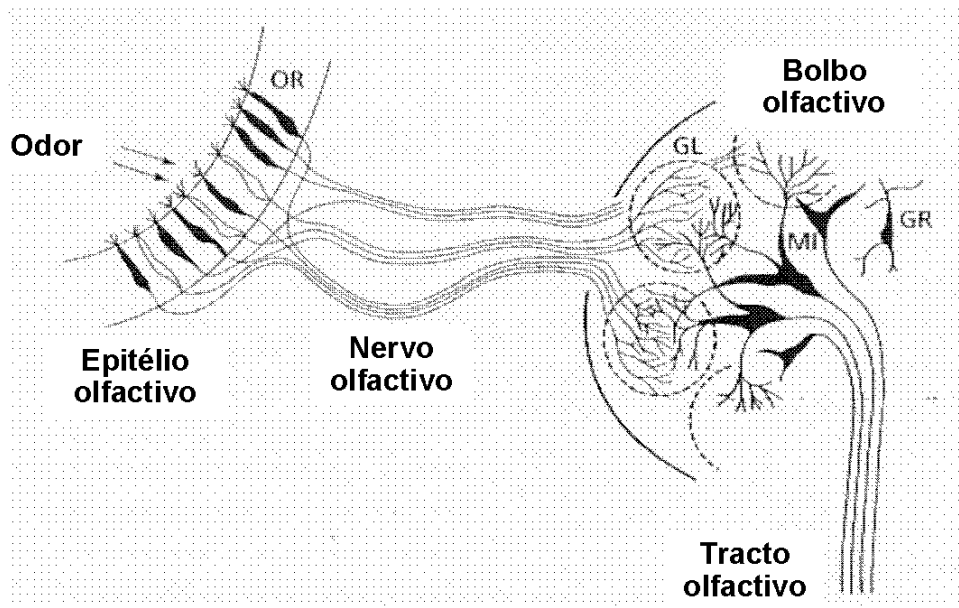


Fig. 5. Sistema olfativo periférico e organização neuronal no bulbo olfativo de um teleosteo. Células do receptor olfativo (OR) estão distribuídas ao acaso no epitélio olfativo. As ORs convergem no glomérulo olfativo (GL) localizado em regiões segregadas do bulbo olfativo e transmitem informação através das células mitrais (MI). GR, células granulares (Adaptado de Hara, 2000a).

A natureza e função das feromonas hormonais são conhecidas devido à utilização do Electro-olfactograma (EOG), que é a técnica mais utilizada para monitorizar respostas olfactivas a estímulos (Hara, 2000b). Esta técnica extracelular, mede alterações de voltagem transepitelial que representam a resposta total a todos os potenciais criados pelos vários receptores epiteliais (Fig. 6) (Hara, 1994; Scott e Scott-Johnson, 2002).

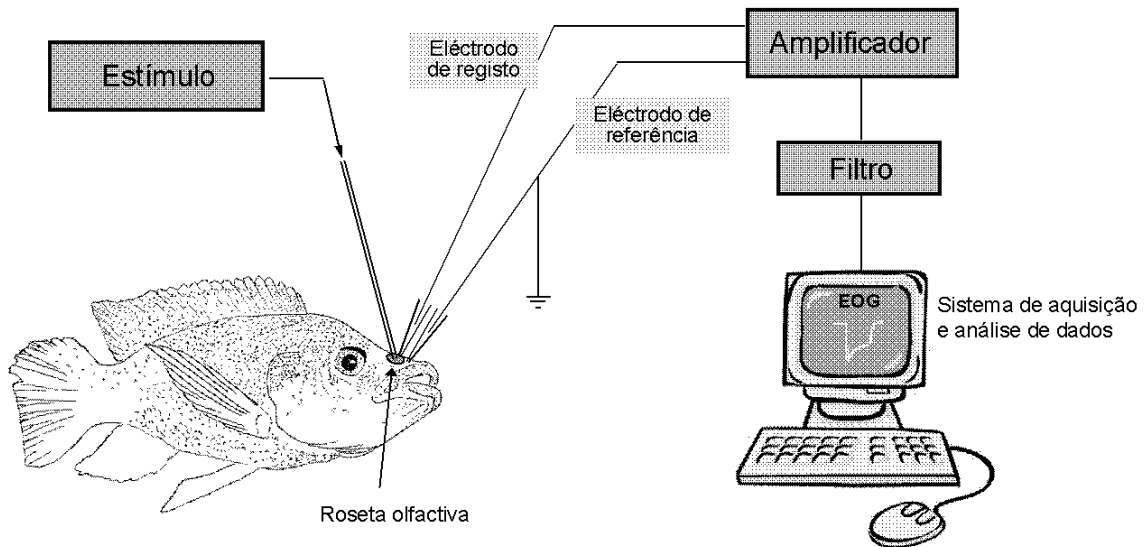


Fig. 6. Registo de um EOG num macho de tilápia. O peixe permanece anestesiado com MS222 dissolvido em água, que lhe irriga constantemente as brânquias. O estímulo é adicionado através de um tubo colocado perto do epitélio olfativo. A mudança na voltagem do epitélio olfativo é medida pelos registos do eléctrodo colocado junto do epitélio (eléctrodo de registo) e do eléctrodo colocado na pele junto à narina (eléctrodo de referência). A voltagem é amplificada e filtrada e o sinal gravado digitalmente.

Adrian e Ludwig (1938), foram os pioneiros em trabalhos de electrofisiologia no sistema olfativo e, desde então, os peixes têm sido organismos modelo em estudos de quimiorrecepção em geral (Silver *et al.*, 1976; Schneider *et al.*, 1999; Barata *et al.*, 2007).

Estudos electrofisiológicos mostram que esta técnica reflecte de forma exacta a sensibilidade e especificidade olfactiva do sistema olfativo a diferentes odores (Hubbard *et al.*, 2003; Siefkes e Li, 2004; Miranda *et al.*, 2005). Existem também estudos de ablação olfactiva (anosmia) que comprovam que o sistema olfativo medeia as respostas a feromonas sexuais, sendo extremamente sensível a estas (Pottinger e Moore, 1997; Kobayashi *et al.*, 2002; Saether *et al.*, 2007). No entanto, não se sabe se outros sistemas quimiossensoriais também detectam feromonas (Sorensen, 1992).

Esta técnica é bastante importante no estudo de feromonas hormonais pois permite determinar a sensibilidade e especificidade do órgão olfativo de uma espécie a uma ampla gama de odores e, quando combinada com estudos quantitativos de libertação de feromonas, permite a previsão do espaço activo de uma feromona no local onde é lançada (Sorensen *et al.*, 2000).

1.2.3. Resposta aos estímulos

A detecção de estímulos químicos evoca nos receptores respostas, incluindo procura de alimento (Derby e Sorensen, 2008), sinais de alarme (Smith, 1992; Speedie e Gerlai, 2008), percepção do tamanho dos indivíduos (Giaquinto e Volpato, 2005), migração (Sorensen *et al.*, 2003), predação (Brown e Godin, 1999) e reprodução (Barata *et al.*, 2008a). Na reprodução, a comunicação química permite o reconhecimento de conspecíficos (Moller e Serrier, 1986; Magurran e Ramnarine, 2004), reconhecimento da prole (Vives, 1988; Russock, 1990), percepção do estado reprodutivo (Souza *et al.*, 1998; Miranda *et al.*, 2005), sincronização física e fisiológica entre machos e fêmeas (Liley e Stacey, 1983) e ainda estabelecimento de hierarquias sociais e agregação entre machos (Cubitt *et al.*, 2008; Gonçalves-de-Freitas *et al.*, 2008).

1.3. Tilapia moçambicana

1.3.1. Biologia de *Oreochromis mossambicus*

A tilápia Moçambicana (Fig. 7), *Oreochromis mossambicus* (Peters, 1852) é um ciclídeo da ordem Perciformes, divisão Teleostei (Trewavas, 1983) originário de lagos e rios da costa Este de África (Bruton e Bolt, 1975), no entanto, após a sua introdução na aquacultura, evadiu-se para outros locais e estabeleceu-se noutros países da Ásia e América do Sul (Lowe-McConnell, 1991).

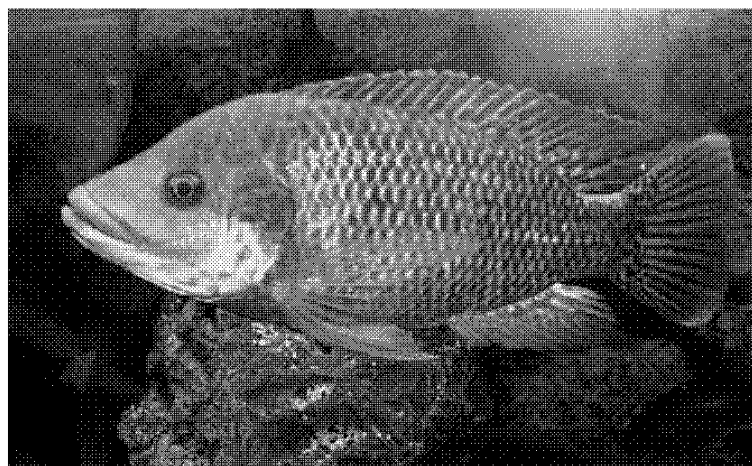


Fig. 7: Macho adulto de *Oreochromis mossambicus* (© Aldin Ekenberg, 2005).

Esta espécie é eurihalina e tolera temperaturas entre 8-42 °C, baixos níveis de oxigénio dissolvido na água e elevados níveis de dióxido de carbono, o que lhe permite viver numa ampla gama de habitats, desde rios equatoriais e subtropicais a pântanos, lagos, lagoas e estuários, estando limitada apenas pela profundidade da água, vivendo os adultos até 12m de profundidade (Bruton e Bolt, 1975).

A sua alimentação é essencialmente à base algas e fitoplâncton mas pode ser detritívora, herbívora, carnívora e, em espécimes de maiores dimensões, existem registos de canibalismo (De Silva *et al.*, 1984).

Os adultos têm normalmente 15-20 cm de comprimento, sendo o seu máximo registado de 39 cm (Wohlfarth e Hulata, 1983). O seu crescimento óptimo ocorre aos 30°C de temperatura (Price *et al.*, 1985) e existe um acentuado dimorfismo sexual, tendo os machos um crescimento mais rápido que o das fêmeas (Bruton e Bolt, 1975) e atingindo maiores dimensões para a mesma idade. Os machos possuem ainda as barbatanas anal e dorsal de maiores dimensões e maxilas mais robustas que as fêmeas (Oliveira e Almada, 1995).

Tal como na alimentação, esta espécie tem uma grande plasticidade na sua biologia reprodutiva. A maturidade sexual é atingida aos 15 cm de comprimento ou 4-6 meses de idade, mas peixes em cativeiro podem colocar posturas com apenas 6-7 cm ou 2 meses de idade (Cnaani e Hulata, 2008) e, acima de 22°C, podem-se reproduzir durante todo o ano. Durante a época de reprodução, os machos agregam-se em arenas, sobre substratos arenosos e fazem covas pouco profundas, denominadas áreas de desova ou *leks*, as quais defendem de eventuais intrusos (De Silva e Sirisena, 1988). As fêmeas por sua vez, escolhem um ou mais parceiros e desovam na(s) área(s) protegida(s) por este (s), recolhendo posteriormente os ovos fertilizados na boca para os incubar numa área separada dos *leks* (Barlow, 1991). Com o aproximar das fêmeas, os machos realizam comportamentos bastante característicos, como escavar o substrato, tremer ou circundar a fêmea (Baerends e Baerends van Roon, 1950).

É uma espécie de elevada importância comercial, tanto na pesca como na aquacultura, sendo conhecida devido ao seu sabor e facilidade de cultivo como a “galinha aquática” (Coward e Little, 2001). É também utilizada em aquarioria e pesca desportiva (Froese e Pauly, 2008).

A sua facilidade de cultivo devido à sua capacidade de adaptação a diversos ambientes e elevada reprodução fazem com que seja um importante modelo experimental, sendo cada vez mais utilizada em investigação científica em áreas como a

genética (Wang e Tsai, 2006), comportamento (Oliveira e Canário, 2000), reprodução (Coward e Bromage, 2000) e comunicação química (Almeida *et al.*, 2005).

1.3.2. Comportamento reprodutor e comunicação química em *Oreochromis mossambicus*

Segundo Liley e Stacey (1983), a terminologia “comportamento reprodutor” abrange todas as actividades envolvidas na reprodução. Em peixes teleósteos, os padrões de comportamento reprodutor vão desde a simples libertação de gâmetas na proximidade de conspecíficos, até interacções sociais complexas, que incluem defesa e preparação de ninhos ou territórios (Desjardins *et al.*, 2008), hierarquias, formação de pares (Sogabe e Yanigisawa, 2008), desova (Carolsfeld *et al.*, 1997) e cuidado parental (Bender *et al.*, 2008).

Em espécies com fertilização externa, podem-se distinguir dois tipos de comportamento: pré-desova e desova (Liley e Stacey, 1983). Comportamentos de pré-desova incluem actividades de corte, procura, atracção e excitação de um potencial parceiro sexual (Middaugh *et al.*, 1981). Podem ainda incluir respostas não sexuais como a preparação e defesa de um local de ninho ou território. Na desova, machos e fêmeas sincronizam directamente o seu comportamento para poderem coordenar a libertação dos gâmetas, seja na deposição dos ovos ou na libertação do esperma (Ripley e Lobel, 2005; Frisch *et al.*, 2007).

