

Neuroendocrinologia do comportamento social no ciclídeo africano *Oreochromis mossambicus*: mecanismos reguladores e modulação social da reprodução

Olinda Gomes de Almeida
Doutoramento em Biologia
(Especialidade em Etologia)

Trabalho efetuado sob a orientação de:

Prof. Doutor Rui Oliveira (ISPA- Instituto Universitário)
Prof. Doutor Adelino Canário (Universidade do Algarve)

Universidade do Algarve

**Neuroendocrinologia do comportamento
social no ciclídeo africano *Oreochromis
mossambicus*:
mecanismos reguladores e modulação social da
reprodução**

Olinda Gomes de Almeida
Doutoramento em Biologia
(Especialidade em Etologia)

Trabalho efetuado sob a orientação de:

Prof. Doutor Rui Oliveira (ISPA- Instituto Universitário)
Prof. Doutor Adelino Canário (Universidade do Algarve)

2014

**Neuroendocrinologia do comportamento social no ciclídeo africano
Oreochromis mossambicus: mecanismos reguladores e modulação social da
reprodução**

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

(Olinda Gomes de Almeida)

Copyright©Olinda Almeida

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

O presente trabalho foi efetuado no seguimento de uma jornada de longa data que envolve o estudo dos mecanismos envolvidos no comportamento social da Tilápia. O primeiro contacto com esta espécie foi por volta de 2002, com o “trabalho de fim de curso” e foi realmente um “amor à primeira vista”. Apesar de todas as tarefas terem sido realizadas com muito entusiasmo, esta dissertação não estaria concluída sem o apoio de diversas pessoas, às quais gostaria de expressar a minha gratidão, destacando as seguintes:

- Ao meu orientador, Professor Doutor Rui Oliveira, que me recebeu no ISPA-instituto Universitário, num cenário de “superpovoamento” de estudantes de doutoramento. Mesmo assim, possibilitou a existência dos meios necessários à realização dos trabalhos experimentais, tal como toda a supervisão e em especial a ajuda e dedicação mostrada na fase de escrita dos artigos científicos.

- Ao Professor Doutor Adelino Canário, que aceitou a co-orientação deste projeto, mostrando-se sempre disponível para a ajudar.

- Ao Doutor David Gonçalves por se ter mostrado sempre disponível a ajudar, tendo prestado um apoio fundamental numa fase conturbada do grupo, por motivos de força maior.

- À Doutora Ewa Kulczykowska e a toda a sua equipa, por me ter recebido no seu laboratório (Genetics and Marine Biotechnology, Institute of Oceanology of the Polish Academy of Sciences, Sopot, Polónia) durante dois períodos curtos (15 dias + 1 mês), sempre com muita simpatia e disponibilidade.

- Aos meus anteriores supervisores de trabalhos com Tilápias, o Doutor Peter Hubbard e Doutor Eduardo Barata, cuja experiência com eles adquirida foi fundamental para a realização deste novo projeto, e pela amizade.

- Aos membros do nosso grupo de investigação (Ispa e IGC), cuja amizade e partilha foram fundamentais para a criação do bom ambiente que o caracteriza. A todos, o meu obrigado! E ao “tchime” do Brasil, Francine e especialmente à minha querida Eliane por toda a partilha.

- Ao Fernando, Eduarda, Ana Isa e António, por terem tratado tão bem das Tilápias e por terem aceitado sempre as minhas sugestões e em especial ao António pela amizade e apoio.

- À equipa do serviço de manutenção do ISPA, por se terem mostrado pacientes e compreensivos na gestão dos trabalhos que implicavam muito barulho com os períodos experimentais, respeitando sempre a indicação “Experiência em Curso, Silêncio”.
- À Ana Sofia por toda a ajuda no laboratório, pela amizade e apoio
- À Sara que se tem revelando uma grande amiga, para todas as horas!
- À Magda, para mim o maior valor do IBBG (sem contar com o chefe!), uma amiga para todo o sempre, agradeço toda a partilha profissional e pessoal.
- À Leonor, que é realmente uma fonte de inspiração, no profissionalismo, nos valores e na capacidade que tem de educar, fazendo com que tudo pareça simples. Nesta última tarefa, a inspiração nas suas capacidades tem dado bons frutos na educação do meu João.
- Aos meus amigos, Rita, Liliana, Fernanda, Marta, Isabel, Rui, Zélia, agradeço todo o apoio e preocupação e principalmente aos meus grandes amigos Rosinha e Beto que adoro como meus irmãos!
- Ao meu grupos de amigas biólogas, Kikas, Tita, Inês, Natacha que só sabem fazer meninos, faltam ainda as Anas e Carla para mudar a tendência. Obrigada por terem insistido nos nossos encontros que com as famílias a aumentar são cada vez mais divertidos.
- À minha família, em especial aos meus irmãos e irmãs por toda a ajuda e incentivo.
- À minha sobrinha Daniela, que até ao nascimento do meu filho era o meu maior Amor. És linda!
- Aos meus sogros e tios, pela disponibilidade e carinho demonstrados.
- Ao meu querido Filipe, por todo o seu amor, apoio e compreensão. É Talvez a maior “vítima” deste doutoramento, foi trocado muitas vezes ao fim de semana pelas Tilápias. Agora vou compensar-te!
- Ao meu filho João por existir, por sorrir todos os dias e dizer “vais conseguir mamã, vais conseguir”, apesar de ser melhor não falar do seu contributo para a realização desta tese...
- À minha querida mãe, por ser Mãe, e fazer questão de todos os dias mostrar que está comigo, pela sua coragem em enfrentar os mais difíceis obstáculos da vida, por fazer questão de expressar quando tem orgulho em mim e também de me aconselhar, por toda a sua ajuda e apoio, pelo seu amor.

*À minha Mãe,
e à memória do meu Pai*

Resumo

A reprodução em teleósteos é controlada pelo eixo hipotálamo-pituitária-gónada (HPG) que modula a gametogénese, o desenvolvimento dos caracteres secundários e a expressão do comportamento reprodutor. A informação sobre fatores endógenos e exógenos é integrada no cérebro e a atividade do eixo HPG é regulada, fazendo com que traços comportamentais sejam expressos no momento e no contexto certos. Fatores exógenos relacionados com condições físicas do ambiente (e.g. temperatura e fotoperíodo) têm o papel principal no controlo da reprodução. No entanto, o estatuto social e o contexto social têm sido menos estudados. Mecanismos hormonais e neuroendócrinos são muito conservados ao longo dos vertebrados, fazendo dos peixes um bom modelo para o estudo da endocrinologia do comportamento.

Os objetivos gerais deste trabalho consistem em determinar de que forma o contexto social interfere na expressão do comportamento e o papel de mecanismos hormonais e neuroendócrinos nesse processo, sendo abordados dois mecanismos, os androgénios e os neuropéptidos arginina vasotocina (AVT) e Isotocina (IT), dando-se especial relevância à AVT.

A tilápia moçambicana (*Oreochromis mossambicus*) foi o modelo usado. A sua biologia é bem conhecida, é muito adaptável a condições artificiais, e que tem uma importância económica crescente. Esta espécie possui um sistema social elaborado, com machos a organizarem-se em arenas reprodutoras, onde escavam depressões no substrato, para as quais atraem as fêmeas para a reprodução. Todos os trabalhos apresentados nesta dissertação tiveram como sujeito focal o macho.

Esta tese está organizada quatro capítulos. No capítulo I- Introdução geral, é apresentada uma revisão da literatura relevante para enquadrar o presente trabalho.

Os capítulos II e III englobam os 4 artigos científicos que foram redigidos, denominados de artigo 1 a 4, consoante a ordem em que são apresentados na tese.

O capítulo II, intitulado “Modulação social da reprodução”, é apresentado um estudo (artigo 1) que aborda o efeito do ambiente social no comportamento e no estado fisiológico da tilápia moçambicana. Com este trabalho pretendia-se perceber qual o efeito do contexto de instabilidade social nos níveis plasmáticos hormonais e a influência destes contextos na

criação de padrões de comportamento. Gerou-se com sucesso um cenário de instabilidade social, através da substituição de machos dominantes entre replicados, por oposição ao contexto social estável em que os animais foram retirados e reintroduzidos no mesmo aquário. Em contexto social instável verificou-se tal como esperado, um aumento do comportamento agonístico. Apesar da agressividade não ter sido acompanhada pelo aumento dos níveis hormonais, os resultados sugerem que os androgénios funcionam como fator de reforço da integração na criação de padrões comportamento em contexto social instável, mostrando assim uma otimização do comportamento em períodos de instabilidade social.

No capítulo III, intitulado “Mecanismos reguladores do comportamento social”, são apresentados três artigos e foi dividido em duas secções. Na primeira é abordado o papel dos androgénios (artigo 2) e na segunda o papel da AVT e IT (artigo 3 e 4) na regulação do comportamento social. Em relação ao estudo do papel dos androgénios (artigo 2), pretendeu-se estudar o efeito da falta de androgénios em circulação na exibição do comportamento agonístico e reprodutor. Para tal, procedeu-se à castração de machos de tilápia. A remoção integral das gónadas baixou os níveis de androgénios em cerca de 90% para a testosterona e quase 100% para 11KT e provocou uma completa abolição do comportamento reprodutor (construção do ninho, coloração nupcial e corte), no entanto o comportamento agonístico não foi afetado. Revelou-se desta forma que o mecanismo de regulação do comportamento reprodutor e agonístico é diferente, com os androgénios como agentes mediadores do comportamento reprodutor e moduladores do comportamento agonístico, uma vez que a literatura existente relaciona os androgénios com o comportamento agonístico nesta espécie. O estudo da regulação da AVT e IT em função do estatuto social foi efetuado com duas abordagens diferentes, resultando em dois artigos científicos (artigo 3 e 4). A primeira tinha como objetivo perceber se a AVT e IT estava distribuída por todo o cérebro em quantidades mensuráveis ou apenas em alguma área específica, além de perceber qual a diferença dos níveis cerebrais e glândula pituitária entre machos dominantes e subordinados. Procedeu-se ao doseamento da AVT e IT no cérebro através de cromatografia de fase líquida (high performance liquid chromatography, HPLC) em machos dominantes e subordinados (com o estatuto estabilizado há pelo menos 5 semanas). O cérebro foi dividido em 7 áreas [bolbos olfativos, telencéfalo, teto ótico, diencéfalo, cerebelo, rombencéfalo e pituitária (considerada como área cerebral para efeitos comparativos)]. Verificou-se que a área que apresentou uma maior concentração de neuro péptidos (AVT e IT) foi a pituitária, seguida dos bolbos olfativos e finalmente as restantes áreas. A existência destes neuropéptidos no bolbo olfativo sugere que a AVT e IT estão implicadas no mecanismo de reconhecimento social. Esta relação tem particular importância

para esta espécie uma vez que a Tilápia usa o mecanismo do olfacto, por exemplo para o reconhecimento do estado reprodutivo das fêmeas. Machos subordinados apresentaram concentrações de AVT superiores na pituitária, o que sugere a influência da AVT num processo fisiológico específico relacionado com a subordinação. Uma vez que machos subordinados armazenam menos urina do que machos dominantes (machos dominantes armazenam grandes quantidades de urina que libertação de forma pulsátil, de forma dependente do contexto, aumentando o número de pulsos na presença de machos rivais ou fêmeas pré-ovuladas). A AVT pode estar a exercer um efeito antidiurético nos machos subordinados diminuindo assim a produção de urina. Machos dominantes apresentaram valores superiores de IT no rombencéfalo, sugerindo que a isotocina pode estar relacionada com o comportamento social em dominantes. Para avaliar o efeito do estatuto na organização dos grupos neuronais produtores de AVT (situados na área pré-ótica) foram criadas condições semelhantes à situação anterior, neste caso foram contabilizados os neurónios imunorreativos à AVT na área pré-ótica e medida a área dos corpos celulares em machos dominantes, subordinados e fêmeas. Os grupos neuronais da área pré-ótica são constituídos por células parvocelulares (pPOA), magnocelulares (mPOA) e gigantocelulares (gPOA). A literatura relaciona uma maior expressão de células pPOA em machos subordinados e gPOA em dominantes, no entanto os resultados do artigo 4 mostraram que machos subordinados aumentaram a área dos corpos celulares de todos os grupos neurais, e todos os grupos apresentam projeções para pituitária (apesar de projetarem para outras áreas) sugerindo que este aumento generalizado do tamanho das células implica um aumento da produção de AVT direcionada para a pituitária. As células (principalmente a área dos corpos celulares) correlacionaram-se negativamente com o comportamento agressivo e positivamente com o comportamento de fuga, sugerindo uma inibição geral do comportamento reprodutor e agonístico em machos subordinados. O tamanho das células mPOA está inversamente associado ao peso do rim o que sugere um efeito deste grupo neural no rim provavelmente implicado no mecanismo antidiurético em machos subordinados.

Os resultados obtidos nos vários trabalhos realçam a importância do contexto social na modulação do comportamento social, evidenciado um papel importante dos androgénios e AVT/IT na regulação do comportamento.

Palavras-chave: estatuto social, arginina vasotocina, isotocina, androgénios, modulação social.

Abstract

Although vertebrates share the same neuroendocrine mechanisms in the regulation of social behaviour, there is considerable diversity in the way these mechanisms act on behavioural modulation. Given their diversity teleost fish offer an excellent opportunity for comparative studies on behavioural neuroendocrinology. The main goal of this thesis is to investigate the neuroendocrine mechanisms underlying social behaviour in an African cichlid fish, the Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*), and how these mechanisms respond to changes in the social environment. Two candidate neuroendocrine mechanisms were selected for analysis, due to their known role in other species: androgens and the neuropeptide arginine-vasotocin (AVT). This thesis is organized into four chapters. A review of the state-of-the-art is presented in the first chapter where the conceptual background is settled for the following empirical chapters. In chapter 2 the effect of social environment on the association pattern between hormones and behaviour was investigated by manipulating the composition of social groups. Hence stable and unstable groups were formed. Results indicate that social instability promote an associated pattern between steroid hormones and social behaviour, whereas under social stability behaviour becomes uncoupled from hormones. Chapter 3, which addresses the regulatory mechanisms of social behaviour is subdivided in two parts, the first addressing the role of androgens, and the second the role of AVT. To assess the role of androgens a castration experiment was performed, which revealed that reproductive behaviours (e.g. courtship, nest building, nuptial colouration) but not aggressive behaviour, are androgen dependent. In the second part of chapter 3 the role of AVT on tilapia social behaviour was investigated using two complementary methods: HPLC quantification of AVT peptide in different brain regions of different behaviour phenotypes (dominant vs. subordinate males); and immunocytochemical identification of AVT neuronal populations and their quantification in different behavioural phenotypes (dominant vs. subordinate males). It was shown that AVT is higher in subordinate males and is associated with the expression of submissive behaviours. Finally in the last chapter the results from the studies presented in this thesis are discussed in the scope of the literature of the neuroendocrine regulation of social behaviour.