Em *O. mossambicus*, os machos estabelecem uma hierarquia social, em que os dominantes desenvolvem uma coloração escura e defendem agressivamente o seu *lek* (Miranda *et al.*, 2005). Em cativeiro, esta hierarquia pode ficar estabilizada durante vários dias (Turner, 1986; Oliveira e Almada, 1998). A existência desta hierarquia tem um efeito no seu sucesso reprodutivo, ocupando os machos territoriais locais mais centrais da arena, que são preferenciais das fêmeas (McKaye *et al.*, 1990)

Esta estrutura está positivamente correlacionada com os níveis de esteróides sexuais contidos na urina dos machos (Oliveira *et al.*, 1996; Oliveira e Almada, 1998), tendo os machos territoriais níveis mais elevados de esteróides sexuais, aumentando a sua taxa de libertação de urina quando se envolvem em disputas agressivas (Barata *et al.*, 2007). A urina dos machos dominantes (territoriais) constitui um odor mais potente para o sistema olfactivo, que a urina de machos subordinados (não territoriais) (Frade *et al.*, 2003) sabendo-se também que os machos dominantes armazenam mais urina na

bexiga que os subordinados. Verifica-se, deste modo, que a urina constitui um veículo de sinalização do seu *status* na hierarquia social (Oliveira e Almada, 1996). Por outro lado, os machos conseguem avaliar o estado reprodutivo das fêmeas através da detecção de substâncias libertadas na urina destas, e do auxílio de informação visual (Miranda *et al.*, 2005).

As fêmeas, por sua vez, têm uma grande sensibilidade olfactiva a substâncias libertadas na urina dos machos (Frade *et al.*, 2002) podendo assim avaliar a sua posição na hierarquia (Almeida *et al.*, 2005). Um estudo recente revela que as fêmeas têm uma elevada sensibilidade olfactiva a um composto aminoesterol sulfatado (*sulfated aminosterol-like*), presente em maior abundância na urina de machos territoriais que em não-territoriais (Barata *et al.*, 2008b). A urina contém, portanto, substâncias que funcionam como feromonas, permitindo aos machos sinalizar o seu *status* social, e aceder ao estado reprodutivo das fêmeas, sendo a sua detecção fundamental para o sucesso reprodutivo desta espécie.

1.4. Objectivo do trabalho

Os estudos realizados na espécie *O. mossambicus* indicam que a detecção de estímulos químicos veiculados particularmente pela urina de conspecíficos pode ser fundamental para o seu sucesso reprodutivo. A hipótese subjacente a este trabalho é que a anosmia (perda de olfacto) e consequente ausência de detecção de estímulos químicos, poderá induzir efeitos a nível reprodutor nos machos. Assim, o objectivo deste trabalho é avaliar o efeito da anosmia: 1) nos níveis de esteróides sexuais no plasma, 2) na maturação das gónadas e 3) na potência olfactiva da urina produzida pelos machos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção dos espécimes

Para este estudo foram utilizados machos adultos de *O. mossambicus* (Peters 1852), com cerca de 20 cm de comprimento, mantidos em famílias em laboratório (um macho para quatro fêmeas) para se tornarem e manterem territoriais. Os indivíduos foram colocados em aquários com aproximadamente 200l de água, a 27°C, arejamento contínuo, com uma janela de vidro e substrato de areia, fotoperíodo de 12h e alimentação com ração comercial para ciclídeos (Nutrafin basix[®]; Rolf C. Hagen, Inc., Montreal, Canada).

2.2. Indução de anosmia

Os machos foram anestesiados em água contendo 100mg.l⁻¹ de éster etílico de ácido 3-aminobenzóico (MS222), colocados num suporte almofadado em forma de V, enrolados em papel absorvente húmido de modo a cobrir todo o corpo a exceção da cabeça e opérculos. Durante a operação, os peixes foram anestesiados por via oral, com água contendo 100mg.l⁻¹ de MS222, através de um tubo de silicone colocado na boca, que mantinha as brânquias irrigadas. Com o auxílio de um bisturi, removeram-se os anéis cartilagueos circundantes das narinas e os dois epitélios olfactivos foram queimados com um cauterizador de ponta fina (modelo AA11, Aaron Medical Industries, Inc., St Petersburg FL, USA). Aos peixes foi aplicado posteriormente um anti-séptico local (Betadine[®], ASTA Medica Produtos Farmacêuticos, Lda, Lisboa, Portugal) nas narinas. Nos machos *sham*, o procedimento aplicado foi semelhante, no entanto, em vez de se cauterizar o epitélio olfactivo, fez-se a cauterização da pele à volta da narina, deixando o epitélio olfactivo intacto.

2.3. Recolha de urina e plasma

Para a recolha de fluidos corporais os machos foram ligeiramente anestesiados com MS222. A urina foi recolhida apertando gentilmente a área imediatamente acima e anterior à cavidade urogenital. O sangue foi retirado com o auxílio de uma seringa heparinizada por punção da veia caudal. As amostras de sangue foram centrifugadas a

3000 rotações por minuto (rpm), durante 5 min para separar o plasma, e colocadas individualmente em frascos de vidro e congeladas a -20°C. Nos machos controlo, as recolhas foram efectuadas na semana anterior à operação para se tornarem anósmicos ou *sham*. Nos machos tornados anósmicos ou *sham*, as recolhas foram efectuadas uma semana após as operações. No total, foram recolhidas 16 amostras de machos controlo, 12 amostras de machos anósmicos e 13 amostras de machos *sham*.

2.4. Quantificação de esteróides livres no plasma

2.4.1. Extracção de esteróides

A extracção de esteróides livres no plasma para posterior realização de Radioimunoensaios (RIAs) foi baseada no protocolo de Scott e Canário (1992). Para tal, foram utilizadas aliquotas de 100µl de plasma, recolhidas de machos controlo, anósmicos e *sham*, como anteriormente descrito. Os 100µl de plasma foram colocados em tubos de extracção, aos quais foram se adicionaram 3ml de éter dietílico e procedeu-se à sua agitação em vortéx durante 5 minutos. Os tubos foram posteriormente centrifugados a 200 rotações por minuto (rpm), 5°C, durante 5 minutos. Neste passo, formaram-se 2 fracções: uma orgânica, que continha os esteróides livres, e uma aquosa, com os restantes componentes do plasma. Para a separação das duas fracções, os tubos foram colocados em azoto líquido durante 10 segundos (congelando deste modo a fase aquosa) e o sobrenadante (com a fase orgânica) transferido para novos tubos de ensaio de vidro de 5ml que foram colocados em banho-seco, a 42°C, para evaporação do éter. Aos tubos de extracção, adicionaram-se novamente 3ml de éter dietílico, repetindo todos os passos até à evaporação a 42°C. Após a evaporação, ressuspenderam-se os esteróides livres em 1ml de tampão gelatina (0,5g gelatina, 0,50ml tampão fosfato, 500ml água desionizada), para posterior realização de RIAs para a testosterona (T), 11-cetotestosterona (11-CT) e cortisol (F).

2.4.2. Quantificação dos esteróides

A quantificação de esteróides livres no plasma foi feita através da técnica de Radioimunoensaio (RIA). Esta técnica envolve a ligação competitiva entre um antigénio não marcado radioactivamente - hormona que se quer quantificar, previamente existente na amostra - com um antigénio marcado radioactivamente - hormona marcada que é

adicionada à amostra em estudo - a um anticorpo de elevada afinidade, também ele adicionado à amostra. Quanto maior for a concentração de antigénio na amostra, menor a concentração de antigénio marcado que se liga ao anticorpo, menor a radioactividade medida no fim do ensaio (Fig. 8).

Para a realização desta técnica, numeraram-se tubos de plástico (Sarstedt Ref^a 73.1055) em duplicado e estes foram colocados num suporte metálico (Sarstedt Ref^a 95.1012) da seguinte forma: Padrões: S1-S12; Branco: B; Máximo: M; Total: T; Controlo1: C1; Amostras: 1-79; Controlo2: C2. Para a obtenção das concentrações de esteróides, realizou-se uma curva padrão obtida a partir de uma solução Stock da hormona a determinar, de 0,5mg/ml etanol. A partir desta solução, realizaram-se diversas diluições com tampão gelatina de modo a que os tubos S1-S12 ficassem com as concentrações finais de: 500, 250, 125, 100, 50, 25, 10, 5, 2.5, 2, 1 e 0.5 pg/tubo num volume total de 100µl. Também aos tubos B, M e T foram adicionados 100µl de tampão gelatina. Aos tubos 1-79, adicionaram-se 100µl das diferentes amostras de hormonas esteróides previamente extraídas do plasma. Aos tubos C1 e C2 adicionou-se a mesma composição que o padrão S6, para verificar que não ocorriam alterações nas concentrações ao longo do tempo, aquando da adição de carvão activado às amostras. Preparou-se uma solução com hormona marcada - T, 11-CT ou F (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK), de modo a que em 100µl da solução marcadora tivessem pelo menos 1500 contagens por minuto (cpm) no contador de cintilações. Adicionaram-se 100µl desta solução aos tubos B. Posteriormente, adicionou-se à solução o anticorpo correspondente à hormona em questão, de modo a que a sua concentração ficasse na diluição à qual se verifica 50% de ligação máxima (Max. Binding 50%). Adicionaram-se 100µl desta solução a todos os tubos, excepto aos tubos B. Deixaram-se as placas com os tubos a incubar durante a noite no frigorífico. Preparou-se uma solução de carvão activado com 0,0825g de dextrano e 0,825g de carvão activado em 55ml de tampão gelatina. Também esta solução ficou durante a noite no frigorífico. Adicionaram-se posteriormente 250µl de solução de carvão activado a todos os tubos, excepto aos tubos T aos quais se adicionou 250µl de tampão gelatina. 12 minutos após se ter iniciado a adição do carvão activado, centrifugaram-se os tubos durante 12 minutos, a 2000rpm, a 4°C. Após a centrifugação, transferiu-se o líquido contido nos tubos do ensaio para tubos de cintilação (Sarstedt 73.680 HD-PE) e adicionaram-se 4ml de líquido cintilante (Ecolite, ICN Biochemicals, Costa Mesa) a

cada um. Os tubos foram posteriormente levados para o contador de cintilações Beckman (Beckman Instruments Inc., Fullerton, CA), onde cada tubo foi posto a contar durante 3 minutos, na gama de radiação β , sendo o resultado obtido em contagens por minuto e posteriormente convertido para ng/ml através de uma folha de cálculo.

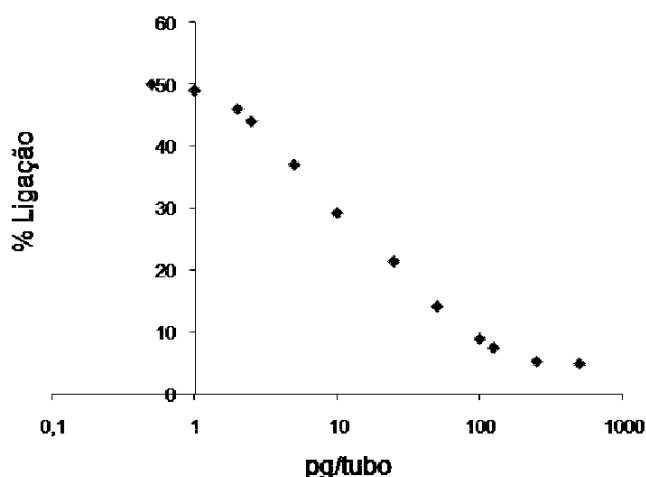


Fig. 8. Exemplo de uma curva padrão de um RIA, mostrando percentagem de ligação da hormona ao anticorpo (% Ligação) em função da concentração de hormona dos tubos padrão (pg/tubo).

Nos tubos, o antígeno marcado (Ag^*) compete com o antígeno não marcado (Ag) da amostra pelos locais de ligação no anticorpo (Ac). Quanto maior a quantidade de Ag na amostra, maior a quantidade de Ag^* que fica livre nos tubos. Ao se adicionar carvão activado às amostras, este vai ligar-se ao Ag^* livre e deste modo separar-se do complexo Ag^*-Ac em suspensão. Assim, quando se leva as amostras para o contador de cintilações, as amostras com maior quantidade de Ag vão ter menor cintilação, devido ao Ag^* ter ficado aderido ao carvão activado e ser este o causador da cintilação nos tubos.

2.5. Recolha e histologia das gónadas

Para as análises histológicas, sacrificaram-se 13 machos controlo (não operados), 13 anósmicos e 9 *sham* e removeram-se os testículos, fazendo uma incisão na região ventral, desde a cloaca até à região do opérculo e retirando, com o auxílio de um bisturi, os órgãos em questão. No caso dos machos anósmicos e *sham* retiraram-se as gónadas dos machos 15 e 30 dias após a operação. Os testículos foram divididos nas regiões anterior e posterior, sendo estas guardadas separadamente em cassetes, fixadas

em solução de Bouin e, após 24h, colocadas em etanol 70%. As cassetes contendo os testículos foram colocadas num copo metálico, colocadas num processador de tecidos no qual foram sujeitas ao seguinte programa de desidratação e impregnação: 1-etanol 70%, 10 min; 2- etanol 95%, 30 min; 3- etanol 95%, 30 min; 4- etanol 100%, 1h; 5- etanol 100%, 1h; 6- 50%Xilol/50% Etanol, 1h; 7- Xilol 100%, 1h; 8- Xilol 100%, 1,5h; 9- 50%Parafina/50% Xilol, 2h; 10- Parafina 100%, 2h. Após terem passado pelo processador de tecidos, incluíram-se as amostras em blocos de parafina, e com o auxílio de um micrótomo, efectuaram-se secções de 7 μ m, sendo estas posteriormente colocadas em lâminas. A desparafinação, rehidratação, coloração com Hematoxilina-Eosina, desidratação e montagem foram feitas da seguinte forma: 1- Xilol I, 15 min; 2- Xilol II, 15 min; 3- Etanol 100%, 5 min; 4- Etanol 95%, 5 min; 5- Etanol 70%, 5 min; 6- Água destilada, 5 min; 7- Hematoxilina de Harris, 30 segundos; 8- Água corrente da torneira, 10 min; 9- Água destilada, 5 min; 10- Eosina, 30 segundos; 11- Água destilada/2gotas ácido acético, 2 min; 12- Etanol 70%, 5 min; 13-Etanol 95%, 5 min; 14- Etanol 100%, 5 min; 15- K-Clear I, 10 min; 16- K-Clear II, 10 min. Procedeu-se então à montagem das lâminas com DPX (resina) e estas foram deixadas a secar *o/n*. Os tecidos foram posteriormente analisados ao microscópio óptico procedendo-se à identificação e contagem do número de células germinais existentes em cada lóbulo, contabilizando as células existentes em seis lóbulos por campo de visão, num total de 3 campos diferentes. Baseado no estudo de Schulz *et al* (2005) foram identificados os seguintes tipos de células: Espermatogónia A (Spg A), Espermatogónia B (Spg B), Espermatócito I (Spc I), Espermatócito II (Spc II), Espermatídio (Spd), Espermatozóide (Spz) e ainda se identificaram e contabilizaram as células somáticas de Sertoli e de Leydig, bem como o número de grupos (*clusters*) de células de Leydig.

2.6. Medição da potência olfactiva da urina

A potência olfactiva da urina foi medida através de EOGs realizados em machos de *O. mossambicus* com cerca de 20cm de comprimento, provenientes de um *stock* em laboratório.

2.6.1. Preparação dos estímulos de urina

Os estímulos foram preparados no dia da experiência, utilizando frascos de vidro lavados previamente com água acidificada, sendo as amostras de urina descongeladas e

diluídas em água da torneira desclorada e filtrada por carvão, de modo a que a sua concentração final fosse de 1:10 000 (v/v).

2.6.2. Registo dos EOGs

Para a medição da potência olfactiva da urina de machos de tilapia, procedeu-se à gravação de EOGs segundo o método utilizado por Hubbard *et al* (2002). Os machos controlo foram anestesiados por imersão em água contendo 150mg.l^{-1} de anestésico MS222 e imobilizados com uma injeção intramuscular de galamina (3mg.kg^{-1} em 0,9% solução salina), um bloqueador neuromuscular. Os peixes foram envolvidos em papel absorvente húmido e colocados num suporte almofadado em forma de V, e as brânquias irrigadas com água contendo MS-222 50mg.l^{-1} , através de um tubo de silicone colocado na boca. Com o auxílio de um bisturi, removeu-se um dos anéis cartilagueos circundante de uma das narinas. O epitélio olfactivo foi continuamente irrigado com água desclorada da torneira filtrada por carvão, via um sistema de gravidade (6ml.min^{-1}) que terminava num pequeno tubo de vidro, colocado perto da roseta olfactiva. A irrigação foi mantida até ao final da experiência. O sinal da voltagem foi amplificado através de um pré-amplificador DC e *head-stage* (NL102, Digitimer Ltd, Welwyn Garden City, UK) e subsequentemente filtrado acima de 50 Hz (NL125, Digitimer Ltd) e amplificado (NL106, Digitimer Ltd, Welwyn Garden City, UK: amplificação final 1000x). O sinal foi então digitalizado (DigiData 1322A, Molecular Devices Ltd., Wokingham, Berkshire, UK) e gravado no computador, pelo *software* AXOSCOPE versão 9.2 (Molecular Devices Ltd., Wokingham, Berkshire, UK.) Os eléctrodos foram feitos a partir de pipetas de vidro de borossilicato, preenchidas com 0.9% NaCl/4% agar (diâmetro da ponta 80-100 μm) e introduzidas num suporte de microeléctrodos, cheio com KCl 3M, que fez a ligação a uma ponte salina de Ag/AgCl. O eléctrodo gravador foi colocado perto do epitélio olfactivo na região central enquanto que o eléctrodo de referência foi suavemente colocado na pele junto à narina e ligado a terra através da sonda do amplificador.

2.6.3. Adição dos estímulos

As soluções que continham os estímulos foram introduzidas na corrente de água que irrigava o epitélio olfactivo do peixe, através de uma válvula de 3 vias por um período de 4s. Os estímulos foram dados com pelo menos um intervalo de um minuto,

para que houvesse lavagem completa da cavidade nasal de modo a evitar possíveis efeitos de acomodação aos estímulos. Estímulos de branco (solução que continha apenas a água que irrigava o epitélio durante a experiência) e solução padrão de L-serina 10^{-5} -M foram dados em intervalos regulares (a cada 6 amostras) durante o período de registos para verificar que o peixe não perdia a sensibilidade olfactiva ao longo da experiência. O EOG resultante foi gravado num computador contendo o *software* apropriado (Axoscope 1.1, Axon Instruments, Inc., Foster City, CA, USA). Cada amostra foi testada três vezes, em três peixes diferentes.

2.6.4. Normalização das respostas olfactivas

A amplitude do pico da fase inicial de cada EOG foi medida em milivolts. A média da 1ª e 2ª respostas ao branco foi subtraída às respostas de cada estímulo, e também à resposta à L-serina 10^{-5} -M. Após isso, os valores obtidos para cada estímulo foram divididos pela resposta à L-serina 10^{-5} -M (já subtraída pelo valor do branco), obtendo-se deste modo a resposta normalizada. Após a normalização das respostas, procedeu-se à realização da média dos três valores obtidos para cada amostra.

2.7. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm SEM (erro padrão). Sempre que necessário, os dados foram transformados (Log) de forma a obter homogeneidade de variâncias e distribuição normal. Aplicou-se o teste ANOVA unifactorial, seguido dos testes de Tukey e Dunnett para comparação *post-hoc* entre grupos. O nível de significância considerado foi de 5% ($P < 0,05$). Para todos os testes estatísticos foi utilizado o *software* Sigma Stat 3.1 (Systat Software, Inc.).

3. RESULTADOS

3.1. Níveis de esteróides no plasma

Nos níveis de esteróides no plasma verificou-se uma diminuição significativa na concentração de T (Fig. 9A) nos machos anósmicos e *sham* 7 dias após terem sido operados, $2,71 \pm 0,40$ ng/ml e $2,84 \pm 0,30$ ng/ml, respectivamente, quando comparados com os machos controlo, $4,41 \pm 0,30$ ng/ml.

Para a hormona 11-CT (Fig. 9B), o padrão foi semelhante, havendo também uma diminuição significativa da sua concentração nos machos anósmicos ($2,30 \pm 0,52$ ng/ml) e *sham* ($3,4 \pm 0,57$ ng/ml) em comparação com os machos controlo ($5,50 \pm 0,57$ ng/ml).

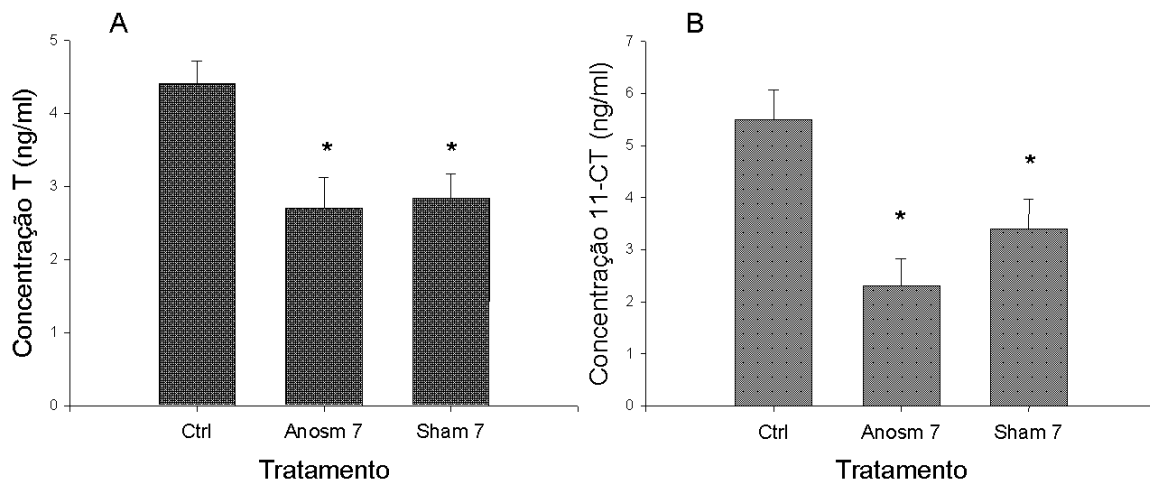


Fig. 9. Concentrações de testosterona e 11-cetotestosterona no plasma de machos controlo, anósmicos e *sham* 7 dias após tratamento. Dados expressos em Média±SEM. Asteriscos indicam diferenças significativas (ANOVA, P<0,05).

É possível observar (Fig. 10) um aumento significativo dos níveis de cortisol nos machos anósmicos ($46,30 \pm 6,60$ ng/ml) comparativamente aos machos controlo ($20,90 \pm 3,84$ ng/ml). Nos machos *sham* também houve um aumento dos níveis de cortisol ($35,30 \pm 6,39$ ng/ml), no entanto, estatisticamente, esta diferença não foi significativa.

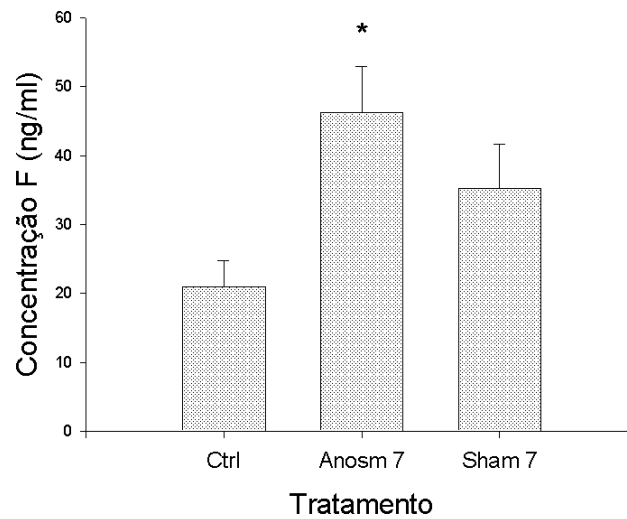


Fig. 10. Concentração de cortisol no plasma de machos de tilápia controle, e anósmicos e *sham* 7 dias após tratamento. Dados expressos em Média±SEM. Asterisco indica diferença significativa (ANOVA, $P<0,05$).

3.2. Histologia das gónadas

3.2.1. Morfologia interna

Na figura 11A, podem-se observar lóbulos do testículo de um macho controle, onde existem células germinais em diferentes estados de desenvolvimento. O lóbulo em maior ampliação (Fig. 11B) apresenta os diferentes tipos de células germinais, desde espermatogônias até espermátídios na periferia e espermatozóides no interior. Nesta figura é possível observar um célula de Sertoli (Sc) e *clusters* com células de Leydig.

Nos testículos de machos anósmicos, e nos *sham*, em menor escala, verifica-se um retrocesso na espermatogênese, com progressiva perda de células germinais e somáticas. Nas figuras 11C e D, observam-se diversos lóbulos de machos *sham*, 15 e 30 dias após terem sido operados, respectivamente. É possível observar uma separação das células germinais da periferia dos lóbulos, havendo a criação de um espaço entre a membrana do lóbulo e os cistos que contêm os diferentes tipos de células. Observa-se ainda a existência de matriz fibrosa (Mf) na região que contém espermatozóides. Nos lóbulos de testículos de machos anósmicos 15 dias após operação (Fig. 11E), há igualmente uma separação das células da periferia dos lóbulos, sendo esta ainda mais acentuada. É possível observar mais uma vez a matriz fibrosa na região que contém

espermatozoides e um estreitamento do tecido conjuntivo presente entre os lóbulos. 30 dias após a operação o padrão mantém-se, continuando a existir matriz fibrosa no interior dos lóbulos e, em alguns casos (Fig. 11F), estes encontram-se pouco definidos, sem células germinais no interior, existindo apenas células de Leydig na região intersticial.