Keywords: social status, arginine vasotocin, isotocin, androgens, social modulation

Índice

I- Introdução Geral.....	13
1- O sistema neuroendócrino: o lugar central da hipófise	13
1.1- A adeno-hipófise.....	15
1.1.1- O eixo hipotálamo-pituitária-gónada	15
1.1.2- O eixo hipotálamo-pituitária-inter-renal	15
1.2- A neuro-hipófise	16
1.2.1- Arginina-vasotocina e Isotocina	16
2- O comportamento social em ciclídeos	17
2.1- Plasticidade comportamental.....	18
2.1.1- Modulação social da reprodução	20
2.1.1.1- <i>Influência do ambiente social na resposta comportamental</i>	20
2.1.1.2- <i>Modulação social do eixo HPG: efeito das interações sociais nos níveis de androgénios</i>	23
2.2- Neuroendocrinologia do comportamento: mecanismos neuroendócrinos reguladores do comportamento	25
2.2.1- O papel dos androgénios no comportamento.....	26
2.2.2- O papel da AVT e IT no comportamento.....	27
2.2.3- A rede neural do comportamento social “ <i>the social behavior network</i> ”	32
3- A tilápia moçambicana como modelo de estudo.....	33
3.1- O comportamento social.....	33
3.1.1- O comportamento agonístico em machos.....	34
3.1.2- O comportamento reprodutor em machos.....	36
3.2- O Modelo de Estudo	37
4- Organização geral da tese e objetivos.....	38
II- Modulação Social da Reprodução	40
1- Influência do contexto social na criação de padrões de associação entre hormonas e comportamento.....	40
III - Mecanismos Neuroendócrinos reguladores do comportamento Social	73
1- A castração afecta o comportamento reprodutor, mas não influencia o comportamento agonístico	73

2- Níveis cerebrais de arginina vasotocina e isotocina em machos dominantes e subordinados.....	90
3- Fenótipos neurais da arginina vasotocina em função do estatuto social.....	108
IV- Discussão Geral.....	127
1- Modulação social da reprodução.....	128
2- Os androgénios como mecanismos reguladores do comportamento social.....	133
3- A AVT/IT como mecanismos reguladores do comportamento social.....	136
4- Interação entre mecanismos: AVT e Androgénios.....	142
5- Considerações finais.....	143
V - Referências Bibliográficas.....	144
Anexo 1- Fotografia: A divisão do cérebro em macro-áreas.....	158

I- Introdução Geral

Os estudos efetuados nesta tese debruçaram-se sobre a neuroendocrinologia do comportamento social em machos de *Oreochromis mossambicus*. A introdução apresentada para enquadrar os trabalhos segue essa lógica dando especial relevo à literatura relacionada com comportamento social em machos.

1- O sistema neuroendócrino: o lugar central da hipófise

Em teleósteos, tal como em outros vertebrados, o sistema neuroendócrino é organizado segundo uma forma hierárquica, com o hipotálamo a controlar a atividade da hipófise (ou glândula pituitária) que por sua vez controla uma variedade de glândulas endócrinas periféricas (tíróide, tecido inter-renal, gónadas, ver fig 1.). A hipófise divide-se em duas zonas distintas, a hipófise anterior (adeno-hipófise) e a hipófise posterior (neuro-hipófise), sendo a secreção das hormonas pela adeno-hipófise controlada por fatores de libertação produzidos por neurónios hipotalâmicos (Schreibman, 1986). Ao contrário dos outros vertebrados, os teleósteos não possuem uma rede vascular (portal) entre o hipotálamo e a pituitária para encaminhar os fatores de libertação, sendo a pituitária diretamente enervada pelos neurónios hipotalâmicos formando o eixo hipotálamo-pituitária (Peter et al., 1990). Neste eixo, hormonas hipotalâmicas específicas [e.g., hormonas libertadoras (também designadas por fatores de libertação) de gonadotrofina (GnRH), corticotrofina (CRH) e hormona de crescimento (GHRH)] controlam a libertação de hormonas específicas pela pituitária [e.g., hormona luteinizante (LH), hormona foliculoestimulante (FSH), adrenocorticotrofina (ACTH), hormona tirotrófica (TSH), hormona de crescimento (GH)], que são produzidas por diferentes grupos celulares na adeno-hipófise (i.e, gonadotrofos, corticotrofos, tirotrofos e somatotrofos). A neuro-hipófise recebe projeções neurais diretamente da área préótica que terminam em redes capilares, sendo as neurohormonas diretamente libertadas na rede sanguínea (fig 1.).

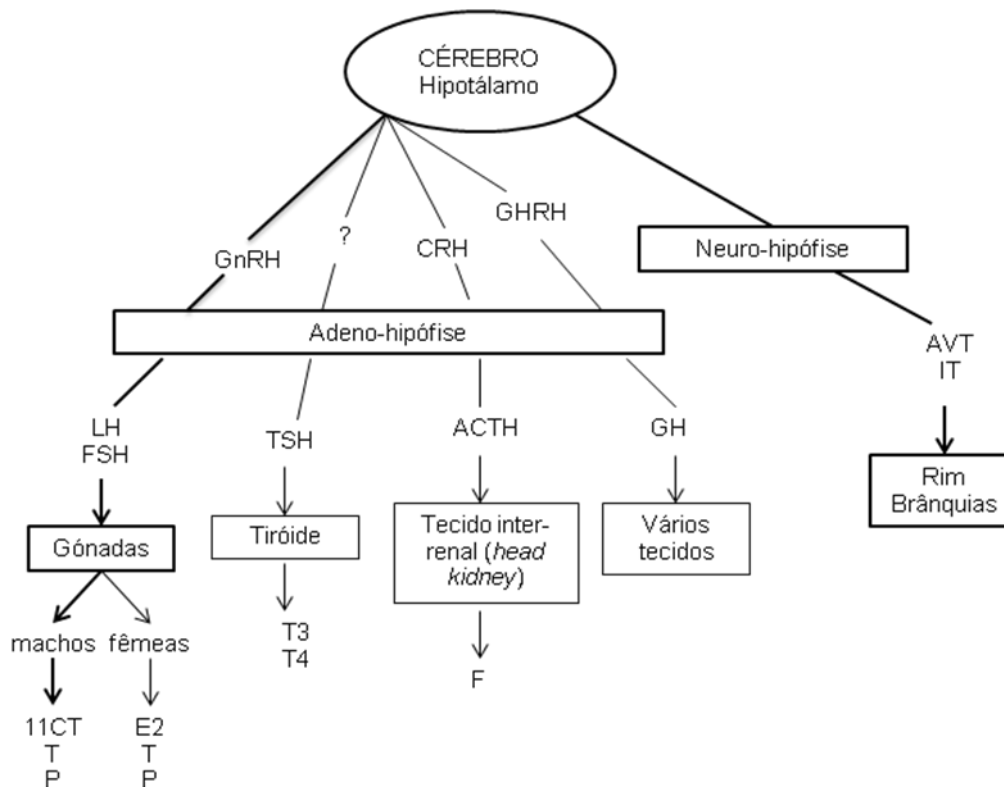


Fig.1- Organização hierárquica do sistema neuroendócrino. Representação do eixo hipotálamo-hipófise no controlo de glândulas periféricas e tecidos. Abreviações: GnRH, fator de libertação de gonadotrofina, CRH, fator de libertação de corticotrofina, GHRH, fator de libertação de hormona de crescimento, ?, hormona desconhecida, LH, hormona luteinizante ou luteína, FSH, hormona foliculoestimulante ou foliculoestimulina, TSH, hormona tirotrófica, ACTH, adrenocorticotrofina, GH, hormona de crescimento, AVT, arginina-vasotocina, IT, isotocina, 11CT, 11-cetotestosterona, T, Testosterona, P, progestogénio, E₂, estradiol, T₃, tri-iodotironina, T₄, tiroxina. Adaptado de Oliveira and Gonçalves, (2008).

Nesta dissertação, o papel dos androgénios e o papel da arginina-vasotocina/isotocina (AVT/IT) no comportamento social do ciclídeo *Oreochromis mossambicus* são os principais mecanismos estudados, pelo que me irei focar o eixo hipotálamo-pituitária-gónada (HPG) e na produção de AVT/IT pela neuro-hipófise. O eixo hipotálamo-pituitária-inter-renal (HPI) terá também algum destaque uma vez que os níveis circulantes do cortisol foram medidos em quase todos os trabalhos apresentados nesta tese, de forma a controlar eventuais efeitos geradores de estresse.

1.1- A adeno-hipófise

1.1.1- O eixo hipotálamo-pituitária-gónada

O eixo principal que controla a reprodução em peixes é (tal como em outros vertebrados) o eixo HPG. A sua ação passa pela regulação de fatores que vão desde o desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários até à exibição de comportamentos sociais.

A GnRH é um neuropéptido constituído por 10 aminoácidos, produzido no hipotálamo e libertado na hipófise anterior, por inervação direta das células gonadotróficas. O seu principal papel é causar a libertação de gonadotrofinas pela pituitária. Esta ação está dependente de sinais estimuladores ou inibidores provenientes das gónadas (Levavi-Sivan et al., 2006) e de estímulos externos (e.g., temperatura, fotoperíodo e ambiente social, Francis et al., 1993). São produzidos dois tipos de gonadotrofinas, FSH e LH. A FSH encontra-se relacionada com as primeiras fases do desenvolvimento das gónadas, nomeadamente na vitelogénese nas fêmeas e espermatogénese nos machos (Schulz et al., 2001; Tyler et al., 1997). A função da LH está relacionada com os estádios finais de maturação das gónadas, ovulação e espermiacção (Planas e Athos, 2000; Schulz et al., 2001). Estas hormonas são distribuídas pela corrente sanguínea e têm uma ação direta nas gónadas estimulando a produção de esteróides.

De uma forma geral, machos e fêmeas apresentam diferenças nos níveis circulantes de esteróides, com os machos a apresentar valores baixos ou não detetáveis de estradiol (E_2) e altos de 11CT e fêmeas o oposto. No entanto, a T não apresenta essa assimetria, podendo em períodos de regressão das gónadas exibir concentrações superiores aos machos (Borg, 1994). Ao contrário das aves e mamíferos onde o principal androgénio é a testosterona e a dihidrotestosterona, em peixes a 11CT é o androgénio com maior atividade biológica, além de ter a particularidade de não ser aromatizável (não é metabolizado pela ação da enzima aromatase, Borg, 1994).

1.1.2- O eixo hipotálamo-pituitária-inter-renal

O eixo HPI é o sistema neuroendócrino que controla a libertação de glucocorticoides como resposta a um agente estressante (Carrasco e Kar, 2003; Wendelaar-Bonga, 1997). O agente estressante excita o sistema nervoso central (CNS), que ativa o eixo HPI através da estimulação do hipotálamo, este por sua vez liberta CRH, que estimula (juntamente com a AVT) a pituitária para a libertação de ACTH. Quando a ACTH atinge o tecido inter-renal, induz a libertação de glucocorticoides no sangue, sendo o cortisol o mais importante em

teleósteos. O eixo HPI é regulado por um sistema de retroação negativa (Carrasco e Kar, 2003). Os glucocorticoides estão envolvidos na manutenção da homeostasia, supressão da resposta imunitária, inibição de funções reprodutoras, entre outros (Wendelaar-Bonga, 1997)

1.2- A neuro-hipófise

Neurónios situados na área pré-ótica do hipotálamo anterior segregam substâncias chamadas neuro-hormonas. A sua ação atua na regulação de processos periféricos e centrais como neuromoduladores de comportamentos sociais (Caldwell et al., 2008).

1.2.1- Arginina-vasotocina e Isotocina

A AVT e IT são neuropéptidos homólogos da arginina vasopressina (AVP) e oxitocina (OT) em mamíferos. Em teleósteos, a AVT e IT são produzidas em neurónios neurosecretores da área pré-ótica (situada na zona anterior do hipotálamo), que projetam para a neuro-hipófise (onde são armazenados antes de serem libertados para a corrente sanguínea), e para outras regiões cerebrais (Butler e Hodos, 2005; Holmgvist e Ekström, 1995). Em teleósteos a área pré-ótica (POA) apresenta três grupos neuronais: células parvocelulares (pPOA), magnocelulares (mPOA) e gigantocelulares (gPOA). Em mamíferos a AVP e OT é maioritariamente produzida no núcleo supra-ótico (SON, homólogo à mPOA e gPOA em teleósteos) e no núcleo periventricular do hipotálamo (PVN, homólogo à pPOA em teleósteos, Carter et al 2009).

Foram descritas três famílias de recetores de AVP em mamíferos: V1 (também chamado V1a), V2 e V3 (também chamado V1b). Os recetores do tipo V1 são geralmente encontrados na musculatura vascular e nos rins, e a sua ativação provoca vasoconstrição. Os recetores do tipo V2, encontram-se nos ductos coletores dos rins, e a sua ativação provoca um efeito antidiurético. Os recetores do tipo V3 são expressos na hipófise anterior (Holmes et al., 2003, para revisão) e a ativação destes recetores estimula a libertação de ACTH (Fryer et al., 1985; Gillies et al., 1982). Em teleósteos, o recetor de AVT clonado (AVT-R) está presente em diversos tecidos (e.g, pituitária e branquias em *Catostomus commersoni*, Mahlmann et al., 1994; cérebro, rim e branquias em *Platichthys flesus*, Warne, 2001, intestino, *Sparus aurata*, Martos-Sitcha et al., 2013).

Recetores de isotocina estão também localizados em vários tecidos, tais como: cérebro, intestino, músculo, branquias, linha lateral e rim (e.g. *Catostomus commerson*, Hausmann et al., 1995).

2- O comportamento social em ciclídeos

De acordo com (Barlow, 1991), os ciclídeos exibem vários de sistemas de acasalamento e cuidados parentais reconhecendo-se dois padrões básicos:

- a) Monogamia: encontra-se em espécies geralmente sem dimorfismo sexual acentuado, com uma ligação duradoura do par e com guarda e ventilação de ovos e larvas depositados no substrato;
- b) Poligamia: espécies sexualmente dimórficas com poliginia e possível ocorrência de poliandria, com comportamentos de corte curtos e incubação bucal de ovos e larvas realizada por machos ou fêmeas dependendo da espécie.

Uma particularidade adicional da biologia da reprodução nos ciclídeos é a ocorrência de cuidados parentais femininos, quando a regra entre os teleósteos é a ocorrência de cuidados parentais masculinos (Almada, 1990). A incubação bucal permite a separação do par após o momento da postura (Fryer e Iles, 1972). Os peixes ciclídeos com incubação bucal materna apresentam outra particularidade que é a ocorrência de grandes agregações de territórios masculinos designados por arenas reprodutoras (“leks”), onde os machos não participam nos cuidados parentais servindo as agregações apenas para locais de acasalamento, não ocorrendo defesa dos recursos alimentares (Bradbury e Gibson, 1983; Bruton e Boltt, 1975). De acordo com Clutton-Brock e colaboradores, (1992) este tipo de agregações apresenta vantagens para machos e fêmeas. Ao agregarem-se, os machos aumentam a atratividade em relação às fêmeas e proteção contra predadores. As fêmeas beneficiam de vantagens ao nível da escolha do parceiro sexual, que lhes asseguram o acasalamento com machos mais aptos. A posição dos machos na arena de reprodução implica uma cascata de complexas interações sociais, com definição e defesa de territórios e manutenção de hierarquias sociais.

2.1- Plasticidade comportamental

Os animais sociais de forma a otimizar as suas relações têm a necessidade de ajustar o seu comportamento em relação ao meio onde vivem. Alexander, (1974) resume os mais importantes benefícios e custos para os animais em geral, quando incluídos em agrupamentos sociais. Foram descritos como benefícios: a) redução da pressão por parte dos predadores, através de uma melhor deteção ou repulsão dos inimigos, ou ainda através do efeito de diluição; b) aumento da eficiência na procura de alimento; c) melhor defesa do espaço e de recursos alimentares; d) melhoria dos cuidados parentais, devido ao acesso a comida e proteção mais facilitados. Como custos associados distam: a) aumento da competição dentro do grupo por alimento, parceiro sexual ou outros recursos limitados; b) aumento do risco de infeções, doenças ou parasitas por contágio; c) aumento do risco de interferência e exploração nos cuidados parentais por outros membros do grupo.

Um ajustamento eficaz do comportamento deve ter em consideração um aumento do sucesso reprodutor (fitness) e uma diminuição dos custos associados. A eficácia com que um determinado indivíduo otimiza a expressão do comportamento em função da informação social disponível, é chamada competência social (Oliveira, 2009; Taborsky e Oliveira, 2012). A capacidade de um indivíduo para modificar o seu comportamento em função de alterações no estatuto social (e.g. dominante e subordinado) contexto social (e.g. efeito de audiência, efeito *bystander*, efeito querido inimigo, fenómenos explicados mais detalhadamente na secção seguinte) ou ambiente (e.g. estação sazonal, localização espacial), é designada de plasticidade comportamental e é um requisito fundamental para aferir a competência social. Desta forma, o mesmo indivíduo pode responder de modo distinto em relação ao mesmo estímulo (e.g. presença de um parceiro social), dependendo da variação do seu estado interno (e.g. estado hormonal). A análise da plasticidade pode abranger mecanismos próximos, que envolvem alterações genéticas ou hormonais, ou últimos, com consequências evolucionárias.

Segundo Oliveira (2012), a análise da plasticidade comportamental deve ser efetuada seguindo uma visão integrativa. Em contexto social, os indivíduos ajustam a expressão do comportamento de acordo com a informação social adquirida em experiências prévias ou através da observação de interações de conspecíficos (fig. 2a), a avaliação cognitiva dessa informação permite-lhes caracterizar o estímulo, em termos de valência e saliência (fig. 2b) através de uma rede neural específica (*social brain network*, SBN, descrita sumariamente na secção 2.2.3) constituída por vários nódulos relacionados (fig. 2c) e em cada nódulo, os neurónios alteram o seu estado neurogénico, ou seja, alteram o seu perfil de expressão

gênica em resposta à percepção do estímulo social (fig. 2d). A variação da expressão gênica é despoletada pela ativação de fatores de transcrição reguladores da atividade neuronal (e.g. p-cAMP), que regula os *immediate early genes* (e.g. *c-fos*), os quais podem regular as proteínas sinápticas modulando assim a plasticidade neural, responsável pela plasticidade comportamental (fig. 2d, Oliveira, 2012).

Sendo a exibição de um comportamento específico, o resultado de uma ativação diferencial dos vários nódulos da SBN (Goodson et al, 2005), a plasticidade é definida pelas diferenças temporais e espaciais na regulação gênica desses nódulos (Oliveira, 2012).

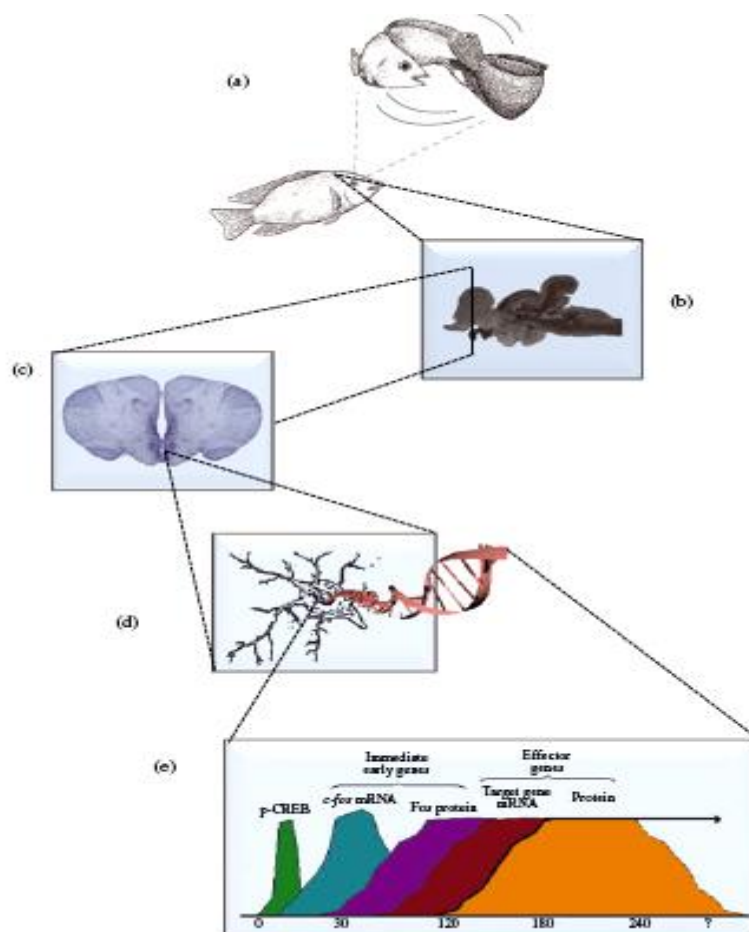


Fig. 2- Mecanismos de plasticidade social: a) aquisição de informação social; b) avaliação da informação a nível central; c) codificação da informação em rede neural específica; d) alterações no estado neurogênico; e) variação na expressão gênica e consequente exibição de comportamento ajustado (adaptado de Oliveira, 2012).

Os peixes teleosteos são excelentes modelos para estudar a plasticidade comportamental, uma vez que apresentam uma grande diversidade de comportamentos sociais relacionados

com a organização social, sistemas de acasalamento, tipos de cuidados parentais e mudanças de sexo (Oliveira, 2012).

2.1.1- Modulação social da reprodução

Em muitos vertebrados o comportamento social é regulado pelas interações sociais, em que os machos dominantes controlam o acesso às fêmeas, tal como acontece na tilápia, espécie usada como modelo neste trabalho (Baerends and Baerends-van Roon, 1950). Nos pontos que se seguem serão relatados alguns exemplos, que ilustram a forma como o ambiente social pode modificar a resposta comportamental, através de experiências adquiridas (interação social) ou modulação do sistema neuroendócrino (eixo HPG).

2.1.1.1- Influência do ambiente social na resposta comportamental

De um modo geral, os indivíduos envolvem-se em diversos tipos de interações com conspecíficos, quer diretamente (com exibição de comportamentos dirigidos, indispensáveis para a manutenção/aquisição de um estatuto social favorável) ou por observação (efeito *bystander*).

O Estatuto social

O estabelecimento de hierarquias permite aos animais a organização da população em diferentes graus de poder, onde os machos com posição superior na hierarquia têm acesso privilegiado a recursos limitados. Os machos alfa têm geralmente melhor condição física, o que lhes permite investir mais energia nos desafios sociais constantemente apresentados e, conseqüentemente, uma maior probabilidade de manter a posição hierárquica. Tendo em conta o próprio estatuto social, os indivíduos avaliam, por exemplo, o macho rival (ou o potencial parceiro sexual), tomando decisões de acordo com o seu estado interno e com as condições externas apresentadas.

Machos de diferentes estatutos sociais (dominantes e subordinados) apresentam variações internas diferenciadas (*e.g.* expressão de perfis génicos: ratos, Kroes et al., 2006, *zebrafish*, Oliveira et al, dados não publicados; expressão de recetores de esteróides sexuais em *Astotilapia burtoni*, Burmeister et al., 2007, Maruska e Fernald, 2010a; níveis hormonais

circulantes, Hirschenhauser e Oliveira, 2006, Hirschenhauser et al., 2008). Estas variações internas permitem que os indivíduos se comportem de forma diferente perante o mesmo tipo de estimulação. Por exemplo, um trabalho recente de O'Connell e Hofmann (2012) em *Astotilapia burtoni* mostrou que machos dominantes e subordinados sujeitos ao mesmo tratamento (injeção de agonistas e antagonistas de esteróides sexuais) revelaram respostas comportamentais diferentes. Os autores verificaram que os androgénios e progestinas modularam o comportamento de corte apenas em machos dominantes, enquanto o tratamento com antagonistas provocou alterações nos níveis circulantes de hormonas e tamanho das gónadas apenas em machos subordinados (O'Connell and Hofmann, 2012).

O estatuto social aparece também associado à produção de sinais (e.g. olfactivos, elétricos) de diferentes amplitudes, cujas funções são de extrema importância nas interações sociais. No caso da espécie modelo nesta dissertação, a tilápia moçambicana, machos dominantes e subordinados produzem urina com diferentes potências olfativas, sendo a urina de machos com posição hierárquica superior um estímulo mais forte (Barata et al., 2008) e um veículo de uma putativa feromona (Barata et al., 2007). A libertação de pulsos de urina encontra-se ajustada ao comportamento social específico e depende do estatuto social (Barata et al., 2008).

A manutenção do estatuto social envolve interações agonísticas, onde a tomada de decisão entre escalar a luta ou desistir será vantajosa, se os custos associados forem inferiores aos ganhos conquistados, uma vez que o preço a pagar pela manutenção do estatuto social é elevado (e.g. manutenção de níveis androgénios e agressividade elevados, Castro et al., 2006; Ros et al., 2004, 2006)

A experiência prévia como agente modificador: efeito vencedor/derrotado

Os confrontos entre animais são influenciados pela experiência adquirida, ou seja, se um animal teve uma experiência prévia de vitória aumenta a probabilidade de ganhar um confronto subsequente contra um novo oponente (efeito vencedor; *winner effect*), enquanto uma experiência prévia de derrota tem o efeito contrário (efeito derrotado; *loser effect*, Dugatkin, 1997, Hsu e Wolf, 1999). O efeito derrotado é mais pronunciado e prolonga-se mais no tempo do que o efeito vencedor (e.g. Bakker et al., 2010; Chase et al., 1994; Earley et al., 2013; Rutte et al., 2006). O efeito vencedor e derrotado em peixes está verificado para uma variedade de espécies (e.g. *Gasterosteus aculeatus*, Bakker et al., 2010; *Lepomis gibbosus*, Chase et al., 1994; *Rivulus marmoratus*, Hsu and Wolf, 1999; *Oreochromis*

mossambicus, Oliveira et al., 2009; *Danio rerio*, Oliveira et al., 2011; *Kryptolebias marmoratus*, Lan e Hsu, 2011).

A experiência prévia como agente antecipador: efeito bystander e resposta condicionada

Observar uma interação entre conspecíficos pode originar mudanças no comportamento do observador (efeito *bystander*), provocadas pela aquisição de informação relevante durante a interação (espionagem, *eavesdropping*) ou acentuar a motivação para a agressão como resultado da experiência prévia (efeito de pré-ativação; *priming*). Por exemplo, em *Betta splendens*, os machos aumentam a latência para a aproximação e exibição quando confrontados com os vencedores das interações que pré-visualizaram (*eavesdropping*, Oliveira et al., 1998) e a exposição de observadores a uma experiência agonística entre conspecíficos aumenta a motivação destes para lutar (*priming*, medido pelo aumento do número de eventos agonísticos, Clotfelter e Paolino, 2003)

Outra forma de antecipação é a exibição de uma resposta condicionada como consequência de uma aprendizagem prévia. Um exemplo do valor adaptativo da resposta condicionada foi mostrado em codorniz japonesa, *Coturnix japonica*, onde o sucesso reprodutor (medido pela eficiência dos comportamentos de copulação e percentagem de ovos fecundados) em animais previamente expostos a um parceiro sexual associado a uma luz foi significativamente superior a animais não condicionados. No entanto, este aumento só se verificou quando ambos os animais foram condicionados, ou seja, quando os dois intervenientes tinham condições para antecipar a resposta (Mahometa e Domjan, 2005).

Efeito querido inimigo e efeito de audiências

Algumas espécies territoriais respondem de forma menos agressiva à entrada de um vizinho no seu território do que à entrada de um estranho. Essa diferença na intensidade da resposta agressiva é conhecida por efeito querido inimigo (*dear enemy effect*). A redução da agressividade dirigida a um vizinho, traz vantagens uma vez que: 1) as fronteiras de territorialidade estão estabelecidas entre o macho residente e o vizinho, não sendo considerado, em princípio, uma ameaça (Temeles, 1994); 2) redução de custos energéticos, associados a um confronto violento (Ydenberg et al., 1988).

Numa interação social, o facto de os indivíduos estarem a ser observados pode influenciar a exibição do comportamento (efeito de audiências). Em *Betta splendens*, o comportamento agonístico é alterado dependendo do tipo de audiência, com uma diminuição da exibição de “morder” associada à presença de fêmeas (Doutrelant, 2001) e um aumento na presença de machos (Matos e McGregor, 2002).

2.1.1.2- Modulação social do eixo HPG: efeito das interações sociais nos níveis de androgénios

A modulação social pelas hormonas é mediada pela ativação do eixo HPG (Parikh et al., 2006). A interação social pode atuar a vários níveis, desde a regulação da atividade da GnRH (Francis et al., 1993; White et al., 2002) até à sensibilidade dos recetores aos esteróides sexuais (Burmeister et al., 2007). A ativação do eixo HPG pode ocorrer tanto num cenário de desafio social, como através da observação de interações de terceiros.