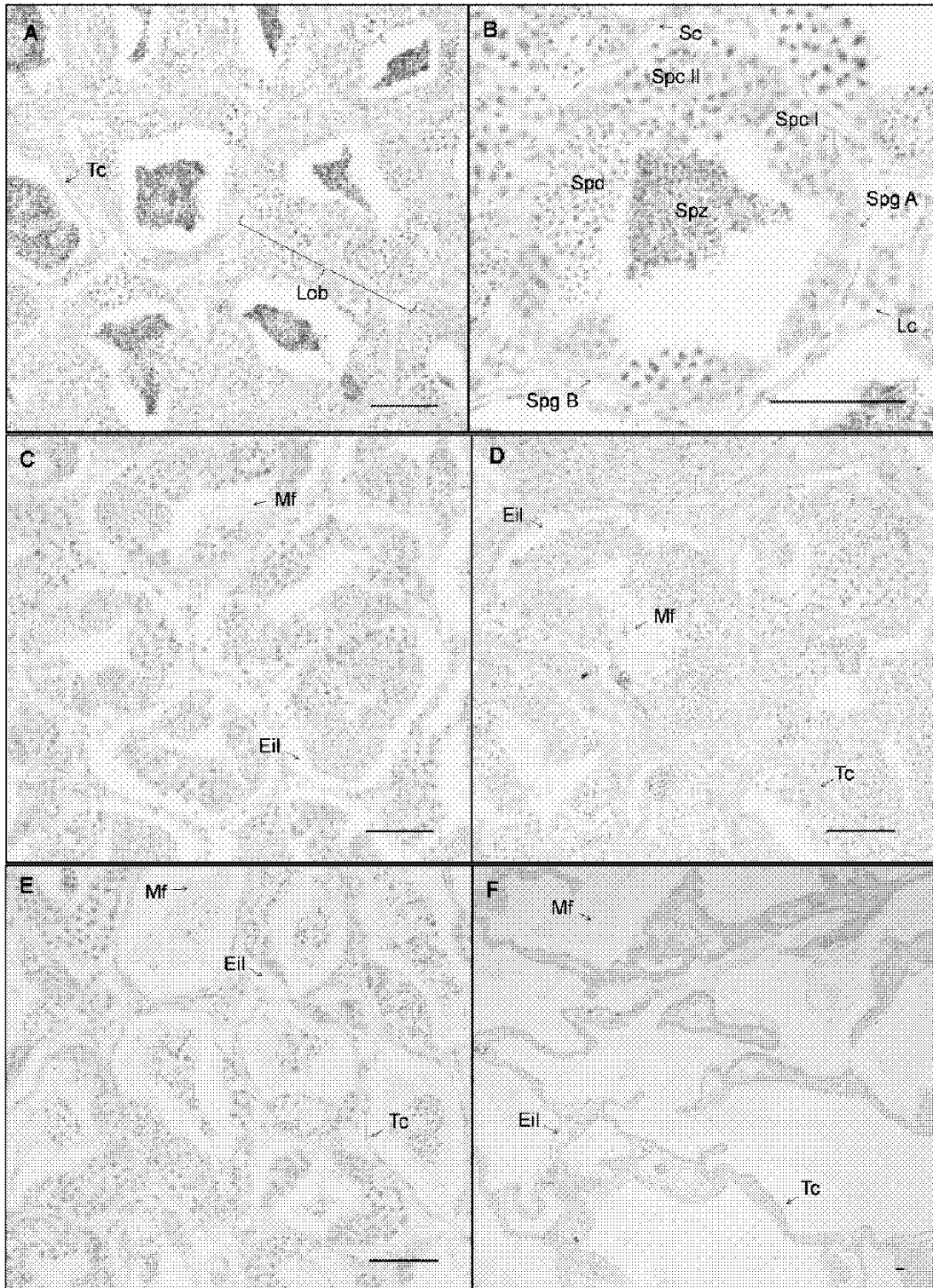


Fig. 11. Secções transversais de testículos de *O. mossambicus*, evidenciando os seus lóbulos. A) Lóbulos de um macho controle. B) Lóbulo de um macho controle contendo cistos com células germinais em diferentes estados de desenvolvimento e células somáticas. C) e D) Machos *sham*, 15 e 30 dias após a operação, respectivamente; evidência de um espaço intra-lobular (Eil) entre os cistos e a membrana dos lóbulos e matriz fibrosa (Mf) no lúmen central. E) Macho anósmico, 15 dias após a operação. F) Macho anósmico 30 dias após operação; lóbulos quase indistintos e ausência de células germinais. Lob-Lóbulo; Tc- tecido conjuntivo; SpgA- espermatogónia A; Spg B- espermatogónia B; Spc I- espermatócito primário; Spc II- espermatócito secundário; Spd- espermátídio; Spz- espermatozóide; Sc- célula de Sertoli; Lc- célula de Leydig. Barra de escala= 50µm.

3.2.2. Contagem de células somáticas e germinais nos testículos

3.2.2.1. Região anterior

Na região anterior dos testículos (Fig. 12) verifica-se uma diminuição (não significativa) no número de lóbulos 15 e 30 dias após os indivíduos terem sido operados, com cerca de 12 lóbulos por campo de visão, quando comparados com o grupo controlo, com uma média de 16 lóbulos. Quanto aos *clusters* de células de Leydig também se observa uma diminuição nos grupos operados, no entanto só os grupos controlo e anósmico 15 são estatisticamente diferentes. No número de células de Leydig por *cluster*, verifica-se um aumento significativo nos *sham* 15, com 15 células/*cluster*, tendo-se mantido relativamente constante nos restantes grupos, com cerca de 10 células. Nas células de Sertoli, há uma diminuição estatisticamente significativa nos grupos *Sham* quando comparados com o grupo controlo, de 0,6 células para 0,1. Nos anósmicos há uma ligeira diminuição, mas esta não é significativa.

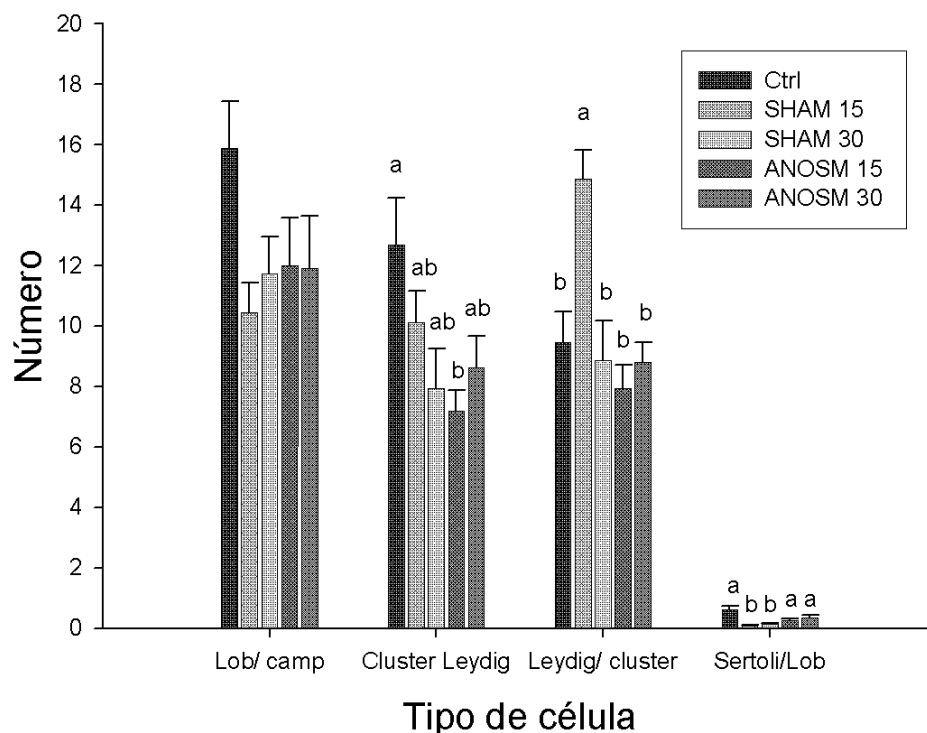


Fig. 12. Número de lóbulos e clusters de Leydig por campo de visão, e células somáticas de Leydig/cluster e de Sertoli/lóbulo na região anterior dos testículos de *O. mossambicus*. Dados expressos em Média±SEM. Letras indicam diferenças significativas (ANOVA, P<0,05). CTRL - machos controlo; SHAM 15/30 - machos sham 15/30 dias após a operação; ANOSM 15/30 - machos anósmicos 15/30 dias após a operação.

Na figura 13, referente ao número médio de células germinais por lóbulo, verifica-se um número reduzido de Spg A e Spg B em todos os grupos, em comparação com as restantes células germinais. Quanto aos Spc I, há uma tendência para o aumento do número de células nos indivíduos tratados, em relação ao grupo controlo, que é significativa apenas no grupo *sham15*, de 19 para 28 células por lóbulo. Para os Spc II, verifica-se uma diminuição generalizada destas, do grupo controlo para os restantes, especialmente nos anósmicos, apesar de não serem estatisticamente diferentes. Nas Spd, o mesmo padrão é visível, à excepção do grupo *sham 15*, onde o número aumentou. Nos Spz, há um aumento do número de células nos *sham15* e anósmicos 30 e uma diminuição nos *sham 30*, mantendo-se o número nos anósmicos15. Apesar de existirem estas variações, elas não são estatisticamente significativas.

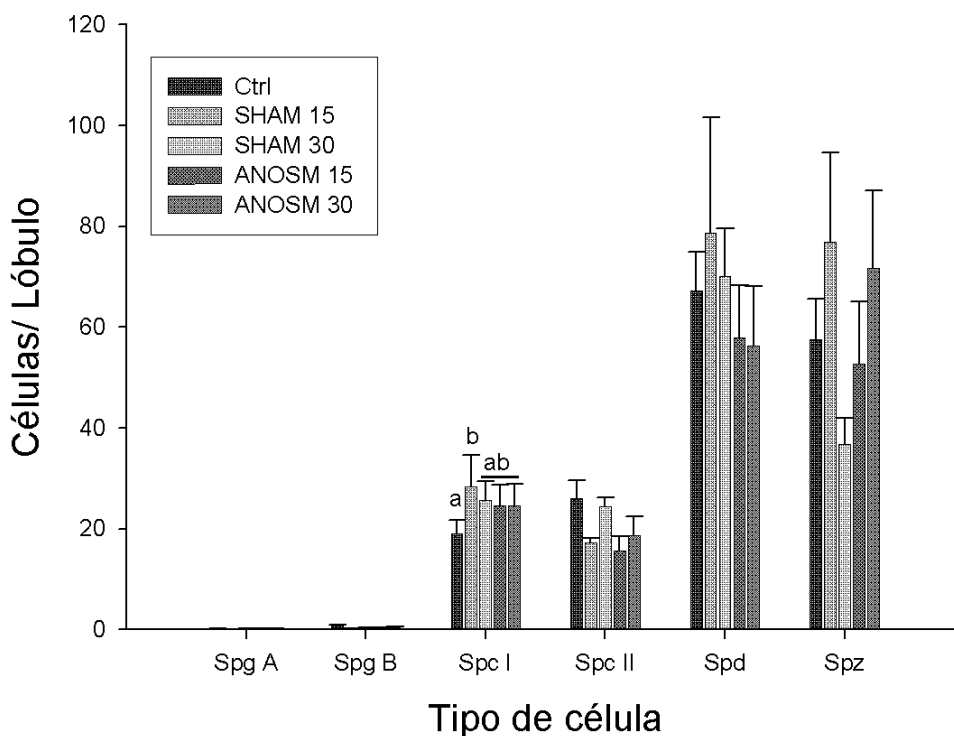


Fig. 13. Células germinais por lóbulo, na região anterior dos testículos de *O. mossambicus*. Dados expressos em Média±SEM. Letras indicam diferenças significativas (ANOVA, $P < 0,05$). Ver legenda na figura 12.

3.2.2.2. Região posterior

Na região posterior dos testículos, há uma diminuição significativa no número de lóbulos por campo de visão (Fig. 14), de 25 no grupo controlo, para 10 a 15, nos grupos operados, sendo este número mais baixo nos anósmicos 30. O número de *clusters* de células de Leydig não varia muito do grupo controlo para os restantes, mas verifica-se uma diminuição generalizada ao longo do tempo. É possível observar uma redução no número de células de Leydig/*cluster* nos anósmicos, principalmente no dia 30. Relativamente às células de Sertoli/lóbulo, há uma diminuição significativa do grupo controlo, para os restantes, de 1 para 0,2 células por lóbulo.

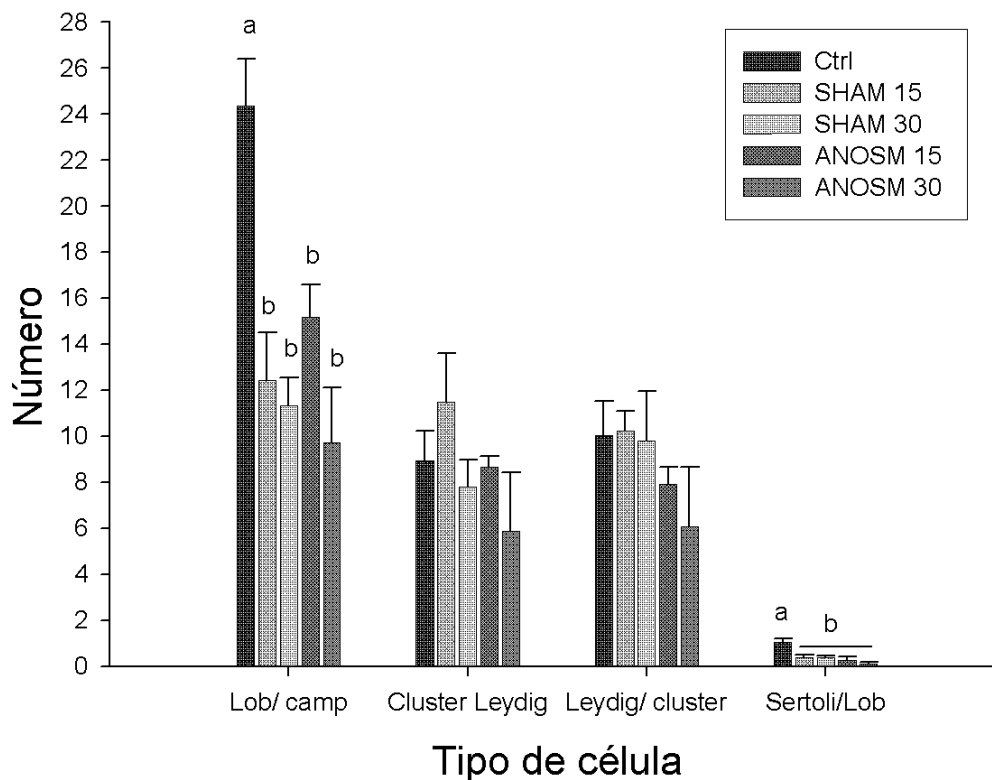


Fig. 14. Número de lóbulos e clusters de Leydig por campo de visão, e células somáticas de Leydig/*cluster* e de Sertoli/lóbulo na região anterior do testículo de *O. mossambicus*. Dados expressos em Média±SEM. Letras indicam diferenças significativas (ANOVA, P<0,05). Ver legenda na figura 12.