O desafio social

O desafio social é seguido por um aumento dos níveis de androgénios produzidos pelas gónadas, nomeadamente testosterona em mamíferos e aves e 11 CT e testosterona em teleósteos (Hirschenhauser e Oliveira, 2006). No entanto, nem todas as espécies seguem esse padrão (e.g. *Phoenicurus ochruros*, Apfelbeck and Goymann, 2011; Apfelbeck et al., 2011). Esta modulação social dos androgénios tem sido considerada uma adaptação, de forma a ajustar a agressividade ao ambiente social, uma vez que os androgénios afetam a expressão do comportamento agonístico, embora a resposta não seja generalizada (Oliveira e Gonçalves, 2008; Gonçalves e Oliveira, 2010), mantendo a motivação para lutar por um território ou posição hierárquica.

A modulação recíproca dos androgénios e interações agonísticas foi notabilizada na hipótese do desafio (“*challenge hypothesis*”) proposta por Wingfield et al (1990). De acordo com a hipótese do desafio, os níveis de androgénios aumentam de uma *baseline* não reprodutiva (*non-breeding baseline*) para uma *baseline* reprodutiva (*breeding baseline*), que permite ao animal entrar na época de reprodução, manifestada pelo desenvolvimento das gónadas, de caracteres sexuais secundários e comportamento reprodutor. Posteriormente, em consequência das interações sociais (desafio social por machos conspecíficos) durante

a fase reprodutiva (i.e. época de reprodução), os níveis de androgénios podem aumentar até atingirem um máximo fisiológico (Wingfield et al., 1990).

Oliveira e Gonçalves (2008) apresentaram três pressupostos implícitos na hipótese do desafio. A primeiro refere que as variações nos níveis de androgénios devem ser moduladas pelo sistema de acasalamento. Um estudo especialmente desenhado para testar a hipótese do desafio, a partir de condições laboratoriais estandardizadas, utilizou o paradigma de intrusão territorial em 5 espécies diferentes de ciclídeos com sistemas de acasalamento diferentes. Para todas as espécies, os níveis de 11 CT responderam à interação social, não se observando o mesmo padrão para a testosterona. A magnitude da resposta dada pela 11 CT mostrou-se associada às diferentes estratégias de acasalamento, com os indivíduos monogâmicos e exibirem respostas mais pronunciadas, seguidos de indivíduos poligínicos e por fim os indivíduos com sistema de reprodução em *leks*. O segundo pressuposto relaciona o estatuto social e os níveis de androgénios, assumindo que machos dominantes/territoriais frequentemente envolvidos em encontros agonísticos com vista a defender o seu território e o seu estatuto contra machos rivais, devem possuir níveis de androgénios superiores aos machos subordinados/não territoriais (Oliveira e Gonçalves, 2008). Uma meta-análise que aborda a hipótese do desafio em vertebrados mostrou um efeito muito claro entre o estatuto social e os níveis de androgénios, com machos vencedores a apresentar níveis de androgénios superiores quando comparados com machos derrotados (Hirschenhauser e Oliveira, 2006). Em *Oreochromis mossambicus*, o estatuto social não se apresenta correlacionado com os níveis de androgénios antes da formação do grupo, mostrando no entanto uma forte correlação após a formação (Oliveira et al., 1996). O terceiro pressuposto refere que machos que se reproduzem em populações mais densas apresentam níveis de androgénios superiores, uma vez que, a probabilidade de enfrentarem intrusões territoriais é maior. Também para esta condição, a meta-análise referida acima mostra uma associação entre a densidade nos territórios de reprodução e os níveis de androgénios (Hirschenhauser e Oliveira, 2006). Neste cenário, a associação entre os níveis de androgénios e o estatuto social pode estar presente apenas em condições de instabilidade provocada pelo estabelecimento e defesa de território, luta pela posição hierárquica, apresentando-se dissociados em grupos sociais estáveis (Wingfield et al., 1990; Oliveira e Gonçalves, 2008). De facto, mudanças rápidas nos níveis de androgénios mostraram-se correlacionadas com o comportamento agonístico em períodos de instabilidade social no ciclídeo *Astatotilapia burtoni*, apresentando-se dissociados do comportamento agonístico em condição social estável (Maruska e Fernald, 2010). Uma vez que, a resposta hormonal face a um desafio social ocorre após a interação com um oponente, têm-se sugerido que o valor adaptativo

desta resposta deve estar relacionado com a manutenção da motivação para lutar em ambientes ricos em desafios sociais (Wingfield, 2005; Wingfield et al., 1990).

Efeito *Bystander*

Alguns estudos têm abordado o papel da experiência prévia na variação dos níveis de androgénios. Em *Betta splendens* e *Oreochromis mossambicus*, machos *bystanders* (visualizam a interação mas não estão diretamente envolvidos) de encontros agonísticos entre conspecíficos, aumentaram os níveis de androgénios (Oliveira et al., 2001) e a agressividade em encontros subsequentes (mecanismo de pré-ativação; Clotfelter e Paolino, 2003). Este possível efeito da variação hormonal na motivação para ganhar conflitos, sugere um mecanismo fisiológico baseado em alterações rápidas nos níveis de androgénios, moduladas por experiências sociais prévias (Oliveira, 2009; Oyegbile and Marler, 2005). Antunes e Oliveira, (2009) verificaram que em *Oreochromis mossambicus* esta resposta (no estudo em particular, aumento de 11 CT), envolve mecanismos de aprendizagem associativa, que resulta na ativação hormonal por antecipação, despoletada por pistas (luz, estímulo condicionado) que sinalizam a presença do macho rival.

2.2- Neuroendocrinologia do comportamento: mecanismos neuroendócrinos reguladores do comportamento

A influência das hormonas no comportamento social tem vindo a ser amplamente explorada (ver revisões por Oliveira e Gonçalves, 2008, Gonçalves e Oliveira, 2010). As hormonas têm sido tratadas como agentes causais do comportamento, com atuação direta num determinado padrão, como resultado de trabalhos efetuados com castrações e administração hormonal exógena. No entanto, a castração não apresenta resultados consensuais, quer em comportamentos reprodutores, quer em comportamentos agonísticos em peixes (Oliveira e Gonçalves, 2008, Gonçalves e Oliveira, 2010). O facto de comportamentos sociais (quer agonísticos, quer reprodutores) continuarem a ser expressos após remoção das gónadas (em alguns casos), sugere que as hormonas não são essenciais para a manifestação desses comportamentos.

A atuação das hormonas abrange mecanismos sensoriais (e.g. visual, Boulcott e Braithwaite, 2007, Grens et al., 2005; auditivo, Forlano et al., 2005; olfativo, Cardwell et al., 1995), efetores (e.g. desenvolvimento de traços morfológicos, Brantley et al., 1993;

Connaughton e Taylor, 1995; Leitz, 1987; Oliveira e Almada, 1998a), centrais (e.g. atenção seletiva, Oliveira et al., 1998, resposta condicionada, Moreira et al., 2004) e estruturas somáticas (e.g. coloração, Oliveira e Gonçalves, 2008). Atualmente, as hormonas são vistas como agentes neuromoduladores suscetíveis de atuar a vários níveis (desde sensorial até central), contribuindo para aumentar ou diminuir a probabilidade de exibição de um determinado comportamento (Oliveira et al., 2005).

2.2.1- O papel dos androgénios no comportamento

Além do papel dos androgénios no desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários (Borg, 1994; Liley e Stacey, 1983), diferenciação das gónadas (Strüssmann and Nakamura, 2002) e regulação da espermatogénese (Schulz e Miura, 2002), estes esteróides sexuais apresentam-se fortemente implicados na regulação do comportamento social (Borg, 1994; Liley e Stacey, 1983).

Comportamento agonístico

O efeito da castração (redução dos níveis de androgénios) no comportamento agonístico parece seguir várias direções. Há um caso excecional que registou um aumento (*Gasterosteus aculeatus*), os outros estão documentados com ausência de efeito (e.g. *Trichogaster trichopterus*, *Gasterosteus aculeatus*, *Lepomis megalotis*, *Lepomis gibbosus*, *Salaria pavo*, ver revisões, Oliveira e Gonçalves, 2008, Gonçalves e Oliveira, 2010), ou diminuição (*Gasterosteus aculeatus*, *Astatotilapia burtoni*, *Pseudocrenilabrus multicolor*, *Xiphophorus maculatus*, *Bathygobius soporator*, ver revisões, Gonçalves e Oliveira, 2010; Oliveira e Gonçalves, 2008). No entanto, o efeito positivo da administração exógena de androgénios na agressividade em teleósteos foi confirmado numa meta-análise (Hirschenhauser e Oliveira, 2006). Em *killifish* por exemplo, animais com níveis superiores de testosterona apresentaram-se mais agressivos, mais rápidos a atacar e com maior probabilidade de ganhar (Chang et al., 2012; Earley e Hsu, 2008). O efeito dos androgénios no comportamento pode ser modulado pela aromatização da testosterona em estradiol. No entanto, vários estudos mostraram que o estradiol produz um efeito inibitório na agressão em machos (Bell, 2001; Clotfelter e Rodriguez, 2006; Gonçalves et al., 2007).

Comportamento reprodutor

O efeito da redução de androgénios (pela castração), no comportamento reprodutor é tão variável como no comportamento agonístico. Em algumas espécies não se observou qualquer efeito (e.g. *Sarotherodon melanotheron melanotheron*, *Sarotherodon melanotheron heudelotii*, *Oreochromis upembae*, *Gasterosteus aculeatus*, *Macropodus opercularis*, *Hemichromis bimaculatus*, *Bathygobius soporator*, *Thalassoma bifasciatum*, ver revisões, Oliveira e Gonçalves, 2008, Gonçalves e Oliveira, 2010), noutras espécies verifica-se uma diminuição (e.g. *Lepomis gibbosus* e *L. megalotis*, *Pseudocrenilabrus multicolor multicolor*, *Gasterosteus aculeatus*, *Trichogaster trichopterus*, *Morone americana*, *Trichogaster trichopterus*, *Oncorhynchus mykiss*, ver revisões, Oliveira e Gonçalves, 2008, Gonçalves e Oliveira, 2010). A administração exógena de androgénios (ou bloqueador) após castração está geralmente associada a um efeito positivo dos androgénios na exibição do comportamento reprodutor (e.g. *Lepomis gibbosus* e *L. megalotis*, *Pseudocrenilabrus multicolor multicolor*, *Sarotherodon melanotheron melanotheron*, *Gasterosteus aculeatus*, *Morone americana*, *Trichogaster trichopterus*, ver revisão Oliveira e Gonçalves, 2008) no entanto não se verificou qualquer efeito em *Oncorhynchus mykiss* (Oliveira e Gonçalves, 2008). A administração exógena de testosterona em *Macropodus opercularis* teve diferentes implicações, verificou-se um aumento de copulações no entanto não foi encontrado qualquer efeito no comportamento de construção do ninho. Os androgénios podem também contribuir para a exibição do comportamento reprodutor de uma forma indireta, através da regulação da GnRH (Parhar et al., 2001).

2.2.2- O papel da AVT e IT no comportamento

Insel e Young, (2000) consideram que os sistemas neuropéptidérgicos apresentam três características que os tornam adequados para a regulação do comportamento: a função como neuromoduladores, a localização em vias neurais específicas e a plasticidade em resposta a variações fisiológicas e alterações hormonais.

São conhecidos os efeitos dos neuropéptidos AVT e IT em ações periféricas relacionadas com osmorregulação (Balment et al., 1993; Kulczykowska, 2007), tal como em ações centrais, atuando em mecanismos neurais responsáveis pela expressão do comportamento (Rose and Moore, 2002; Godwin and Thompson, 2012).

Seguidamente irão ser descritos alguns exemplos do papel da AVT e da IT em alguns contextos sociais.

Resposta ao estresse

Em peixes, a AVT e a IT aparecem frequentemente relacionadas com respostas que envolvem condições de stresse, tais como stresse osmótico, perturbação, aumento da densidade e privação de comida, (Gilchriest et al., 2000; Kleszczyńska et al., 2006; Kulczykowska, 2007, 2001, 1997a, 1997b; Mancera e Vargas-Chacoff, 2008). A resposta da AVT ao estresse pode depender de vários fatores. Em truta arco-íris, a resposta mostrou-se dependente da duração do agente estressor, por um lado, a exposição a condições de estresse agudo, provocou um aumento da expressão de AVT em neurónios parvocelulares, por outro lado, a exposição a stresse crónico não produziu qualquer alteração (Gilchriest et al., 2000). Fatores intra-específicos relacionados com estratégias de enfrentamento (*coping*) em ratos selecionados com determinados traços de ansiedade, mostraram um aumento a expressão de AVT entre linhagens que exibem muitos (linhagem de resposta alta) ou poucos (linhagem de resposta baixa) comportamentos padrão de ansiedade (Wigger et al., 2004). No entanto, em trutas arco-íris estirpes selecionadas para resposta alta e resposta baixa ao confinamento não mostraram qualquer variação na expressão cerebral de recetores de AVT, apesar de apresentarem a manutenção dos comportamentos padrão característicos de cada linhagem (Backström et al., 2011).

Efeito antidiurético

Alguns estudos relacionam a AVT com a função antidiurética, investigada em ensaios com perfusão renal deste neuropéptidos (e.g. peixe cão, *Scyliorhinus canicula*, Wells et al., 2002; truta, *oncorhynchus mykiss*, Amer and Brown, 1995). Esta relação tem sido reforçada pela descoberta de recetores de vasotocina no rim (e.g. tipo V1 no glumérulo do linguado *Platichthys flesus*, Weybourne et al., 2005; tipo V1a e V2 no rim do peixe pulmonado africano *Protopterus annectens*, Konno et al., 2009).

Reconhecimento social / Olfato

Em ratos, sabe-se que os homólogos AVP e OT estão envolvidos no reconhecimento social (Lim and Young, 2006), particularmente o recetor V1a, que apresenta um papel essencial no reconhecimento através do olfato (Bielsky et al., 2004). A relação destes neuropéptidos com o olfato foi também evidenciada num estudo em ovelhas, onde a OT e AVP libertada nos bolbos olfativos modularam a libertação de neurotransmissores clássicos como a acetilcolina e noradrenalina e a oxitocina promove também a libertação de *glutamate and γ -aminobutyric acid* (GABA)(Levy et al., 1995). Alguns trabalhos mostram que estes neurotransmissores

atuam na memorização do odor do cordeiro (Kendrick et al., 1992; Lévy et al., 1990; Pissonnier et al., 1985). Tal como em ratos (Fang et al., 2008), em peixes também se verifica a produção de memórias olfativas (salmão, Carruth et al., 2002).

Comportamento agonístico e reprodutor

O efeito da AVT (e em alguns casos IT) no comportamento agonístico em teleósteos apresenta cenários muito divergentes com exemplos que indicam um aumento, uma diminuição e ausência de efeito.

Um modelo muito usado para estudar o efeito da AVT no comportamento é o bodião de cabeça azul (*bluehead wrasse*, *Thalassoma bifasciatum*), uma espécie em que as fêmeas mudam de sexo. Essa transição passa por várias fases, desde machos em fase inicial de desenvolvimento testicular mas sem território conquistado a machos em fase final que possuem um território que defendem de machos rivais. A administração de AVT (1µg/g de massa corporal) em machos com estatuto social distinto (territoriais e não territoriais) provocou diferentes respostas agonísticas (dirigidas a machos em fase inicial de transição). Machos territoriais apresentaram uma tendência para diminuir as perseguições, enquanto machos não territoriais (com condições para assumir territorialidade; remoção de machos em fase final) aumentaram a agressividade e também o comportamento territorial (Semsar et al., 2001). A especificidade da resposta em machos territoriais não foi confirmada com a utilização de antagonista da AVP (composto de Manning, b-mercaptop-b,b-cyclo-pentamethylenepropionyl1,O-Me-Tyr2,Arg8-Vasopressin, 3,2 µg/g de massa corporal), tendo-se verificado uma diminuição da perseguição a machos em fase inicial tal como tinha acontecido com a injeção de AVT (Semsar et al., 2001). No entanto, outro estudo do mesmo autor mostrou que a administração exógena do antagonista da AVP (composto de Manning, 3.2 µg/g de massa corporal), diminuiu o comportamento de defesa do território em machos e fêmeas (Semsar et al., 2004), mostrando assim a importância da AVT na ascensão ao estatuto de dominante/territorial nesta espécie.

Em *Stagastes Leucosticus* (*damselfish*), a injeção de AVT (0.5 µg/g de massa corporal), despoletou um aumento da agressão em machos territoriais enquanto a administração do antagonista (composto de Manning, 1.6 µg/g de massa corporal) resultou no efeito inverso (Santangelo e Bass, 2006).

Por outro lado, o peixe elétrico (*Apteronotus leptorhynchus*) segue o caminho oposto. Esta espécie produz dois tipos de descargas elétricas, denominadas *Chirp I* e *Chirp II*, com

características específicas de frequência e duração, sendo considerados comportamento de corte e comportamento agonístico respectivamente. A administração de AVT (0.08 µg/g de massa corporal) alterou a exibição dos mesmos com um aumento do *Chirp I* e diminuição do *Chirp II* (Bastian et al., 2001).

A modulação da agressão em *Porichthys notatus*, (*plainfin midshipman fish*), constitui um exemplo de variações no efeito dos neuropeptídeos AVT e IT em três diferentes fenótipos comportamentais: machos do tipo 1, constroem e defendem ninhos, cortejam fêmeas, prestam os cuidados parentais e emitem vocalizações durante a defesa do território e cortejamento das fêmeas; machos tipo II, não possuem ninho, não cortejam e não prestam cuidados parentais, baseando-se a estratégia de reprodução em fertilizações furtivas; fêmeas, sem exibição de cuidados parentais. A estimulação da zona anterior do hipotálamo com AVT (1 µg) provocou uma inibição da duração da vocalização em machos do tipo 1 e a estimulação com inibidor provocou um aumento. Pelo contrário, as fêmeas respondem à AVT (1 ng) com um ligeiro aumento da vocalização que por sua vez diminui se a zona anterior do hipotálamo for estimulada pela IT (0.001 µl a 1 µl). Machos do tipo 2 apresentam um padrão semelhante às fêmeas com um efeito da IT na diminuição das vocalizações não apresentando qualquer variação quando estimulados com AVT (Goodson and Bass, 2000).

Um decréscimo da agressão é também verificado em peixe zebra (*Danio rerio*, AVT 1 a 10 µg/g massa corporal) e *amargosa pupfish* (*Cyprinodon nevadensis amargosa*, AVT de 0.1 a 10 µg/g massa corporal), no entanto a injeção do antagonista (composto de Manning, 2.4 e 3.2 µg/g massa corporal, respectivamente) não mostrou qualquer efeito (Filby et al., 2010; Lema e Nevitt, 2004).

Alguns estudos referem-se à agressividade numa relação direta com o estatuto social, uma vez que o estatuto apresenta diferenças neuronais fenotípicas. Em *zebrafish* machos dominantes apenas apresentam células na zona magnocelular da área pré-ótica, enquanto em machos subordinados só a zona parvocelular mostrou reatividade (Larson et al., 2006). De facto, as características das células dos grupos neurais mPOA e gPOA, têm sido implicadas na expressão dos comportamentos agonísticos, uma vez que projetam para áreas incluídas na SBN (Dewan e Tricas, 2011; Dewan et al., 2011a). Por outro lado, neurónios pPOA, têm sido associados ao comportamento típico de subordinado e modulação do estresse (Backström et al., 2011; Gilchrist et al., 2000; Pavlidis et al., 2011), através da estimulação da libertação da ACTH e conseqüente ativação do eixo HPI (Balment et al., 2006).

Em *Thalassoma bifasciatum* (que exibe mudança de sexo de fêmea para macho), apenas as fêmeas que apresentaram comportamentos típicos de machos e com o desenvolvimento das gónadas aumentou o tamanho das células gPOA, comparativamente a fêmeas subordinadas (que não desenvolveram a territorialidade), não se tendo verificado diferenças para os dois outros grupos celulares da área pré-ótica (parvocelular e magnocelular, Semsar and Godwin, 2003). No entanto, a castração de machos dominantes, na fase terminal de diferenciação, provocou um aumento das células gPOA (Semsar e Godwin, 2003).

A AVT é também conhecida pelo seu papel no comportamento reprodutor, geralmente associada a um efeito positivo. No bodião de cabeça azul (*bluehead wrasse*, *Thalassoma bifasciatum*), a injeção de AVT (1 µg/g de massa corporal) provocou um aumento do comportamento de corte em machos territoriais e não territoriais. A especificidade do efeito foi confirmada através da injeção do antagonista (composto de Manning, 3.2 µg/g de massa corporal) em machos territoriais, que conduziu a uma diminuição da exibição deste comportamento (Semsar et al., 2001). Ao contrário, em *Stegastes leucosticus* (*damsel fish*), a injeção de AVT (1 e 0.5 µg/g de massa corporal) não provocou qualquer efeito na exibição do comportamento de corte (Santangelo e Bass, 2010).

O blénio *Salaria pavo* apresenta vários fenótipos comportamentais dependendo da estratégia de reprodução seguida por cada um deles. Os machos burgueses, prestam cuidados parentais, possuem ninhos são cortejados pelas fêmeas e machos *sneakers* (com o objetivo de entrar no ninho para fertilizar os ovos, Almada e Gonçalves, 1995). Nesta espécie, a produção de AVT está correlacionada com a exibição do comportamento de corte. Fêmeas e machos *sneakers* apresentaram expressão de mRNA de AVT superior a machos burgueses (Grober et al., 2002). Este resultado foi confirmado com administração exógena de AVT que provocou um aumento do comportamento de corte e coloração nupcial em machos *sneakers* e fêmeas (Carneiro e Oliveira, 2003).

Uma análise efetuada nas várias fases do sistema de reprodução de *Gasterosteus aculeatus* indicou que, machos territoriais atingiram níveis de AVT mais elevados (medidos por HPLC em cérebro total) no período de cuidados parentais aos ovos (Kleszczyńska et al., 2012). Machos subordinados, apresentaram em geral níveis de AVT inferiores a machos dominantes/territoriais, no entanto aumentaram os níveis de AVT quando associados à exibição de coloração nupcial com agressividade, indicadores de períodos relacionados com oportunidade social. Os níveis mais elevados de AVT foram encontrados em machos dominantes no período de defesa do território (com exibição de comportamentos agonísticos, Kleszczyńska et al., 2012).

Um estudo recente, que relaciona duas densidades populacionais diferentes de góbios (*Neogobius melanostomus*), verificou os valores mais elevados de AVT e cortisol (níveis cerebrais medidos por HPLC em cérebro total) estão associados a peixes não agressivos mantidos em densidades altas (15 peixes/m²), enquanto os valores mais elevados de IT estão associados a baixas densidades (9 peixes/m²) onde os peixes exibem comportamentos territoriais e agressivos (Sokołowska et al., 2013).

A associação destes neuropéptidos com o comportamento reprodutor é verificado também em invertebrados. Um estudo recente em caracóis demonstrou que um membro da família da OT/AVP, a conopressina, é expressa em neurónios que projetam para o pénis e vaso deferente onde modulam a ejaculação, além de terem sido também descobertos outros neurónios que regulam a postura dos ovos e os comportamentos reprodutores pelas fêmeas (Van Kesteren et al., 1995). Em minhocas, um péptido relacionado, anetocina, mostrou-se envolvido na regulação da postura de ovos e comportamento reprodutor (Satake et al., 1999).

2.2.3- A rede neural do comportamento social “*the social behavior network*”

Paralelamente ao que já se conhecia em mamíferos (Newman, 1999), recentemente Goodson (2005) propôs o conceito de extensão da amígdala (“*extended amygdala*”), com uma única rede neural responsável pelo comportamento social, “*the social brain network*” (SBN), constituída por apenas seis núdulos (*extended medial amygdala*, que inclui a *medial amygdala* e *medial bed nucleus of stria terminalis*; *preotic area*; *anterior hypothalamous*; *lateral septum*; *ventromedial hypothalamous* e *midbrain*). Todos os núdulos incluídos na rede têm sido implicados no controlo do comportamento social, possuem ligação bidirecional entre eles e apresentam recetores hormonais essenciais para a exibição do comportamento. Este conceito mais simplificado baseou-se em estudos efetuados em peixes ósseos e aves. No entanto é um conceito que pode ser aplicado a todos os vertebrados (Goodson, 2005). A presença da SBN foi confirmada ao longo dos vertebrados utilizando *immediate early genes* (IEGs) como marcadores de atividade neural relacionada com a expressão de diversos comportamentos sociais tais como comunicação social, agressão e corte (Goodson, 2005).

Dois dos núdulos da SBN (*lateral septum* e *extended medial amygdala*) são comuns com outro circuito neural, o *mesolimbic reward system* (MRS) (O’Connell e Hofmann, 2011). O

MRS é o circuito neural onde a saliência de um determinado estímulo externo é avaliado (Deco e Rolls, 2005; Wickens et al., 2007). Ambas as regiões, comuns aos dois circuitos, desempenham um papel no comportamento social e no processamento de recompensa, mediando a informação relacionada com a “saliência” e o “social” de um determinado comportamento, como por exemplo a agressão contra um intruso ou um comportamento sexual (O’Connell e Hofmann, 2011).

3- A tilápia moçambicana como modelo de estudo

Oreochromis mossambicus é um ciclídeo com regime alimentar omnívoro, vive preferencialmente em rios e lagos e a sua distribuição estende-se por zonas tropicais e subtropicais. No entanto, devido à sua grande tolerância à salinidade pode encontrar-se em meios estuarinos.

3.1- O comportamento social

A tilápia moçambicana é um incubador bucal materno. Os machos formam densos agregados em águas pouco profundas durante a estação reprodutora. O estabelecimento de territórios com construção de ninhos (Baerends e Baerends-van Roon, 1950; Bruton e Bolt, 1975) permite atrair as fêmeas, que após a corte e conseqüente ovulação recolhem os ovos e o esperma para a boca, onde ocorre a fertilização, deixando posteriormente o agregado de machos (Baerends e Baerends-van Roon, 1950; Neil, 1966). As fêmeas incubam os ovos durante um período de 20-22 dias (Bruton e Bolt, 1975), após o qual os alevins podem encontrar refúgio na cavidade bucal materna durante a noite ou em situações de perigo (Baerends e Baerends-van Roon, 1950).

A manutenção do território depende do resultado das interações agonísticas com machos rivais. Machos vencedores garantem o estatuto de dominantes que lhes proporciona um espaço físico (território com ninho), essencial para a exibição dos comportamentos de corte por parte do macho e desova pelas fêmeas. Machos derrotados adquirem o estatuto de subordinados, sem espaço físico na arena e conseqüente perda do acesso às fêmeas e oportunidade de reprodução, que só será novamente assegurada pelo desafio territorial a machos mais pequenos ou mais fracos, ou ainda, através de uma estratégia de *sneaking* que está descrita como estratégia ocasional para esta espécie (Oliveira e Almada, 1998b).

A comunicação química assume um papel importante na exibição de comportamentos sociais. As primeiras evidências foram documentadas por Frade et al. (2002) que provou que esta espécie tem alta sensibilidade olfativa a água condicionada por machos e fêmeas, tal como para fluidos corporais (bílis, fezes e urina), sendo a urina o estímulo mais forte para as fêmeas. A libertação de urina pelos machos pode tratar-se de um verdadeiro sinal químico com um papel importante por um lado na manutenção da territorialidade (Barata et al., 2008, 2007) e por outro no acesso a fêmeas em condição reprodutora (Almeida et al., 2005; Barata et al., 2008; Miranda et al., 2005).

Os androgénios assumem de igual modo um papel relevante estando correlacionados com certos aspetos do comportamento social (e.g. agressão, corte, coloração nupcial, tamanho do ninho, Oliveira e Almada, 1998a, Oliveira e Canário, 2000) e com caracteres sexuais secundários (e.g. altura das barbatanas e tamanho da papila genital e mandíbula, Oliveira e Almada, 1998a)

3.1.1- O comportamento agonístico em machos

Em cativeiro, uma semana é suficiente para o estabelecimento de hierarquias e territórios (Oliveira and Almada, 1998b). Para a manutenção ou conquista do território, os machos engrenam em interações sociais que podem variar entre simples exibições (*displays*) até comportamentos agonísticos de alta intensidade como os combates. O etograma para esta espécie foi descrito por Baerends e Baerends-van Roon (1950), sendo seguidamente descritos apenas os comportamentos agonísticos que foram considerados em análise nos vários trabalhos apresentados nesta tese:

Exibição lateral e frontal, comportamento dirigido a um oponente em que o macho permanece na maior parte dos casos imóvel na coluna de água com as barbatanas dorsal, anal e ventrais abertas, com batimentos lentos das peitorais e quase sempre associado à dilatação da membrana branquiostegal. Este comportamento pode ser diferenciado em exibição lateral (com exibição dos flancos) ou exibição frontal se macho permanecer em frente ao oponente com uma abertura da boca de grande amplitude associada.