A figura 15 apresenta o número médio de células germinais contadas na região posterior dos testículos. Observa-se uma diminuição significativa das Spg A do grupo controlo para o grupo anósmico 30. Nas Spg B há uma diminuição generalizada do

grupo controlo para os restantes, de 1,4 células para 0,4. Para as Spc I, é possível observar um ligeiro aumento no número de células nos grupos tratados, especialmente nos *Sham*, no entanto, este aumento não é significativo. Nas Spc II, não se verificam alterações em nenhum dos grupos, tendo-se mantido uma média de 20 células/ lóbulo. Apesar de não serem estatisticamente diferentes, verifica-se uma diminuição no número médio de Spd, que varia entre 60 no grupo controlo e 40 células/lóbulo no grupo anósmico 30. Quanto aos Spz, não há diferenças significativas estatisticamente entre o grupo controlo e os restantes, mas é possível observar uma diminuição no número de células entre os dias 15 e 30, para os grupos operados.

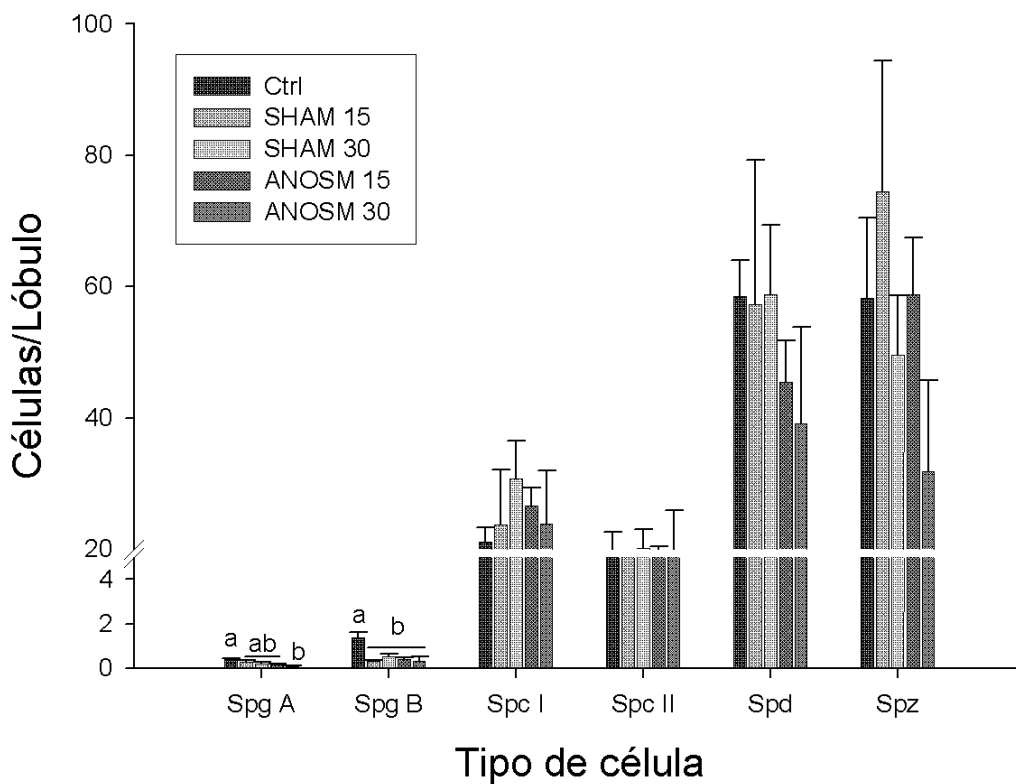


Fig. 15. Células germinais por lóbulo, na região posterior do testículo de *O. mossambicus*. Dados expressos em Média±SEM. Letras indicam diferenças significativas (ANOVA, P<0,05). Ver legenda na figura 12.

3.3. Respostas olfactivas à urina de machos

As respostas olfactivas à urina de machos de tilápia tiveram a forma típica de EOGs em peixes (Fig.16): uma deflexão negativa acentuada no início do estímulo aquando da sua chegada ao epitélio olfactivo seguida de um período onde a amplitude

diminuiu para cerca de 50% e foi diminuindo posteriormente enquanto o estímulo foi aplicado até voltar à linha de base quando o estímulo cessou.

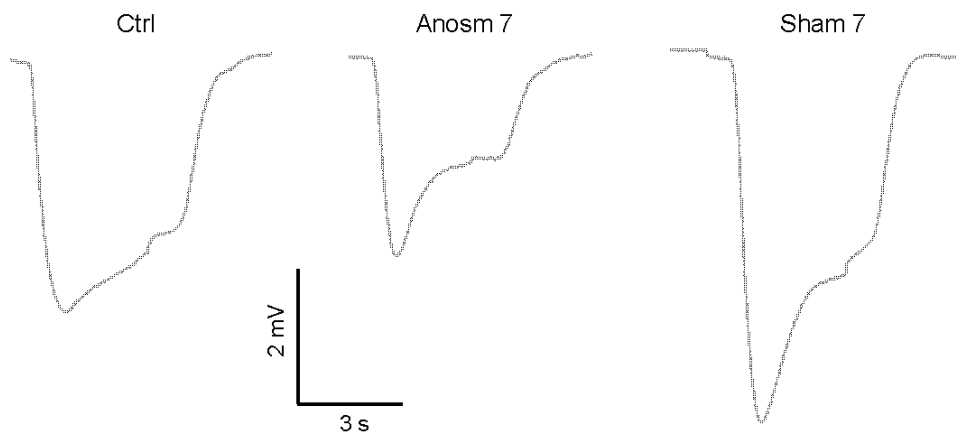


Fig. 16. Respostas típicas de EOGs de machos de tilápia a estímulos de urina 1:10 000 (v/v) de machos controlo, anósmicos e *sham* 7 dias após a operação, aplicados ao mesmo peixe.

Os estímulos de urina provocaram EOGs de amplitudes normalizadas variadas (entre 0,21 e 2,51), mas o padrão manteve-se constante de macho para macho. Verifica-se que a média de respostas olfactivas normalizadas (Fig. 17) às amostras de urina de machos anósmicos a uma diluição de 1:10 000 ($0,63 \pm 0,1$, $N=16$, $P<0,05$) é estatisticamente diferente das respostas à urina de machos controlo ($0,94 \pm 0,09$, $N = 30$, $P<0,05$). Nos machos *sham* ($1,13 \pm 0,14$, $N = 15$, $P<0,05$), verifica-se um aumento na média da potência olfactiva, no entanto, este não é significativo.

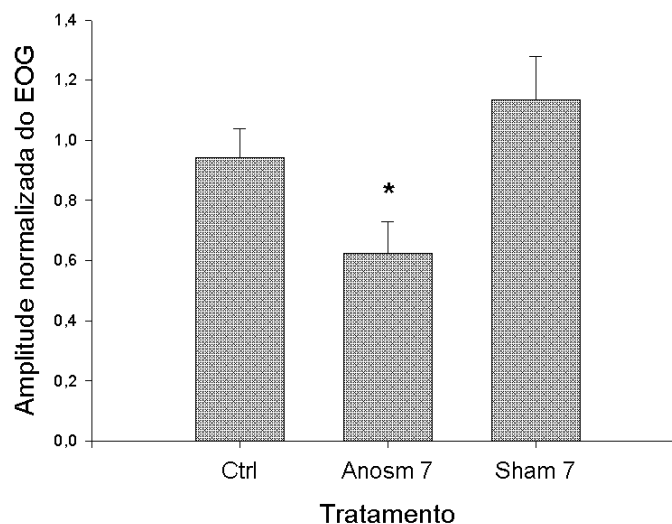


Fig. 17. Respostas olfactivas de machos de tilápia a estímulos de urina (1:10 000 v/v) de machos controlo, anósmicos e *sham* 7 dias após tratamento. Dados corrigidos com branco e normalizados para amplitude de resposta a $1:10^{-5}$ L-serina, expressos em Média±SEM. Asterisco indica diferenças significativas (ANOVA, $P<0,05$).

4. DISCUSSÃO

A ausência da detecção de estímulos químicos devido à anosmia permitiu verificar efeitos a nível endócrino, a nível da gametogénese e na potência olfactiva da urina de machos de tilápia Moçambicana.

Em relação aos níveis de androgénios no plasma, verificou-se que os valores obtidos para T variaram entre 2,7 ng/ml (machos anósmicos) e 4,4 ng/ml (machos controlo) sendo mais baixos que os reportados para esta espécie em cativeiro, que variam entre 6-13 ng/ml (Rocha e Reis-Henriques, 1996), no entanto, os valores obtidos encontram-se dentro dos valores conhecidos para a espécie em ambiente natural, que variam entre 1 e 12 ng/ml (Cornish, 1998). Para a 11-CT, os valores determinados variaram entre 2,3 e 5,5 ng/ml encontrando-se dentro da gama dos valores conhecidos para a espécie, entre 0,5 e 6,7 ng/ml (Ros *et al.*, 2004).

Em ambos os esteróides, verifica-se uma diminuição significativa da sua concentração no plasma, do grupo controlo para os grupos anósmico e *sham* 7 dias após a operação. Uma explicação para esta diminuição pode ser a interferência no funcionamento do eixo HPG devido à ausência da detecção de estímulos químicos através do olfacto pois, deste modo, não há indução no hipotálamo da produção de GnRH para posterior libertação de FSH e LH na pituitária que por sua vez irão promover a produção de esteróides nas gónadas (Weltzien *et al.*, 2004). Tal fenómeno também já foi verificado na espécie *Salmo trutta*, onde houve uma diminuição da concentração de esteróides no plasma de machos 24 horas após se terem tornado anósmicos (Olsén *et al.*, 1998).

Enquanto que a diminuição nos níveis de androgénios nos machos é interpretável, nos machos *sham* essa diminuição parece ser menos compreensível. O facto de ter havido também uma diminuição dos níveis de T e 11-CT nos machos *sham* indica que, de algum modo o seu epitélio olfactivo ficou comprometido, provavelmente devido a uma cauterização deficiente, que deve ter danificado parcialmente o epitélio olfactivo, levando a um perda parcial ou total do olfacto nos peixes deste grupo. A cauterização da pele circundante da narina feita aos machos *sham* apenas tinha como objectivo comprovar que a anosmia se devia ao facto de o epitélio olfactivo ter sido destruído e não à operação em si.

Os níveis de cortisol variaram entre 20 e 60 ng/ml nos três grupos, encontrando-se dentro da gama de valores de cortisol para esta espécie, que variam entre 25 e

100ng/ml (Vijayan *et al.*, 1997; Dean *et al.*, 2003), sendo de 45ng/ml à temperatura de 28°C (Fiess *et al.*, 2007). Nos machos anósmicos, o valor médio foi significativamente mais elevado quando comparado com o grupo controlo e nos machos *sham* foi também superior mas não estatisticamente diferente. O cortisol é o indicador mais utilizado para verificar a existência de stress em peixes (Wendelaar Bonga, 1997). A sua regulação faz-se pelo eixo hipotálamo-pituitária-interrenal – eixo HPI (Mommsen *et al.*, 1999) e é considerado um processo que acopla a percepção pelo peixe do agente stressante, bem como a memória de experiências anteriores no processo que organiza a resposta ao stress (Chandroo *et al.*, 2004). Uma vez que os peixes anósmicos foram amostrados no dia da operação e 7 dias depois para recolha do plasma, o aumento dos seus níveis de cortisol pode ter reflectido uma situação aguda de stress originada pelo processo de manuseamento dos animais e não uma situação de stress devido à operação realizada nos peixes. Este facto é suportado pelo facto de os machos *sham* também terem sido submetidos a uma cauterização e não terem aumentado significativamente os seus níveis de cortisol. No entanto, os dados existentes não permitem comprovar estas hipóteses uma vez que só se realizou uma medição da concentração de cortisol e sabe-se que não é suficiente para aceder à condição dos peixes em relação ao stress (Mormède *et al.*, 2007). A interpretação do possível efeito stressante da operação e/ou do manuseamento dos animais aquando da recolha de sangue poderia ser esclarecida se se tivessem realizado recolhas de plasma para análise de cortisol logo após a operação e em intervalos regulares e durante um período de tempo mais alargado em todos os grupos experimentais incluindo o grupo controlo. Poder-se-ia também utilizar um método não invasivo de medição de esteróides, como por exemplo medir a sua concentração na água em que os peixes se encontravam durante a experiência (Scott e Ellis, 2007), evitando deste modo a possibilidade de ocorrência de stress devido à amostragem pelo manuseamento dos animais.

O aumento dos níveis de cortisol pode ter efeitos negativos na reprodução dos peixes, nomeadamente no desenvolvimento das gónadas (Pankhurst e Van der Kraak, 2000) e também na produção de androgénios pelas mesmas, levando à diminuição da sua concentração em apenas 48h (Consten *et al.*, 2002). Ainda que os peixes não se encontrassem stressados, poderia-se colocar a hipótese de o aumento nos níveis de cortisol ter contribuído também para a diminuição da produção dos esteróides e sua consequente diminuição no plasma. No entanto, para esta espécie, os níveis de cortisol considerados indicadores de uma situação de stress são bastante superiores aos obtidos

neste estudo (Vijayan *et al.*, 1997), por isso, é muito pouco provável que o aumento dos níveis de cortisol tenha contribuído para os efeitos reportados neste trabalho.