Combate em círculo e combate de bocas, oponentes em posição antiparalela e em exibição lateral, rodam em torno de um ponto central (combate em círculo), geralmente estes

combates são intercalados investidas frente a frente, ocorrendo mordeduras na região da boca, podendo manter-se agarrados pelas mandíbulas (combate de bocas).

Morder, o macho morde o corpo de outro indivíduo. Foram também considerados nesta categoria os casos em que o macho tentou morder, ou seja, dirigiu-se ao oponente em movimento com abertura bucal que indicava uma mordedura, mas o contacto físico só não aconteceu porque oponente se desviou rapidamente. Na maioria dos estudos apresentados nesta dissertação, as interações agonísticas desencadeiam-se com machos instalados em aquários lateralmente justapostos, no entanto este comportamento é bastante claro com o macho a morder o vidro geralmente de forma violenta.

A interação termina geralmente com perseguição (natação dirigida para o conspecífico, normalmente com grande velocidade) do vencedor e fuga (afastamento em natação rápida) ou submissão do derrotado. A postura de submissão foi considerada quando o indivíduo se manteve imóvel na coluna de água, oblíquo em relação ao substrato, com cabeça elevada em relação à cauda e com as barbatanas dorsal e anal recolhidas e caudal fechada: Foram também considerados os casos em que, o peixe com as barbatanas recolhidas permanecia numa posição não oblíqua em contacto com a superfície ou encostado às paredes do aquário.

O estudo da modulação da agressão nesta espécie tem sido diretamente associada ao estatuto social, com machos dominantes com níveis de androgénios circulantes superiores em relação aos machos subordinados. Os vários estudos no âmbito da comunicação química nesta espécie sugerem um papel muito relevante da urina na modulação da agressão. Os machos de tilápia moçambicana aumentam a taxa de libertação de urina na presença de um macho rival, com a particularidade de a libertação ser feita no início das interações, antes de os machos se envolverem em confrontos físicos violentos (e.g. combates, Barata et al., 2007). A urina contém um potente estímulo odorífero e a concentração deste depende do estatuto social do emissor (Barata et al., 2008). Num trabalho recente Keller-Costa et al. (2012) mostra que machos dominantes apresentam bexigas urinárias mais musculadas que subordinados e fêmeas, verificando também que em pares de machos em que foi impedida a libertação de urina (constrição temporária da papila genital) a interação social foi mais violenta, com escalada mais rápida, apresentando-se associada a níveis de androgénios superiores. Além disso, apenas no grupo controlo (libertação normal de urina) se observou uma relação entre o macho que iniciou a interação e a aquisição do estatuto de vencedor. Este resultado sugere que a urina libertada num

contexto macho-macho adverte os machos rivais potenciando possivelmente uma desistência da interação quando o oponente é mais fraco.

A produção de sons também aparece relacionada com o resultado das interações agonísticas, com machos vencedores a apresentarem taxas de produção superiores comparativamente com machos derrotados, sugerindo uma sinalização da experiência recente de vitória, com possibilidade de promover a atração das fêmeas influenciando assim a escolha do parceiro sexual (Amorim e Almada, 2005).

3.1.2- O comportamento reprodutor em machos

Em cativeiro, os machos tendem a sincronizar a ocupação dos territórios e as atividades reprodutoras (Oliveira e Almada, 1998b). Já se observaram diferentes táticas de reprodução: estabelecimento de territórios (machos defendem o território de outros machos rivais e cortejam ativamente as fêmeas), comportamento de *floaters* (machos vivem na coluna de água defendendo o território apenas temporariamente) ou *sneaker* (machos invadem o ninho durante um episódio de desova e tentam fertilizar os ovos) (Oliveira e Almada, 1998b).

Uma vez territorial, o macho corteja a fêmea guiando-a para o ninho para posterior acasalamento. A descrição de comportamento reprodutor é baseado no etograma de referência (Baerends e Baerends-van Roon, 1950):

Escavar ninho, o macho territorial coloca-se numa posição central, oblíquo em relação ao substrato arenoso e escava com a boca uma depressão em forma de bacia.

Coloração nupcial, o corpo do macho (com a exceção da ventral da cabeça e papila genital) passa de uma coloração cinzento pálido (normal) para uma coloração escura podendo atingir na sua plenitude a coloração negra.

Corte, na vizinhança do ninho ou não o macho adota uma posição com a cabeça para baixo e barbatanas ímpares recolhidas, expondo o seu flanco à fêmea.

Nesta espécie os comportamentos anteriores apresentam-se positivamente associados a níveis circulantes de androgénios (Oliveira e Almada, 1998a). Machos que ocupam um lugar privilegiado na arena de reprodução, tendem a apresentar colorações mais conspícuas,

escavam ninhos maiores e cortejam mais frequentemente as fêmeas (Oliveira e Almada, 1998a).

A comunicação química nesta espécie também se mostra essencial para o estabelecimento das interações entre macho e fêmea. Machos territoriais alteram a emissão de pulsos de urina em função do estado fisiológico da fêmea, aumentando a emissão de pulsos de urina na presença de fêmeas pré-ovuladas (Almeida et al., 2005; Barata et al., 2008) o que indica que os machos são capazes de avaliar o estado reprodutor da fêmea e alterar o seu comportamento de acordo com o cenário existente. Esta discriminação é feita através do olfato, já que machos anósmicos não apresentam padrões diferentes de emissão de pulsos de urina na presença de fêmeas em estados reprodutores distintos (Miranda et al., 2005).

Relativamente à comunicação acústica, um estudo de Amorim et al. (2003) relacionou a produção de sons com a exibição de comportamentos de corte. Machos territoriais emitiram sons ao longo de todo o reportório de corte com especial relevância no final, incluindo a fase de desova, o que sugere que a produção de sons nesta espécie poderá ter um papel importante para por um lado sinalizar a sua presença, e por outro sincronizar a libertação de gâmetas (Amorim et al., 2003).

3.2- O Modelo de Estudo

A tilápia moçambicana é um bom modelo de estudo, em primeiro lugar porque para além dos comportamentos sociais complexos, como o estabelecimento de hierarquias sociais e territórios acima descritos, é uma espécie muito resistente e de fácil manuseamento em cativeiro. Esta espécie apresenta um grande valor comercial em aquacultura especialmente quando usada em cruzamentos para obtenção de híbridos mais rentáveis.

Além de ser amplamente usada para estudos de plasticidade social e mecanismos envolvidos, tem sido um modelo de estudo na área do Bem Estar Animal. Foi demonstrada a importância do substrato para esta espécie, por um lado com a exibição de preferência (medida pela % de tempo dispensado em compartimento com substrato, Galhardo et al., 2009), por outro lado com a observação de um comportamento diretamente relacionado com o substrato em regime de privação do mesmo (comportamento em vácuo: e.g. construção do ninho, Galhardo et al., 2008). Um estudo recente realizado por (Galhardo et al., 2011b) com recurso ao paradigma, previsibilidade vs. imprevisibilidade, com condicionamento

positivo e negativo, mostrou que esta espécie é também um bom modelo para estudos relacionados com a percepção de estímulos (*apraisal*). Outro trabalho relevante realizado com este modelo relacionou a familiaridade com a modulação de traços de personalidade (Galhardo et al., 2012).

A sua utilização em diversas áreas em especial na área do Bem Estar Animal é de extrema importância, uma vez que os conhecimentos aí adquiridos são muito valiosos para a programação de desenhos experimentais, de forma a adequar o mais possível as rotinas de manutenção dos indivíduos (biotério) e o ajuste dos paradigmas experimentais às necessidades básicas da espécie, com o objetivo de incrementar o seu bem estar e isolar possíveis efeitos geradores de estresse capazes influenciar a realização das experiências e interpretação dos resultados.

Foi também recentemente otimizado um sistema para medir a motivação, adaptado do paradigma “*push door*” (Galhardo et al., 2011a) e finalmente está disponível um atlas cerebral tridimensional realizado a partir de imagens de ressonância magnética (<http://www.ispa.pt/ui/uie/ibbg/TilapiaBrainAtlas/head.html>).

4- Organização geral da tese e objetivos

Esta tese está organizada em Introdução geral seguida de dois capítulos (II- Modulação social da reprodução; III- Mecanismos neuroendócrinos reguladores do comportamento social) terminando com uma discussão geral e considerações finais. As referências bibliográficas relativas à Introdução geral e Discussão geral encontram-se na secção “Referências bibliográficas” situada no final da dissertação, enquanto as referências bibliográficas dos trabalhos experimentais descritos no capítulo II (artigo 1) e III (artigos 2, 3 e 4) apresentam-se no final de cada trabalho correspondendo à versão publicada, aceite ou submetida para publicação.

O capítulo II centra-se no efeito do contexto social na modulação da reprodução. Foi induzida uma variação no contexto social de forma a alterar a estabilidade social num dos grupos experimentais. Este processo foi efetuado através da substituição de machos dominantes entre replicados. Os objetivos foram desenvolver um paradigma experimental que permitisse gerar instabilidade social; relacionar essa instabilidade com níveis hormonais circulantes (11CT, T e cortisol) e exibição de comportamentos específicos (comportamentos

agonísticos e reprodutores); investigar a existência de padrões de associação entre os vários comportamentos e entre comportamentos e níveis plasmáticos hormonais, em função do contexto social (estável vs. instável).

No capítulo III foram investigados os mecanismos hormonais envolvidos na modulação da reprodução: os androgénios e os neuropéptidos AVT e IT. O primeiro estudo (artigo 2) pretendeu estabelecer a relação entre os androgénios e o comportamento social, seguindo o paradigma da castração. Foram criados 3 grupos experimentais: machos sham, castrados e machos com a bexiga urinária danificada (sem dano infligido nas gónadas, este grupo foi necessário porque a castração completa implicou inevitavelmente a rotura da bexiga). O objetivo da castração foi reduzir drasticamente (ou eliminar) os níveis circulantes de androgénios, avaliando assim o efeito mediador dos androgénios no comportamento agonístico e reprodutor.

A interação entre os neuropéptidos e o comportamento social foi abordado de duas formas distintas, resultando em dois trabalhos científicos. No primeiro trabalho (artigo 3) pretendeu-se relacionar o estatuto social e os níveis de AVT e IT nas várias macroáreas cerebrais (bolbos olfativos, telencéfalo, teto ótico, diencéfalo, cerebelo, rombencéfalo) e pituitária em machos dominantes e subordinados. O segundo trabalho (artigo 4) seguiu um desenho experimental semelhante ao anterior, com a particularidade de neste caso se explorar o “comportamento” das células imuno-reativas à AVT na área pré-ótica, em machos que mudaram o seu estatuto social para macho subordinado/não territorial em comparação com animais que mantiveram o estatuto de dominante/territorial.

II- Modulação Social da Reprodução

Artigo 1: Almeida, O., Eliane Gonçalves-de-Freitas, João S. Lopes & Rui F. Oliveira. Social instability promotes hormone-behavior associated patterns in a cichlid fish. **Artigo aceite para publicação na revista *Hormones and Behavior*.**

1- Influência do contexto social na criação de padrões de associação entre hormonas e comportamento.

Artigo 1:

SOCIAL INSTABILITY PROMOTES HORMONE-BEHAVIOR ASSOCIATED PATTERNS IN A CICHLID FISH

Olinda Almeida^{1*}, Eliane Gonçalves-de-Freitas^{2*} João S. Lopes^{1,3} & Rui F. Oliveira^{1,3}

¹ Unidade de Investigação em Eco-Etologia, ISPA – Instituto Universitário, Rua Jardim do Tabaco, 34, 1149-041 Lisboa, Portugal.

² Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP, and Aquaculture Center of UNESP (CAUNESP). Rua Cristóvão Colombo, 2265, 15054-000, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil.

³ Champalimaud Neuroscience Programme, Instituto Gulbenkian de Ciência, Rua da Quinta Grande, 6, 2780-156 Oeiras, Portugal.

* These authors contributed equally to this work

ABSTRACT

Androgens are known to respond to social challenges and to control the expression of social behavior and reproductive traits, such as gonadal maturation and sperm production,

expression of secondary sex characters and reproductive behaviors. According to the challenge hypothesis variation in androgen levels above a breeding baseline should be explained by the regime of social challenges faced by the individual considering the trade-offs of androgens with other traits (e.g. parental care). One prediction that can be derived from the challenge hypothesis is that androgen levels should increase in response to social instability. Moreover, considering that a tighter association of relevant traits is expected in periods of environmental instability, we also predict that in unstable environments the degree of correlations among different behaviors should increase and hormones and behavior should be associated. These predictions were tested in a polygamous cichlid fish (Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus*) with exclusive maternal care. Social instability was produced by swapping dominant males among groups. Stable treatment consisted in removing and placing back dominant males in the same group, in order to control for handling stress. Cortisol levels were also measured to monitor stress levels involved in the procedure and their relation to the androgen patterns and behavior. As predicted androgen levels increased in males in response to the establishment of a social hierarchy and presence of receptive females. However, there were no further differential increases in androgen levels over the social manipulation phase between social stable and social unstable groups. As predicted behaviors were significantly more correlated among themselves in the unstable than in the stable treatment and an associated hormone-behavior pattern was only observed in the unstable treatment.

Keywords: challenge hypothesis; social stability; androgens; cortisol; cichlids

INTRODUCTION

Hormones play a key role in the physiological adaptation of organisms to their environments. On one hand hormones are physiological integrators that interact with multiple systems and with each other, therefore controlling suites of morphological and behavioral traits. On the other hand, they respond to different environmental cues, hence adjusting phenotypic form and function to predictable (e.g. seasonal) and unpredictable (e.g. stressor) environmental changes (Cohen et al., 2012). Androgens are known to regulate spermatogenesis, the expression of secondary sex characters and reproductive and territorial behavior on one hand, and to respond to predictable changes that signal the breeding season in temperate species, therefore linking the expression of reproductive traits to the appropriate environmental context (Adkins-Regan, 2005). Additionally, androgens also respond to short-term changes in the social environment (e.g. mating opportunity, territorial intrusion; Wingfield et al., 1990; Hirschenhauser and Oliveira, 2006; Goymann, 2009) and these have

been interpreted as a mechanism to fine-tune androgen-dependent traits to acute and transient changes in the environment (Oyegbile and Marler, 2005; Oliveira, 2009). The challenge hypothesis (Wingfield et al., 1990), has been proposed as an explanatory framework for the observed variation in androgen responsiveness to the environment. According to this hypothesis androgens levels rise above a constitutive baseline during the breeding season triggered by environmental cues (e.g. photoperiod), and this breeding baseline is both necessary and sufficient for successful breeding (i.e. spermatogenesis, expression of secondary sex characters and reproductive behavior). Further increases in androgen levels above this breeding baseline would be explained by the degree of social stimulation that males are exposed to, and would not be required for breeding. Given the detrimental effects of androgens on male parental care behavior, this androgen responsiveness to social stimulation would also have a trade-off with paternal care (Wingfield et al., 1990; 2001). Therefore, the challenge hypothesis has predicted that androgen responsiveness to social challenges would vary with mating systems and parental type. Androgen responsiveness should be higher in monogamous (that are expected to face less social challenges) than in polygamous species, and in species with biparental or paternal care than in species with maternal care only (Wingfield et al., 1990). These predictions have been supported by comparative data in different vertebrate taxa (fish: Oliveira et al., 2002; Hirschenhauser et al., 2004; birds: Hirschenhauser et al., 2003; Goymann, 2009). Further hypotheses have been subsequently proposed in an attempt to explain notable cases of lack of androgen modulation by the social environment. For example, the lack of androgen responsiveness in males with short-breeding seasons or single brooded has been interpreted as an adaptation to facilitate a rapid transition from the mating to the parental care phase (Wingfield and Hunt, 2002; Landys et al., 2007; Goymann 2009). Similarly, the exceptions to the predictions derived from the costs of androgens on parental care have been tentatively explained by discriminating species in which male parental care is critical for offspring survival (i.e. essential paternal care hypothesis, Lynn et al., 2002).