Na morfologia interna das gónadas verifica-se que tanto nos peixes anósmicos como nos peixes *sham* ao fim de 15 dias da operação, há diferenças nos tecidos quando comparados com o grupo controlo. O espaço criado entre os cistos que contêm as células germinais e o tecido conjuntivo dos lóbulos bem como a presença de matriz conjuntiva na região dos espermatozóides sugerem que houve um efeito na espermatogénese que levou à atrofia dos tecidos. Estes efeitos podem ter-se devido à apoptose das células de Sertoli, que se encontram normalmente na periferia dos lóbulos, levando à quebra na adesão dos cistos à membrana dos lóbulos, fenómeno já observado em ratos (Suzuki *et al.*, 2004). A 11-CT tem um papel fundamental no desenvolvimento das gónadas e na espermatogénese (Miura *et al.*, 1996), por isso, a sua diminuição pode também estar na origem da alteração do estado as gónadas. Ao fim de 30 dias, o padrão mantém-se, tendo-se verificado inclusive, uma atrofia total das gónadas num dos machos anósmicos, mostrando que ao fim de um mês ainda persistia o efeito da anosmia. Também a nível do desenvolvimento das gónadas os efeitos semelhantes observados nos peixes anósmicos e *sham* apontam para o facto de os peixes *sham* terem provavelmente o epitélio olfactivo alterado/danificado e, conseqüentemente, alterações na capacidade de detecção dos estímulos químicos importantes para o desenvolvimento normal da espermatogénese. Para melhor compreender estes resultados, poder-se-ia recolher amostras de plasma para aceder à concentração dos esteróides ao fim de 15 e 30 dias e após esse período e aumentar o número de peixes por tratamento para garantir resultados mais robustos em termos estatísticos.

Os efeitos nas gónadas não se verificam apenas a nível qualitativo. As contagens realizadas nas secções histológicas mostram uma diminuição em ambas as regiões dos testículos do número de lóbulos/campo, *clusters* de Leydig e no número de Leydig/*cluster* nos machos anósmicos e *sham*, 15 e 30 dias após a operação mostrando mais uma vez um efeito nas gónadas derivado à anosmia. Estes resultados associados aos efeitos já observados nas gónadas sugerem que devido à anosmia houve um retrocesso na espermatogénese, tendo sido criado um estado de hipogonadismo nas mesmas. Suzuki *et al.* (2004) verificaram que em ratos com hipogonadismo, ocorria uma diminuição no seu número de células de Leydig, tendo isto sido verificado também no presente estudo. Esta diminuição pode explicar a redução na concentração dos androgénios no plasma, uma vez que são produzidos nestas células (Yaron, 1995) e

estas ficaram comprometidas devido à interrupção do normal funcionamento do eixo HPG. Esta ligação entre o olfacto e a espermatogénese também se verifica em humanos, onde existe uma síndrome, denominada síndrome de Kallmann, que associa o hipogonadismo hipogonadotrópico à anosmia e cujos efeitos são semelhantes a alguns dos reportados neste estudo (Rugarli, 1999), nomeadamente a atrofia das gónadas e a diminuição da concentração de esteróides sexuais. Esta síndrome é derivada de uma anomalia citogenética (Bergstrom *et al.*, 1987) e faz com que haja uma deficiência no bolbo olfactivo que impede a continuação da resposta olfactiva até ao hipotálamo, comprometendo deste modo o funcionamento do eixo HPG e culminando no desenvolvimento deficiente das gónadas (Isidori *et al.*, 2008).

Tal como nas células de Leydig, nas células de Sertoli das tilápias houve uma diminuição do seu número por lóbulo, dos machos controlo para machos operados na região posterior do testículo. Neste estudo, o número de células de Sertoli contabilizadas foi bastante reduzido (entre 0,1 e 1 células/lóbulo) quando comparado com um estudo de Shulz *et al.* (2005) para tilápias pertencentes ao mesmo género, onde existiam entre 1-7 células de Sertoli por cisto, podendo-se depreender que o seu número por lóbulo seria superior. Este número reduzido mesmo no grupo controlo deveu-se à dificuldade em identificar estas células nos lóbulos uma vez que se encontravam na periferia dos lóbulos, perto da membrana que continha outras células, e especialmente nos machos tratados, os tecidos e as células encontravam-se atrofiados, não sendo possível por vezes distingui-los de outras células que se encontravam nessa região. Para uma melhor detecção destas células poder-se-ia utilizar a técnica imunocitoquímica TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling*) que marca células de Sertoli em apoptose, permitindo uma melhor identificação destas (Otsuki *et al.*, 2003; Suzuki *et al.*, 2004). De qualquer modo, sabendo-se que estas células também têm funções no suporte dos tecidos gonadais (Redding e Patiño, 1993), a sua diminuição provavelmente também contribuiu para as alterações verificadas nestes.

Nas células germinais, verifica-se uma diminuição significativa do número de Spg A e B do grupo controlo para os restantes, especialmente nos peixes anósmicos. O mesmo padrão se verifica para os restantes tipos de células, apesar de não serem estatisticamente diferentes devido à grande variabilidade no número de células germinais dentro do mesmo grupo. Tal como para as células somáticas, a mesma consequência derivada da anosmia se verifica para as células germinais, comprovando o seu efeito na redução/retrocesso da espermatogénese. Estes resultados também estão de

acordo com os de Suzuki *et al.* (2004) onde, devido ao hipogonadismo, há uma diminuição no número de células germinais.

Verifica-se que a diminuição no número de células é mais significativa na região posterior dos testículos, podendo isto significar que esta região tem uma maior participação na espermatogénese, pelo menos nesta espécie. Para complementar esta informação poderia medir-se as concentrações de esteróides sexuais nas gónadas e comprovar possíveis diferenças entre as duas regiões dos testículos.

As diferenças entre o grupo controlo e os restantes acentua-se, de modo geral, dos peixes *sham* para os anósmicos e de 15 para 30 dias após a operação, querendo isto significar que, até pelo menos um mês após a operação, existiram efeitos nas gónadas devido à ausência de detecção de estímulos químicos. Este padrão reforça a ideia de que a anosmia tem efeitos a nível da regulação e desenvolvimento reprodutor.

O epitélio olfactivo dos peixes anósmicos começa a regenerar ao fim de 2-3 semanas (Almeida *et al.*, 2005). Os dados deste estudo mostram que o efeito da anosmia nas gónadas se estende até pelo menos um mês após a operação. Infelizmente não existem dados histológicos do epitélio olfactivo nos peixes utilizados neste estudo, que permitam dizer quando é que o seu epitélio começou a regenerar e se recuperou as suas funções como antes de ser cauterizado. Sugere-se a realização de secções histológicas em peixes desde a operação para se tornarem anósmicos até o seu epitélio estar completamente regenerado e também a recolha de testículos num período superior a 30 dias para verificar se a nível das gónadas há também uma reversão do efeito da anosmia.

Os efeitos da anosmia também se verificaram na potência olfactiva da urina dos espécimes utilizados. A potência olfactiva normalizada variou entre 0,6 nos machos anósmicos e 1,3 nos machos *sham*, tendo sido estatisticamente diferente do grupo controlo apenas nos machos anósmicos. Não são conhecidos valores de respostas olfactivas de estímulos de urina de machos em machos, apenas se sabendo que em fêmeas, os estímulos de urina de machos territoriais induzem respostas olfactivas de cerca de 1,6 (Barata *et al.*, 2008b), estando os valores deste estudo abaixo destes. No entanto deve ter-se em atenção que podem haver variações entre machos e fêmeas.

Nos machos anósmicos, as respostas olfactivas a estímulos de urina mostram que houve uma diminuição significativa da sua potência olfactiva, significando isto que houve uma diminuição da concentração de alguns compostos que contribuem para a potência olfactiva do seu odor. Nos machos *sham*, não se verificaram alterações significativas da potência olfactiva da sua urina em comparação com o grupo controlo,

ou seja, não houve alterações a nível da concentração dos seus constituintes. Sendo a urina uma das substâncias onde se excretam esteróides nesta espécie (Scott e Elis, 2007), é de esperar que, ao haver uma diminuição da produção de esteróides, a sua concentração na urina também diminua, podendo levar a uma diminuição da potência do seu odor. No entanto, sabe-se que esta espécie não detecta olfactivamente esteróides presentes na urina de conspecíficos (Frade *et al.*, 2002), por isso, a diminuição de T e 11-CT não pode ser considerada a causa para a diminuição da potência olfactiva da urina dos machos anósmicos. Segundo Barata *et al.* (2007), a potência olfactiva da urina está positivamente relacionada com o estatuto social dos machos, emitindo os machos territoriais urina com um odor mais potente que a dos não territoriais (Oliveira *et al.*, 1996), sugerindo isto que eles advertem o seu estado dominante através de compostos feromonais presentes na urina. Existe um composto com provável função feromonal nesta espécie que é um amino-esterol sulfatado cuja origem de produção ainda não é conhecida, sabendo-se no entanto, que está presente em maiores concentrações na urina de machos territoriais que na de não territoriais e que provoca nas fêmeas maiores respostas olfactivas (Barata *et al.*, 2008b), sendo considerado um sinal feromonal de dominância e indução da desova das fêmeas. Recentemente também se descobriu uma proteína específica de machos (male-specific protein - MSP) que é produzida no fígado e que é secretada na corrente sanguínea, encontrando-se também no fluído seminal, urina e muco (Machnes *et al.*, 2008). Apesar de não se saber se esta proteína é detectada pelo sistema olfactivo, sabe-se que está positivamente correlacionada com o estatuto social dos machos e como também está presente na urina, pode contribuir para a sua potência olfactiva.

Os machos desta espécie sinalizam o seu estatuto social através da urina e utilizam o olfacto para detectar substâncias presentes nesta que permitem aceder ao estatuto dos conspecíficos (Oliveira e Almada, 1996). Tendo este estudo sido realizado em machos territoriais, nos machos anósmicos, o facto de não detectarem estímulos químicos, além de ter provocado efeitos a nível da produção de esteróides e das gónadas, provavelmente levou a que perdessem o seu estatuto social, levando isso à diminuição da produção de substâncias feromonais existentes na urina, diminuindo esta a sua potência olfactiva. Nos machos *sham*, apesar do seu epitélio olfactivo ter sido provavelmente afectado (total ou parcialmente) durante a operação, o que contribuiu para induzir efeitos semelhantes aos dos machos anósmicos efeitos nos níveis de esteróides e nas gónadas, provavelmente não afectou por completo a detecção de

compostos como os acima referidos e deste modo não perderam o seu estatuto territorial, mantendo a potência olfactiva da sua urina. Estes resultados sugerem um *feedback* entre a síntese de feromonas presentes na urina e o sistema olfactivo nos machos desta espécie.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A importância da comunicação química nas interações sociais da tilápia, particularmente no comportamento reprodutor, tem vindo a ser comprovada em vários estudos recentes efectuados nesta espécie.

Este trabalho permitiu verificar que a incapacidade de detecção de estímulos químicos através do epitélio olfactivo (anosmia) em machos de tilápia tem efeitos a nível da esteroidogénese, provocando um decréscimo nos níveis dos principais androgénios (testosterona e 11-cetotestosterona), e a nível da maturação das gónadas provocando um retrocesso na espermatogénese.

Adicionalmente, a anosmia provoca ainda uma diminuição na potência olfactiva da urina, devido provavelmente a uma diminuição na produção de compostos feromonais.

Pode-se então concluir que há uma ligação entre o olfacto e a regulação endócrina da reprodução nos machos e que provavelmente a detecção de pistas químicas sociais através do sistema olfactivo é necessária para a manutenção do sistema reprodutor nos machos desta espécie.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adrian ED, Ludwig C (1938) Nervous discharges from the olfactory organs of fish. *Journal of Physiology (London)* **94**, 441-460.
- Almeida OG, Miranda A, Frade P, Hubbard PC, Barata EN, Canário AVM (2005) Urine as a Social Signal in the Mozambique Tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Chemical Senses* **30**, 309-310.
- Antonopoulou E, Swanson P, Mayer I, Borg B (1999) Feedback control of gonadotropins in Atlantic salmon, *Salmo salar*, male parr. *General and Comparative Endocrinology* **114**, 142-150.
- Arnegard ME, Hopkins CD (2003) Electric signal variation among seven blunt-snouted *Brienomyrus* species (Teleostei: Mormyridae) from a riverine species flock in Gabon, Central Africa. *Environmental Biology of Fishes* **67**, 321-339.
- Baerends GP, Baerends van Roon JM (1950) An introduction to the ethology of cichlid fishes. *Behaviour* **1**, 1-242.
- Barata EN, Hubbard PC, Almeida OG, Miranda A, Canário AVM (2007) Male urine signals social rank in the Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *BMC Biology* **5**, 54-64.
- Barata EN, Nogueira R, Serrano RM, Gomes L, Canário AVM (2002) A pheromonal role for the anal gland of male peacock blennies (*Salaria pavo*) in female attraction. *Comparative Biochemistry and Physiology* **132**, S63-S70.
- Barata EN, Serrano RM, Miranda A, Nogueira R, Hubbard PC, Canário AVM (2008a) Putative pheromones from the anal glands of male blennies attract females and enhance male reproductive success. *Animal Behaviour* **75**, 379-389.
- Barata EN, Fine JM, Hubbard PC, Almeida OG, Frade P, Sorensen PW, Canário AVM (2008b) A sterol-like odorant in the urine of Mozambique tilapia males likely signals social dominance to females. *Journal of Chemical Ecology* **34**, 438-449.
- Bardach JE, Villars T (1974) The chemical senses of fishes. In: *Chemoreception in Marine Organisms* (eds. Grant PT, Mackie AM), pp. 49-104. Academic Press, London.
- Barlow GW (1991) Mating systems among cichlid fishes. In: *Cichlid Fishes Behaviour, ecology and evolution* (ed. Keenleyside MHA), pp. 173-190. Chapman&Hall, London.