Despite the adaptive hypotheses described above for patterns of hormone-behavior association there are many cases in which hormones become dissociated from putatively hormone-dependent traits. For example, aggressiveness and androgen levels may become seasonally dissociated in species that express aggressive behavior outside the breeding season when androgen levels are low (e.g. Dittami and Reyer, 1984; Logan and Wingfield, 1990; Wingfield, 1994; Canoine and Gwinner, 2002; Landys et al., 2010; Apfelbeck et al., 2013). It has also been noted that the strength of the correlations between androgens and behavior seem to be higher at periods of social instability, such as during the establishment of territories or dominance hierarchies, the response to territorial intrusions or the competition

with other males for access to mating opportunities, than during periods of social stability when behavioral output drops to baseline levels (Oliveira et al., 2002 and references therein). This socially-driven temporal variation in the association between hormones and behavior within the same species may reflect the dual role of hormones on phenotypic integration (i.e. when multiple functionally-related traits are correlated with each other) and independence (i.e. when multiple functionally-related traits are independent of each other; McGlothlin and Ketterson, 2008; Ketterson et al., 2009). As described above for androgens, the co-regulation of different traits by the same hormone gives rise to correlations among traits, which become linked in their response to the environment hence promoting phenotypic integration. However, in certain conditions the independent response of some of the correlated traits could be advantageous (e.g. need to express androgen-dependent aggression outside the breeding season). Therefore, it would be adaptive if the pleiotropic effects of hormones could vary between different life-history stages, or even within the same life-history stage depending on the regime of environmental challenge, in order to offer the best compromise given the environmental demands faced by the organism. Indeed, heterogeneous environments have been shown to favor plasticity in the correlation structures among phenotypic traits, and patterns of integration may vary across environments (Schlichting, 1989; Earley et al., 2012). Therefore, we predict that plasticity in hormone-driven phenotypic integration should vary with social stability, such that unstable social environments characterized by a high rate of social challenges that require a tighter phenotypic integration would promote associated hormone-behavior patterns, whereas in stable social environments (with low rates of social challenges) where phenotypic integration can be relaxed hormone-behavior patterns can become dissociated.

Here we tested this hypothesis in a lek-breeding African cichlid fish (Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus*). In this species males establish territories in breeding aggregations to which they attract females to spawn with, and parental care is exclusively provided by the females (Baerends and Baerends-van Roon, 1950). Territorial males adopt a dark nuptial coloration which may vary in intensity and that can be turned on and off within minutes. Androgen responsiveness to social challenges has been previously reported in this species (Oliveira et al., 1996) and its magnitude in comparison to that observed in other cichlid species with different mating systems and parental care types matched the predictions of the challenge hypothesis (Hirschenhauser et al., 2004). After the establishment of mixed-sex breeding groups social manipulations created either unstable or stable social environments. For social instability dominant males were swapped among groups. For social stability the dominant male of each group was removed and placed back in its own group, in order to control for handling stress. It was predicted that group formation would trigger an

androgen response and that hormone and behavior would become correlated. After the social manipulations it was predicted that the unstable treatment would promote hormone-behavior associated patterns, whereas the stable treatment would promote a dissociated hormone-behavior pattern. Apart from the males that were part of the social groups, bystander males that were visually exposed to the social groups but prevented from engaging in social interactions were also tested, in order to assess if the mere perception of social context is enough to promote the predicted responses.

METHODS

Animals and housing

Adult Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) from a stock held at ISPA - Instituto Universitário (Lisbon, Portugal) was used. Stock fish were kept in mixed-sex groups (3-4 males to 4-5 females per tank) in glass tanks (120 x 40 x 50 cm), with fine gravel substrate, a double filtering system (both sand and external biofilter, Eheim) and constant aeration. Water quality was monitored once a week for nitrites (0.2-0.5 ppm), ammonia (<0.5 ppm) (Pallintest kit®) and pH (6.0-6.2). Water temperature was kept at 26 ± 2 °C and photoperiod was 12L:12D. Fish were fed ad libitum daily with commercial cichlid floating and sinking sticks.

Experimental procedures

Mixed-sex groups (2 males + 2 females) and 1 bystander male were tested in social stable or unstable social environments. Fish were observed in aquaria with two compartments, a larger one (40cmX75cmX50cm) to receive males and females, and a smaller one (40cmX25cmX50cm) to house the bystander male (Fig.1A). The two compartments were divided by a one-way mirror, which allowed the bystander to observe the social group without being seen by them, and the water to circulate between the two compartments. To improve the unidirectional properties of the one-way mirror a light bulb was placed on top of the group compartment, and direct illumination of the bystander's compartment was prevented by using a black opaque plastic around it (except in the frontal wall of the tank to allow observing the fish), so that the bystander's compartment was illuminated through the unidirectional glass. The one-way mirror formed a mirror image for fish in the group compartment with which they could interact. In fact, in the first day dominant males interacted aggressively with their mirror image in the one-way-mirror. However, they subsequently habituated to the mirror and such

interactions were greatly reduced in the following days, when males occasionally approached the one-way mirror without displaying any aggressive behavior.

The experimental procedure consisted of the following 4 phases (Fig. 1B):

Phase 1: Social isolation - Forty five males were isolated in 40 L aquaria for 7 days to dilute previous social experience.

Phase 2: Group formation - Afterwards, two size-matched males [mean \pm standard deviation (SD) of standard length (SL); difference between dominant and subordinate = 0.38 ± 0.26 cm; stable group: SL = 12.88 ± 2.44 cm, coefficient of variation (CV) = 18.96 %; unstable group SL = 12.49 ± 4.77 cm; CV = 38.17 %) were placed at the same time in the group compartment of the set-up where two females (SL: 11.8 ± 1.19 cm) had been previously introduced. At this time a bystander male was also placed in the small compartment (stable group bystander SL = 15.00 ± 1.86 cm; unstable group bystander SL = 14.13 ± 1.18 cm). Fish remained in these conditions for 7 days to allow for the establishment of male territories and dominance relationships (n = 15 replicates).

Phase 3: Social manipulations - After this group formation period, groups were manipulated according to two different treatments: (1) a social instability treatment (n = 8 replicates), where dominant males (1 per group) were swapped between groups for 5 consecutive days; and (2) a social stability treatment (n = 7 replicates), where group composition remained the same, but dominant males were removed and placed back on their own groups to control for handling stress (Fig. 1A).

Phase 4: Territorial intrusion – The day after the end of the social manipulations phase a small glass container (18cm x 30 cm x 15 cm) was placed inside the group compartment of the experimental aquarium, and the next day a naïve male was placed inside the container to mimic a territorial intrusion.

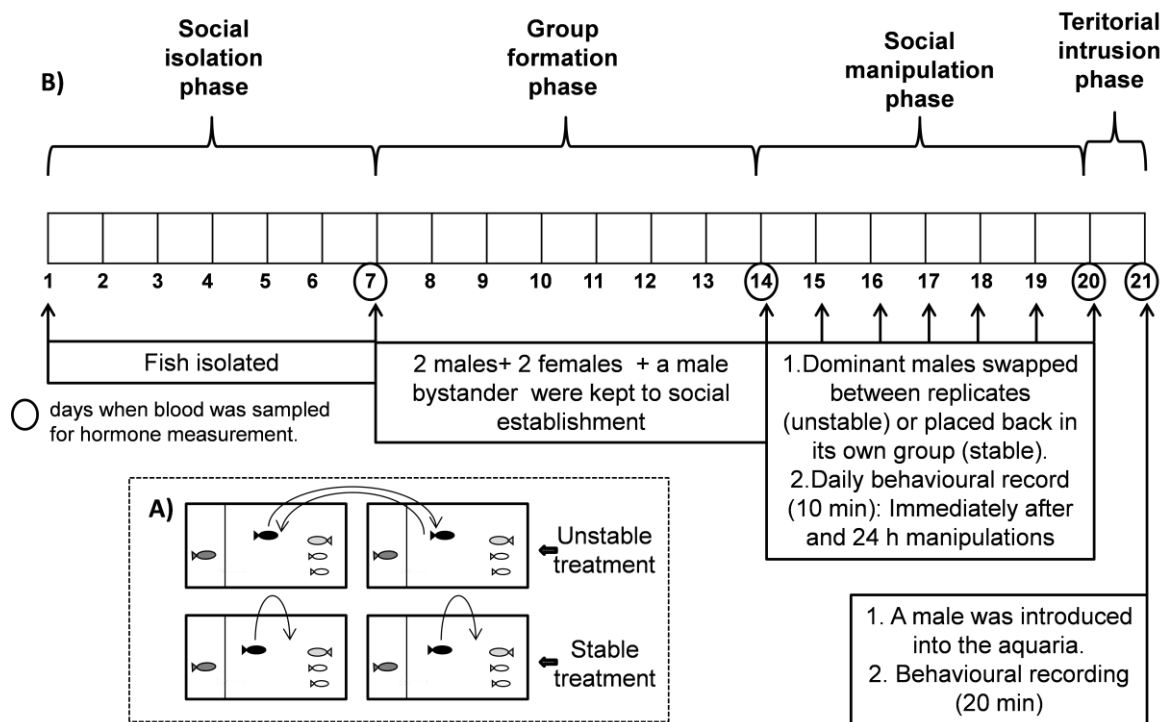


Fig. 1. Schematic representation of the experimental aquaria (A), with the compartments for the bystander (dark gray fish) and for the social group: dominant male (black fish), subordinate male (light gray fish) and females (white fish), and sequence of the procedures during the experimental protocol (B), in which the timing of blood sampling and behavioral recording is indicated.

Behavior sampling

The ethogram of *O. mossambicus* provided by (Baerends and Baerends-van Roon, 1950) was used to identify the relevant behavioral patterns. Aggressive behavior (attack, fighting, chasing, lateral and frontal displays) and courtship were recorded, using a behavioral sampling with continuous recording method (Martin and Bateson, 2007), at the following sampling points:

- 1) Group formation phase - Daily behavioral observations of 10 min per group;
- 2) Social manipulation phase - Two daily behavioral observations of 10 min each per group were performed immediately after (IA) and 24 h after (24h) swapping the dominant fish;
- 3) Territorial intrusion phase – behavioral observation of 20 min immediately after the introduction of the intruder male in the experimental tank.

The frequency of dominant and subordinate male aggressive behavior towards the other male and the females in the group formation and social manipulation phases, and towards

the intruder in the territorial intrusion phase was estimated by summing up all the occurrences of the different aggressive behavior patterns in the observation period.

Nuptial colouration and bower-digging were also recorded using a scan sampling with instantaneous sampling recording method (Martin and Bateson 2007). Behavioral observations of 10 min with a sample interval of 10 s were performed in parallel with the behavioral sampling for aggressive behavior described above and for the same sampling points, except for the territorial intrusion phase. Nest presence was also annotated after each behavioral observation. All dominant and bystander males had built a bower by the end of the group formation phase.

A computer-based multi-event recorder (The Observer v. 5, Noldus) was used for behavioral quantification.

Blood sampling and steroids radioimmunoassay

Blood samples were collected from dominant, subordinate and bystander fish after each phase of the experiment (i.e. social isolation, group formation, social manipulation and territorial intrusion, Fig. 1B). Fish were quickly anaesthetised (MS-222, Pharmaq; 300-400 ppm) and blood was collected from the caudal vein using 1 ml syringes with 25G/16 mm needles. Blood sampling always took less than 4 min since the start of the procedure, thus preventing possible effects of handling on cortisol levels (Foo and Lam, 1993). Blood was centrifuged (at 600g for 10 min) and the obtained plasma stored at -20 ° C.

Testosterone (T), 11-keto-testosterone (KT) and cortisol were extracted from plasma by adding diethyl-ether to the samples, centrifuging the mix (800 g for 10 min at 4°C) and subsequently freezing it (10 min, -80°C) in order to separate the ether fraction (containing the steroids) from the aqueous one, which was subsequently evaporated (speed vac, Savant instruments). The extracted steroids were re-suspended in phosphate buffer.

Steroid concentrations were measured by radioimmunoassay, using commercially available antibodies and marked hormones for cortisol (Rabbit anti-cortisol cortisol-32, ref. 20-CR50, Interchim, Fitzgerald; 1,2,6,7-3H Cortisol, Amersham Biosciences, ref. TRK407-250uCi) and T (Rabbit anti-testosterone, Research Diagnostics Inc, ref. WLI-T3003; 1,2,6,7-3H Testosterone, Amersham Biosciences, ref. TRK402-250mCi), and a custom made antibody for KT kindly donated by D. E. Kime (specificity table for this antibody has been published in Kime and Manning, 1982) and tritiated KT produced in-house from marked cortisol (see ref. above). Inter- and intra-assay variability were respectively: 23% and 5.2% for cortisol; 14.4%

and 4.0% for T; and 13.3% and 4.8% for KT. Samples from different treatments were distributed across different batches to avoid assay biases.

Data analysis

Parametric assumptions were checked by using the Shapiro-Wilk and the Jarque-Bera adjusted multiplier to test for normality and both Levene and Bartlett tests to check for the homogeneity of variances. When needed data were transformed (see below) in order to meet the parametric criteria.

The effects of social manipulation (unstable vs. stable) on behavioral variables was assessed using either ANOVA or linear mixed models, depending on the nature of the variables (i.e. repeated vs. non-repeated measures), and taking also in consideration the social status of the individuals.