- Barry T, Thomas P, Callard GV (1993) Stage-related production of 21-hydroxylated progestins by the dogfish (*Squalus acanthias*) testis. *Journal of Experimental Biology* **265**, 522-532.
- Bender N, Heg-Bachar Z, Oliveira RF, Canário AVM, Taborsky M (2008) Hormonal control of brood care and social status in a cichlid fish with brood care helpers. *Physiology & Behavior* **94**, 349-358.
- Bergstrom RW, Hansen KL, Clare CN, Katz MS (1987) Hypogonadotropic hypogonadism and anosmia (Kallmann's Syndrome) associated with a marker chromosome. *Journal of Andrology* **8**, 55-60.
- Billard R (1990) Spermatogenesis in teleost fish. In: *Marshall's Physiology of Reproduction* (ed. Lamming GE), pp. 183-212. Longman Group UK Limited, London.
- Billard R, Fostier A, Weil C, Breton B (1982) Endocrine control of spermatogenesis in teleost fish. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **3**, 65-79.
- Blazer VS (2002) Histopathological assessment of gonadal tissue in wild fishes. *Fish Physiology and Biochemistry* **26**, 85-101.
- Borg B (1994) Androgens in teleost fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology* **109**, 219-245.
- Borges RA, Oliveira RF, Almada VC, Canário AVM (1998) Short-term social modulation of 11-ketotestosterone urinary levels in males of the cichlid fish *Oreochromis mossambicus* during male–female interaction. *Acta Ethologica* **1**, 43-48.
- Brown GE, Godin J-GJ (1999) Who dares, learns: chemical inspection behaviour and acquired predator recognition in a characin fish. *Animal Behaviour* **57**, 475-481.
- Bruton MN, Boltt RE (1975) Aspects of the biology of *Tilapia mossambica* Peters (Pisces: Cichlidae) in a natural freshwater lake (Lake Sibaya, South Africa). *Journal of Fish Biology* **7**, 423-445.
- Bushmann PJ, Burns JR (1994) Social control of male sexual maturation in the swordtail characin, *Corynopoma riisei*. *Journal of Fish Biology* **44**, 263-272.
- Cardwell JR, Liley NR (1991) Androgen control of social status in males of a wild population of stoplight parrotfish, *Sparisoma viride* (Scaridae). *Hormones and Behavior* **25**, 1-18.

- Carolsfeld J, Tester M, Kreiberg H, Sherwood NM (1997) Pheromone-induced spawning of Pacific Herring: I. Behavioural characterization. *Hormones and Behavior* **31**, 256-268.
- Chandroo K, Duncan I, Moccia R (2004) Can fish suffer?: perspectives on sentience, pain, fear and stress. *Applied Animal Behavior Science* **86**, 225-250.
- Cnaani A, Hulata G (2008) 4 Tilapias. In: *Genome mapping and genomics in animals* (eds. Kocher T, Kole C), pp. 101-116. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Consten D, Keuning E, Terlouw M, Lambert J, Goos H (2002) Cortisol effects on the testicular androgen synthesizing capacity in common carp, *Cyprinus carpio* L. *Fish Physiology and Biochemistry* **25**, 91-98.
- Cornish D (1998) Seasonal steroid hormone profiles in plasma and gonads of the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Water SA* **24**, 257-264.
- Coward K, Bromage NR (2000) Reproductive physiology of female tilapia broodstock. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **10**, 1-25.
- Coward K, Little DC (2001) Culture of the "aquatic chicken": present concerns and future prospects. *Biologist (London)* **48**, 12-16.
- Cubitt KF, Winberg S, Huntigford FA, et al. (2008) Social hierarchies, growth and brain serotonin metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar*) kept under commercial rearing conditions. *Physiology & Behavior* **94**, 529-535.
- Curtis BJ, Wood CM (1991) The function of the urinary bladder in vivo in the freshwater rainbow trout. *Journal of Experimental Biology* **155**, 567-583.
- De Silva SSd, Sirisena HKG (1988) Observations on the nesting habits of *Oreochromis mossambicus* (Peters) (Pisces: Cichlidae) in Sri Lankan reservoirs. *Journal of Fish Biology* **33**, 689-696.
- De Silva SSd, Perera MK, Maitipe P (1984) The composition, nutritional status and digestibility of the diets of *Sarotherodon mossambicus* from nine man-made lakes in Sri Lanka. *Environmental Biology of Fishes* **11**, 205-219.
- Dean BD, Whitlow ZW, Borski RJ (2003) Glucocorticoid receptor upregulation during seawater adaptation in a euryhaline teleost, the tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *General and Comparative Endocrinology* **132**, 112-118.
- DeBose LL, Nevitt GA (2008) The use of odors at different spatial scales: comparing birds with fish. *Journal of Chemical Ecology* **34**, 867-881.

- Derby CD, Sorensen PW (2008) Neural processing, perception, and behavioural responses to natural chemical stimuli by fish and crustaceans. *Journal of Chemical Ecology* **34**, 898-914.
- Desjardins JK, Stiver KA, Fitzpatrick JL, Balshine S (2008) Differential responses to territory intrusions in cooperatively breeding fish. *Animal Behaviour* **75**, 595-604.
- Detrich III HW, Jones CD, Kim S, North AW, Thurber A, Vacchi M (2005) Nesting behavior of the icefish *Chaenocephalus aceratus* at Bouvetøya Island, Southern Ocean. *Polar Biology* **28**, 828-832.
- Dijkstra PD, KHeKman R, Schulz RW, Groothuis TGG (2007) Social stimulation, nuptial colouration, androgens and immunocompetence in a sexual dimorphic cichlid fish. *Behaviour Ecology and Sociobiology* **61**, 599-609.
- Dubois EA, Florijn MA, Zandbergen MA, Peute J, Goos HJT (1998) Testosterone accelerates the development of the catfish GnRH system in the brain of immature african catfish (*Clarias gariepinus*). *General and Comparative Endocrinology* **112**, 383-393.
- Fabacher DL, Little EE (2000) Introduction. In: *The Laboratory Fish* (ed. Ostrander GK), pp. 1-9. Academic Press, United Kingdom.
- Fiess JC, Kunkel-Patterson A, Mathias L, *et al.* (2007) Effects of environmental salinity and temperature on osmoregulatory ability, organic osmolytes, and plasma hormone profiles in the Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Comparative Biochemistry and Physiology* **146**, 252-264.
- Fostier A, Jalabert B, Billard R, Breton B, Zohar Y (1983) The gonadal steroids. In: *Fish Physiology* (eds. Hoar WS, Randall DJ, Donaldson EM), pp. 277-372. Academic Press, New York.
- Frade P, Barata EN, Hubbard PC, Canário AVM (2003) Olfactory detection of a putative reproductive pheromone in tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Comparative Biochemistry and Physiology A* **134 (Suppl.)**, S28.
- Frade P, Hubbard PC, Barata EN, Canário AVM (2002) Olfactory sensitivity of *Oreochromis mossambicus* to conspecific odours. *Journal of Fish Biology* **60**, 1-16.
- Frisch AJ, McCormick MI, Pankhurst NW (2007) Reproductive periodicity and steroid hormone profiles in the sex-changing coral-reef fish, *Plectropomus leopardus*. *Coral Reefs* **26**, 189-197.

- Froese R, Pauly D (2008) *FishBase*. World Wide Web electronic publication.
- García-López A, Fernández-Pasquier V, Couto E, Canário AVM, Sarasquete C, Martínez-Rodríguez G (2006) Testicular development and plasma sex steroid levels in cultured male Senegalese sole *Solea senegalensis* Kaup. *General and Comparative Endocrinology* **147**, 343-351.
- Gerlach G (2006) Pheromonal regulation of reproductive success in female zebrafish: female suppression and male enhancement. *Animal Behaviour* **72**, 1119-1124.
- Gerlai R (2003) Zebra fish: an uncharted behavior genetic model. *Behavior Genetics* **33**, 461-468.
- Giaquinto PC, Volpato GL (2005) Chemical cues related to conspecific size in pintado catfish, *Pseudoplatystoma coruscans*. *Acta Ethologica* **8**, 65-69.
- Gonçalves DM, Oliveira RF, Körner K, Poschadel JR, Schlupp I (2000) Using video playbacks to study visual communication in a marine fish, *Salarias pavo*. *Animal Behaviour* **60**, 351-357.
- Gonçalves-de-Freitas E, Teresa FB, Gomes FS, Giaquinto PC (2008) Effect of water renewal on dominance hierarchy of juvenile Nile tilapia. *Applied Animal Behavior Science* **112**, 187-195.
- Grier HJ (1981) Cellular organization of the testis and spermatogenesis in fishes. *American Zoologist* **21**, 345-357.
- Hamdani ElH, Doving KB (2007) The functional organization of the fish olfactory system. *Progress in Neurobiology* **82**, 80-86.
- Hansen A, Zielinski BS (2005) Diversity in the olfactory epithelium of bony fishes: Development, lamellar arrangement, sensory neuron cell types and transduction components. *Journal of Neurocytology* **34**, 183-208.
- Hara TJ (1992) Overview and introduction. In: *Fish Chemoreception* (ed. Hara TJ), pp. 1-12. Chapman & Hall, Florida.
- Hara TJ (1994) The diversity of chemical stimulation in fish olfaction and gustation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **4**, 1-35.
- Hara TJ (2000a) Sensory Systems. In: *The Laboratory Fish* (ed. Ostrander GK), pp. 471-479. Academic Press, London.
- Hara TJ (2000b) Chemoreception. In: *The Physiology of Fishes* (ed. Evans DH), pp. 191-218. CRC Press, Florida.

- Hubbard PC, Barata EN, Canário AVM (2002) Possible disruption of pheromonal communication by humic acid in the goldfish, *Carassius auratus*. *Aquatic Toxicology* **60**, 169-183.
- Hubbard PC, Barata EN, Canário AVM (2003) Olfactory sensitivity of the gilthead seabream (*Sparus auratus* L) to conspecific body fluids. *Journal of chemical ecology* **29**, 2481-2498.
- Isidori AM, Giannetta E, Lenzi A (2008) Male hypogonadism. *Pituitary* **11**, 171-180.
- Jasra SK, Arbuckle WJ, Corkum LD, *et al.* (2007) The seminal vesicle synthesizes steroids in the round goby *Neogobius melanostomus*. *Comparative Biochemistry and Physiology* **148**, 117-123.
- Jobling M (1995) *Environmental Biology of Fishes*, p455. Chapman & Hall, Great Britain.
- Kobayashi M, Nakanishi T (1999) 11-Ketotestosterone induces male-type sexual behaviour and gonadotropin secretion in gynogenetic Crucian Carp, *Carassius auratus langsdorfii*. *General and Comparative Endocrinology* **115**, 178-187.
- Kobayashi M, Sorensen PW, Stacey NE (2002) Hormonal and pheromonal control of spawning behavior in the goldfish. *Fish Physiology and Biochemistry* **26**, 71-84.
- Labadie P, Budzinski H (2006) Alteration of steroid hormone profile in juvenile turbot (*Psetta maxima*) as a consequence of short-term exposure to 17 α -ethynylestradiol. *Chemosphere* **64**, 1274-1286.
- Laberge F, Hara TJ (2001) Neurobiology of fish olfaction: a review. *Brain Research Reviews* **36**, 46-59.
- Lahnsteiner F (2003) Morphology, fine structure, biochemistry, and function of the spermatic ducts in marine fish. *Tissue & Cell* **35**, 363-373.
- Lambert JGD, van den Hurk R, Schoonen GEJ, Resink JW, van Oordt PGWJ (1986) Gonadal steroidogenesis and the possible role of steroid glucuronides as sex pheromones in two species of teleosts *Fish Physiology and Biochemistry* **2**, 1-4.
- Laurent G (1999) A systems perspective on early olfactory coding. *Science* **286**, 723-728.
- Li W, Scott AP, Siefkes MJ, Yun S-S, Zielinski BS (2003) A male pheromone in the sea lamprey (*Petromyzon marinus*): an overview. *Fish Physiology and Biochemistry* **28**, 259-262.

- Liley NR (1969) Hormones and Reproductive Behaviour in Fishes. In: *Fish Physiology: Reproduction, Growth, Bioluminescence, Pigments and Poisons* (eds. Hoar WS, Randall DJ), pp. 73-116. Academic Press, New York.
- Liley NR, Stacey NE (1983) Hormones, pheromones and reproductive behaviour. In: *Fish Physiology* (eds. Hoar WS, Randall DJ, Donaldson EM), pp. 1-63. Academic Press, New York.
- Lowe-McConnel RH (1991) Ecology of cichlids in South American and African waters, excluding the African Great Lakes. In: *Cichlid Fishes Behaviour, ecology and evolution* (ed. Keenleyside MHA), pp. 60-85. Chapman & Hall, London.
- Machnes Z, Avtalion R, Shirak A, Trombka D, Wides R, Fellous M, Don J (2008) Male-specific protein (MSP): A new gene linked to sexual behavior and aggressiveness of tilapia males. *Hormones and Behavior* **54**, 442-449.
- Magurran AE, Ramnarine IW (2004) Learned mate recognition and reproductive isolation in guppies. *Animal Behaviour* **67**, 1077-1082.
- McKaye KR, Louda SM, Stauffer Jr JR (1990) Bower size and male reproductive success in a cichlid fish lek. *American Naturalist* **135**, 597-613.
- Middaugh DP, Scott GI, Dean JM (1981) Reproductive behavior of the Atlantic silverside, *Menidia menidia* (Pisces, Atherinidae). *Environmental Biology of Fishes* **6**, 269-276.
- Miranda A, Almeida OG, Hubbard PC, Barata EN, Canário AVM (2005) Olfactory discrimination of female reproductive status by male tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *The Journal of Experimental Biology* **208**, 2037-2043.
- Miura C, Miura T, Yamashita M, Yamauchi K, Nagahama Y (1996) Hormonal induction of all stages of spermatogenesis in germ-somatic cell coculture from Japanese eel testis. *Development, Growth & Differentiation* **38**, 257-262.
- Moller P (2002) Multimodal sensory integration in weakly electric fish: a behavioral account. *Journal of Physiology* **96**, 547-556.
- Moller P, Serrier J (1986) Species recognition in mormyrid weakly electric fish. *Animal Behaviour* **34**, 333-339.
- Mommsen TP, Vijayan MM, Moon TW (1999) Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **9**, 211-268.

- Morita Y, Finger TE (1998) Differential projections of ciliated and microvillous olfactory receptor cells in the Catfish, *Ictalurus punctatus*. *The Journal of Comparative Neurology* **398**, 539-550.
- Mormède P, Andason S, Aupérin B, Beerda B, Guémené D, Malmkvist J, Manteca X, Manteuffel G, Prunet P, Reenen CG, Richard S, Veissier I (2007) Exploration of the hypothalamic–pituitary–adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. *Physiology & Behavior* **92**, 317-339.
- Nagahama Y (1983) The Functional Morphology of Teleost Gonads. In: *Fish Physiology* (eds. Hoar WS, Randall DJ, Donaldson EM), pp. 223-275. Academic Press, New York.
- Nakamura M (1981) Effects of 11-ketotestosterone on gonadal sex differentiation in *Tilapia mossambica*. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* **47**, 1323-1327.
- Nóbrega R, Quagio-Grassiotto I (2007) Morphofunctional changes in Leydig cells throughout the continuous spermatogenesis of the freshwater teleost fish, *Serrasalmus spilopleura* (Characiformes, Characidae): an ultrastructural and enzyme study. *Cell Tissue Research* **329**, 339-349.
- Nóbrega RH, Batlouni SR, França LR (2008) An overview of functional and stereological evaluation of spermatogenesis and germ cell transplantation in fish. *Fish Physiology and Biochemistry* **XXX**, 1-10.
- Oliveira RF (2006) Neuroendocrine mechanisms of alternative reproductive tactics in fish. In: *Fish Physiology* (eds. Sloman KA, Wilson RW, Balshine S), pp. 297-357. Elsevier, New York.
- Oliveira RF, Almada VC (1995) Sexual dimorphism and allometry of external morphology in *Oreochromis mossambicus*. *Journal of Fish Biology* **46**, 1055-1064.
- Oliveira RF, Almada VC (1996) Dominance hierarchies and social structure in captive groups of the Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus* (Teleostei Cichlidae). *Ethology Ecology & Evolution* **8**, 39-55.
- Oliveira RF, Almada VC (1998) Mating tactics and male–male courtship in the lek-breeding cichlid *Oreochromis mossambicus*. *Journal of Fish Biology* **52**, 115-1129.

- Oliveira RF, Canário AV (2000) Hormones and social behavior of cichlid fishes: a case study in the Mozambique tilapia. *Journal of Aquaculture and Aquatic Sciences* **9**, 187-207.
- Oliveira RF, Almada VC, Canário AVM (1996) Social modulation of sex steroid concentrations in the urine of male cichlid fish *Oreochromis mossambicus*. *Hormones and Behavior* **30**, 2-12.
- Olsén K, Järvi JT, Mayer I, Petersson E, Kroon F (1998) Spawning behaviour and sex hormone levels in adult and precocious brown trout (*Salmo trutta* L.) males and the effect of anosmia. *Chemoecology* **8**, 9-17.
- Otsuki Y, Li Z, Shibata M-A (2003) Apoptotic detection methods - from morphology to gene. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry* **38**, 275-340.
- Pankhurst N, Van der Kraak G (2000) Evidence that acute stress inhibits ovarian steroidogenesis in rainbow trout *in vivo*, through the action of cortisol. *General and Comparative Endocrinology* **117**, 225-237.
- Piferrer F, Baker H, Donaldson EM (1993) Effects of natural, synthetic, aromatizable and nonaromatizable androgens in inducing male sex differentiation in genotypic female chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *General and Comparative Endocrinology* **91**, 51-65.
- Pottinger TG, Moore A (1997) Characterization of putative steroid receptors in the membrane, cytosol and nuclear fractions from the olfactory tissue of brown and rainbow trout. *Fish Physiology and Biochemistry* **16**, 45-63.
- Price EE, Stauffer Jr JR, Swift MC (1985) Effect of temperature on growth of juvenile *Oreochromis mossambicus* and *Sarotherodon melanotheron*. *Environmental Biology of Fishes* **13**, 149-152.
- Pudney J, Callard GV (1984) Identification of Leydiglike cells in the testis of the dogfish *Squalus acanthias*. *Anatomical Record* **209**, 323-330.
- Redding JM, Patiño R (1993) Reproductive Physiology. In: *The Physiology of Fishes* (ed. Evans DH), pp. 503-534. CRC Press, Florida.
- Redding JM, Patiño R (2000) Reproductive Systems. In: *The Laboratory Fish* (ed. Ostrander GK), pp. 261-267. Academic Press, London.
- Ripley JL, Lobel PS (2005) Reproductive behavior of the Lake Malawi cichlid fish, *Tramitichromis intermedius*. *Environmental Biology of Fishes* **73**, 171-180.

- Rocha MJ, Reis-Henriques MA (1996) Plasma and urine levels of C18, C19 and C21 steroids in an asynchronous fish, the tilapia *Oreochromis mossambicus* (Teleostei, Cichlidae). *Comparative Biochemistry and Physiology* **115**, 257-264.
- Rodgers E, Earley R, Grober M (2006) Elevated 11-ketotestosterone during paternal behavior in the Bluebanded goby (*Lythrypnus dalli*). *Hormones and Behavior* **49**, 610-614.
- Ros A, Becker K, Canário AV, Oliveira RF (2004) Androgen levels and energy metabolism in *Oreochromis mossambicus*. *Journal of Fish Biology* **65**, 895-905.
- Rosenthal GG, Lobel PS (2005) Communication. In: *Fish Physiology* (eds. Katherine RWW, Sloman A, Balshine S), pp. 39-78. Academic Press, London.
- Rugarli EI (1999) Kallmann syndrome and the link between olfactory and reproductive development. *American Journal of Human Genetics* **65**, 943-948.
- Russock HI (1990) The effect of natural chemical stimuli on the preferential behaviour of *Oreochromis Mossambicus* (Pisces: Cichlidae) fry to maternal models. *Behaviour* **115**, 315-326.
- Saether B-S, Bjorn P-A, Dale T (2007) Behavioural responses in wild cod (*Gadus morhua* L.) exposed to fish holding water. *Aquaculture* **262**, 260-267.
- Sargent RC, Rush VN, Wisenden BD, Yan HY (1998) Courtship and mate choice in fish: Integrating behavioural and sensory ecology. *American Zoology* **38**, 82-96.
- Schneider RAZ, Schneider RWS, Moore PA (1999) Recognition of dominance status by chemoreception in the red swap crayfish, *Procambarus clarkii*. *Journal of chemical ecology* **25**, 781-794.
- Schulz RW, Miura T (2002) Spermatogenesis and its endocrine regulation. *Fish Physiology and Biochemistry* **26**, 43-56.
- Schulz RW, Menting S, Bogerd J, et al. (2005) Sertoli Cell Proliferation in the Adult Testis—Evidence from Two Fish Species Belonging to Different Orders. *Biology of Reproduction* **73**, 891-898.
- Scott AP, Canário AVM (1992) 17 α ,20 β -Dihydroxy-4- pregnen-3-one 20-sulphate; A major new metabolite of the teleost oocyte maturation-inducing steroid. *General and Comparative Endocrinology* **85**, 91-100.
- Scott AP, Ellis T (2007) Measurement of fish steroids in water - a review. *General and Comparative Endocrinology* **153**, 392-400.
- Scott JW, Scott-Johnson PE (2002) The electroolfactogram: a review of it's history and uses. *Microscopy Research and Technique* **58**, 152-106.

- Siefkes MJ, Li W (2004) Electrophysiological evidence for detection and discrimination of pheromonal bile acids by the olfactory epithelium of female sea lampreys (*Petromyzon marinus*). *Journal of Comparative Physiology* **190**, 193-199.
- Silver WL, Caprio J, Blackwell JF, Tucker D (1976) The underwater electro-olfactogram: A tool for the study of the sense of smell of marine fishes. *Cellular and Molecular Life Sciences* **32**, 1216-1217.
- Smith RJF (1992) Alarm signals in fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **2**, 33-63.
- Sogabe A, Yanigisawa Y (2008) Maintenance of pair bond during the non-reproductive season in a monogamous pipefish *Corythoichthys haematopterus*. *Journal of Ethology* **26**, 195-199.
- Sorensen PW (1992) Hormones, pheromones and chemoreception. In: *Fish Chemoreception* (ed. Hara TJ), pp. 199-228. Chapman & Hall, London.
- Sorensen PW, Pinillos M, Scott AP (2005) Sexually mature male goldfish release large quantities of androstenedione into the water where it functions as a pheromone. *General and Comparative Endocrinology* **140**, 164-175.
- Sorensen PW, Scott AP, Kihlslinger RL (2000) How common hormonal metabolites function as relatively specific pheromonal signals in goldfish. In: *Proceedings of the Sixth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish* (eds. Norberg B, Kjesbu OS, Taranger GL, Andersson E, Stefansson SO), pp. 125-128. John Grieg AS, Bergen.
- Sorensen PW, Vrieze LA, Fine JM (2003) A multi-component migratory pheromone in the sea lamprey. *Fish Physiology and Biochemistry* **28**, 253-257.
- Souza SMGd, Lucion AB, Wassermann GF (1998) Influence of 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one Injected into a post-ovulatory female on the reproductive behavior of male Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Comparative Biochemistry and Physiology* **119**, 759-763.
- Speedie N, Gerlai R (2008) Alarm substance induced behavioral responses in zebrafish (*Danio rerio*). *Behavioural Brain Research* **188**, 168-177.
- Stacey N (2003) Hormones, pheromones and reproductive behavior. *Fish Physiology and Biochemistry* **28**, 229-235.
- Stacey N, Sorensen PW (2002) Hormonal Pheromones in fish. In: *Non Mammalian Hormone-Behaviour Systems* (eds. Pfaff W, Harnold AP, Etgen AM, Fahrbach SE, Rubin RT), pp. 375-434. Hancourt Publishers Ltd/Academic Press, London.

- Suzuki H, Yagi M, Saito K, Suzuki K (2004) Dysplastic development of seminiferous tubules and interstitial tissue in rat hypogonadic (hgn/hgn) testes. *Biology of Reproduction* **71**, 104-116.
- Swanson P, Dickey J, Campbell B (2003) Biochemistry and physiology of fish gonadotropins. *Fish Physiology and Biochemistry* **28**, 53-59.
- Trewavas E (1983) *Tilapiine fishes of the genera Sarotherodon, Oreochromis and Danakilia*, p. 583. British Museum of Natural History, United Kingdom.
- Truscott B (1983) Steroid metabolism in fish : II. Testosterone metabolites in the bile of the marine winter flounder *Pseudopleuronectes americanus* and the freshwater Atlantic salmon *Salmo salar*. *General and Comparative Endocrinology* **51**, 460-470.
- Turner GF (1986) Territory dynamics and cost of reproduction in a captive population of the colonial nesting mouthbrooder *Oreochromis mossambicus* (Peters). *Journal of Fish Biology* **29**, 573-587.
- Valentincic T, Koce A (2000) Coding principles in fish olfaction as revealed by single unit, EOG and behavioral studies. *European Journal of Physiology* **439**, 193-195.
- Vermeirssen ELM, Scott AP (1996) Excretion of free and conjugated steroids in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*): Evidence for branchial excretion of the maturation-inducing steroid 17 α , 20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one. *General and Comparative Endocrinology* **101**, 180-194.
- Very NM, Sheridan MA (2002) The role of somatostatins in the regulation of growth in fish. *Fish Physiology and Biochemistry* **27**, 217-226.
- Vijayan MM, Pereira C, Grau EG, Iwama GK (1997) Metabolic responses associated with confinement stress in Tilapia: The role of cortisol. *Comparative Biochemistry and Physiology* **116**, 89-95.
- Villena AJ (2003) Applications and needs of fish and shellfish cell culture for disease control in aquaculture. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **13**, 111-140.
- Vives SP (1988) Parent choice by larval convict cichlids, *Cichlasoma nigrofasciatum* (Cichlidae, Pisces). *Animal Behaviour* **36**, 11-19.
- Wang L-H, Tsai C-L (2006) Influence of temperature and gonadal steroids on the ontogenetic expression of brain serotonin 1A and 1D receptors during the critical period of sexual differentiation in tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology* **143**, 116-125.

- Webb JF, Montgomery JC, Mogdans J (2008) Bioacoustics and the lateral line system of fishes. *Fish Bioacoustics* **32**, 145-182.
- Weltzien F-A, Andersson E, Andersen O, Shalchian.Tabrizi K, Norberg B (2004) The brain–pituitary–gonad axis in male teleosts, with special emphasis on flatfish (*Pleuronectiformes*). *Comparative Biochemistry and Physiology* **137**, 447-477.
- Wendelaar Bonga S (1997) The stress response in fish. *Physiological Reviews* **77**, 591-625.
- Wohlfarth GW, Hulata GW (1983) *Applied genetics of tilapias*, p. 26. ICLARM Studies and Reviews.
- Yambe H, Kitamura S, Kamio M, *et al.* (2006) L-Kynurenine, an amino acid identified as a sex pheromone in the urine of ovulated female masu salmon. *Proceedings in the National Academy of Sciences* **103**, 15370–15374.
- Yaron Z (1995) Endocrine control of gametogenesis and spawning induction in the carp. *Aquaculture* **129**, 49-73.
- Yun S-S, Scott AP, Li W (2003) Pheromones of the male sea lamprey, *Petromyzon marinus* L.: structural studies on a new compound, 3-keto allocholic acid, and 3-keto petromyzonol sulfate. *Steroids* **68**, 297-304.
- Zeiske E, Theisen B, Breucker H (1992) Structure, development and evolutionary of the peripheral olfactory system. In: *Fish Chemoreception* (ed. Hara TJ), pp. 13-39. Chapman & Hall, London.