The effects of social manipulation (unstable vs. stable) and social status (dominant vs. subordinate) on aggressive behavior were tested using a linear mixed model analysis. The average of the frequency of aggressive behavior directed by dominant and subordinate males towards the other male or towards females at each sampling point [i.e. immediately after (IA) and 24h after the manipulation] across the 5 days of the social manipulation phase was computed for each treatment (i.e. stable and unstable) and used as dependent variable (random effect: aggressive behavior IA vs. aggressive behavior at 24h). Data were square root transformed to fit parametric analysis. Contrast effects tests were used to test for the following planned comparisons that were established a priori: (1) overall (i.e. dominants and subordinates pooled together) temporal variation (IA vs. 24h) for each treatment (stable, unstable); (2) temporal variation within each social status: IA vs. 24h for dominant and for subordinate for each treatment (stable, unstable); (3) contrast between treatments (stable vs. unstable) within each social status (dominant, subordinate) at each sampling point (IA, 24h). Aggressive behavior directed towards the intruder by both dominant and subordinate males of the two treatments was compared using a two-way ANOVA type II sum of squares (categorical variables: treatment and social status) followed by the same planned comparisons to contrast dominant and subordinate males within the same treatment and dominant and subordinate males between the two treatments. Data were log transformed to fit the parametric assumptions. The effects of treatment (stable vs. unstable) and social status (dominant vs. subordinate vs. bystander) on courtship behavior and bower-digging were assessed using a two-way ANOVA type II sum of squares. In order to meet the parametric assumptions the proportion of time spent bower-digging was arcsin transformed,

and the frequency of courtship was log transformed. The data for nuptial colouration did not pass the homogeneity of variances tests and therefore a logistic model was used. Contrast effects tests were also performed for the following a priori planned comparisons: (1) contrast between treatments (stable vs. unstable) within each social status (dominant, subordinate, bystander); (2) effect of social status (dominant vs. subordinate vs. bystander) within each treatment (stable, unstable).

The effects of group formation, social manipulation and territorial intrusion on hormone levels were assessed using linear mixed model analyses. Cortisol data were square root transformed to fit the parametric assumptions. To test for the effect of group formation on hormone levels we considered social status (dominant vs. subordinate vs. bystander) as a categorical variable and hormone level at the end of group formation (d14) and the level at the end of social isolation (d7) as a random effect. Contrast effects tests were used to test for temporal variation within each social status (d7 vs. d14 for each social status), and to contrast between social statuses (dominant vs. subordinate vs. bystander) at each sampling point (d7, d14). To test for the effects of social manipulation and of territorial intrusion a single linear mixed model analysis was used in which social status (dominant vs. subordinate vs. bystander) and social manipulation (stable vs. unstable treatment) were used as categorical variables and the hormone levels at the end of group formation (d14), at the end of the social manipulation period (d20), and at the end of the territorial intrusion phase (d21) were used as a random effect. In this model the effect of social manipulation was assessed by comparing pre- (d14) with post-manipulation (d20) hormone levels for each treatment (stable, unstable). Similarly the effect of territorial intrusion was assessed by comparing pre- (d20) with post-intrusion (d21) hormone levels for each treatment (stable, unstable). The specific effect of the social manipulation on individuals of different social status was also assessed by using the same planned comparisons as above for each status (dominant, subordinate, bystander). Finally, the effect of social status for each of these two phases (social manipulation and territorial intrusion) was also assessed using planned comparisons (dominant vs. subordinate vs. bystander) for each sampling point (d14, d20, d21) within each treatment (stable, unstable).

Person correlations were computed to test for hormone-behavior associations in the group formation, the social manipulation, and the territorial intrusion phases of the experiment. To control for multiple comparisons a false discovery rate adjustment following the Benjamini–Hochberg procedure was used. For each treatment phase correlations were computed between the observed behavior in that phase and the hormone levels before and after (i.e. d7 and d14 for group formation; d14 and d20 for social manipulation; and d20 and d21 for

territorial intrusion). This temporal cross-correlation approach (i.e. before vs. after) may allow to infer the most parsimonious relationship between the two variables. For example, if hormone levels before the behavioral interaction (at t1) are correlated with subsequent behavior (at t2), and there are no correlations between behavior observed during the interaction and subsequent hormones levels (at t3) the most parsimonious explanation is that hormone levels at t1 are driving behavior (at t2). If in contrast hormone levels at t1 are not correlated with behavior at t2, but behavior at t2 is correlated with hormone levels at t3, then the most parsimonious explanation is that behavior during the interaction is leading after-match hormone levels (at t3). The same data transformations used for the ANOVA/ linear mixed models described above were also used to compute the correlations, except for the variable “nuptial colouration” for which an arcsin transformation was used here, whereas raw data were used in the logistic model. The proportion of significant correlations was compared between treatments using the test for differences between proportions.

Sample sizes varied either due to technical problems (e.g. one fish remained motionless for the whole observation during the territorial intrusion, and video camera showed a technical problem during another) or to outlier values (considered as mean \pm 3*standard deviation) which removed from all the statistical analyses. All statistical tests were performed on R (R, 2008), using the following packages: Hmisc (correlations), car (ANOVA type II SS), fbasics (Jarque-Bera test), nlme (linear mixed models), multcomp (multiple comparisons). All tests were two-tailed and significance level used was $P < 0.05$.

Ethical note

The experimental procedures used in the studies presented here were in compliance with the regulations on animal experimentation in Portugal and were approved by a permit (Ref. 0420/2007) from The Portuguese Veterinary Authorities (Direcção Geral de Veterinária, Portugal).

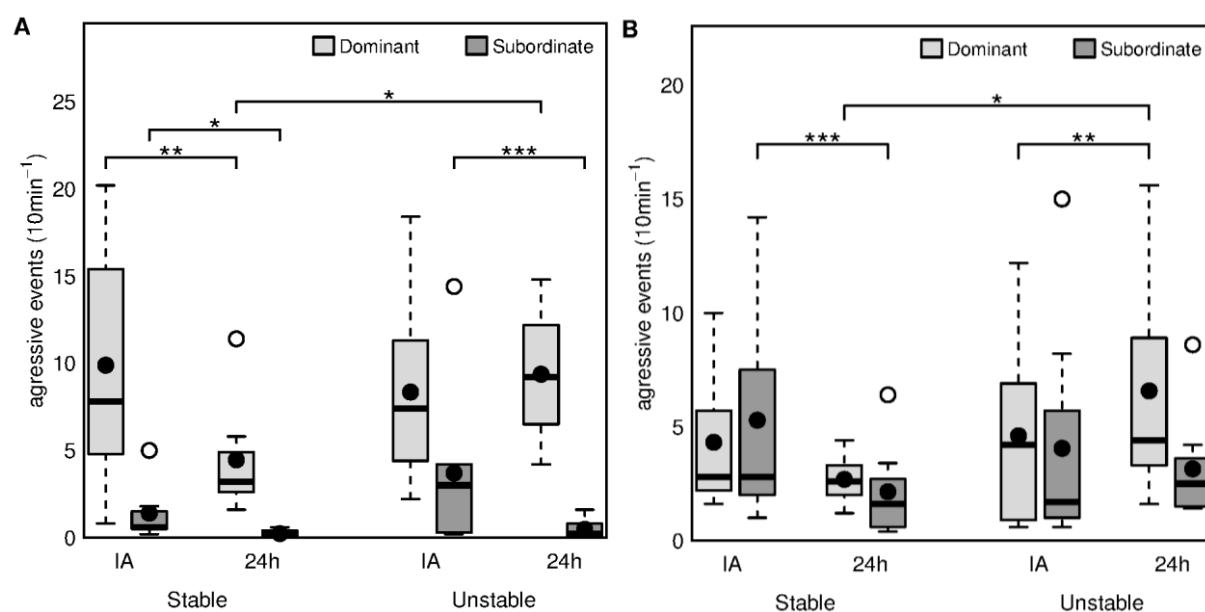
RESULTS

Effect of social manipulation on behavioral variables

Effect of social manipulation on aggressive behavior

The effects of social manipulation (stable vs. unstable) on aggressive behavior were assessed by comparing the behavior expressed immediately after and 24h after the

manipulation, using a linear mixed model, followed by planned comparisons, that also took into consideration the social status of the animals (dominant vs. subordinate). There were significant effects of social status (dominant vs. subordinate male) and of observation period (IA vs. 24h), but not of treatment (stable vs. unstable) on male-male aggressive behavior (Table I, Fig. 2A). Twenty four hours after the manipulation (24h), there was a significant reduction of aggressive behavior in stable groups (planned comparison, dominant + subordinate IA vs. dominant vs. subordinate 24h: z -value = -2.831, $p < 0.01$; Fig. 2A) but not in unstable groups (planned comparison, dominant + subordinate IA vs. dominant vs. subordinate 24h: z -value = -1.509, $p = 0.13$; Fig. 2A). There was a significant decrease in male-male aggression for both dominant and subordinate males between IA and 24h in the stable treatment (planned comparisons: dominant: z -value = -2.635, $p < 0.01$; subordinate: z -value = -2.013, $p < 0.05$; Fig. 2A), whereas in the unstable treatment male aggressive behavior was maintained between IA and 24h in dominants (planned comparison: z -value = 0.913, $p = 0.36$; Fig. 2A) but decreased in subordinates (planned comparison: z -value = -3.318, $p < 0.001$; Fig. 2A). Planned comparisons of male-male aggression between the two treatments for each social status at each sampling point only revealed a significant difference for dominant males at 24h (stable vs. unstable: dominant, IA, z -value = -0.378, $p = 0.71$; subordinate, IA, z -value = 1.417, $p = 0.16$; dominant, 24h, z -value = 2.568, $p < 0.05$; subordinate, 24h, z -value = 0.482, $p = 0.63$; Fig. 2A).



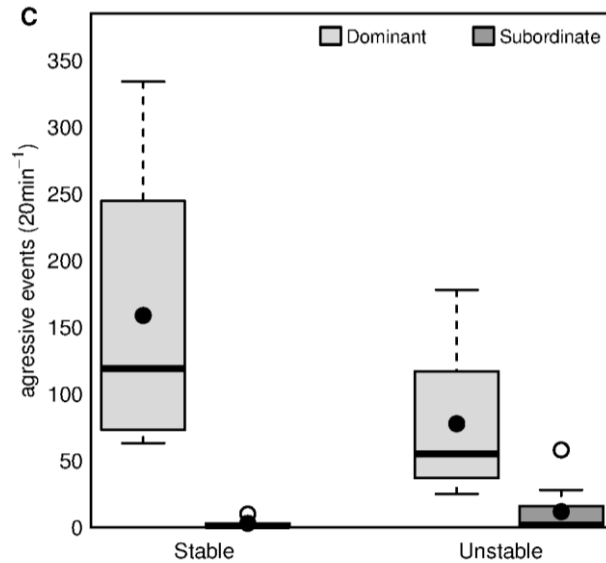


Fig. 2. Effect of social manipulation on aggressive behavior: (A) male-male agonistic interactions; (B) male-female agonistic interactions; (C) dominant male – intruder male interactions. In A and B, the effects of treatment (stable and unstable), social status (dominant and subordinate) and observation period (immediately after, IA vs. 24h after) were tested using a linear mixed model. In C, the effects of treatment (stable and unstable) and social status (Dominant and Subordinate) were tested using a two-way ANOVA Type II SS. Significant relevant *a priori* planned comparisons are presented. Asterisks indicate significant differences (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; and ***, $p < 0.001$) between treatments (stable vs. unstable) and between observation periods (IA vs. 24h) for each male type. A standard boxplot is presented with a dark dot representing the mean value.

There were no main effects of any of the independent variables (treatment: stable vs. unstable; social status: dominant vs. subordinate male; observation period: IA vs. 24h) on male-female aggressive behavior (Table I; Fig. 2B). However, there were also significant interactions for male-female aggressive behavior between observation period and treatment and between observation period and social status (Table I). Similarly to what was described above for male-male aggression a reduction in male-female aggression was also observed 24h after the manipulation in stable (planned comparison, dominant + subordinate IA vs. dominant vs. subordinate 24h: z -value = -3.346, $p < 0.001$; Fig. 2B) but not in unstable groups (planned comparison, dominant + subordinate IA vs. dominant vs. subordinate 24h: z -value = 1.646, $p = 0.10$; Fig. 2B). The frequency of aggressive behavior towards females was not significantly different across observation periods for dominants in the stable treatment (planned comparison: z -value = -1.728, $p = 0.08$, Fig. 2B), whereas in the unstable treatment, the frequency of dominant male aggressive behavior directed towards females increased from IA to 24 h (planned comparison: z -value = 3.098, $p < 0.01$, Fig. 2B). Therefore, the frequency of male-female aggressive behavior in dominant males was significantly higher in the unstable than in the stable treatment at 24 h (planned comparison: z -value = 2.325, $p < 0.05$, Fig. 2B), but not at IA (planned comparison: z -value = -0.100, $p =$

0.92, Fig. 2B). Subordinate male aggressive behavior directed towards females in the stable treatment was higher at IA than at 24 h (planned comparison: z -value = -3.680, $p < 0.001$, Fig. 2B), but not in the unstable treatment (planned comparison: z -value = -0.237, $p = 0.81$, Fig. 2B). Furthermore, there were no significant differences in subordinate male aggression directed towards females between the stable and the unstable treatments at each sampling point (planned comparisons: IA; z -value = -0.878, $p = 0.38$; 24h: z -value = 0.893, $p = 0.37$, Fig. 2B).

There was a main effect of social status in the aggressive response towards intruders (dominants > subordinates, Table I, Fig. 2C). However, there were no significant effects either of treatment (Table I, Fig. 2C) or of the interaction between social status and treatment on the aggression directed towards the intruder (Table I).

Effect of social manipulation on reproductive behaviours

The effects of social manipulation (stable vs. unstable) on reproductive behaviors were assessed by comparing the behaviors expressed 24h after the social manipulation, using either ANOVA or logistic models depending on the nature of the variables. Social status of the animals was also considered in the analyses. There were main effects of treatment and of social status (Table I, Fig. 3A) on the percentage of time that males exhibited the body nuptial coloration, whereas the interaction between treatment and social status was not significant (Table I). Time spent exhibiting the nuptial coloration was higher in the unstable than in the stable treatment for dominant males (planned comparison: z - value = -1.973, $p < 0.05$), whereas no differences were found either for subordinates (planned comparison: z - value = -0.275, $p = 0.78$) or for bystander males (planned comparison: z - value = 1.732, $p = 0.08$) (Fig. 3A). In stable groups the amount of time exhibiting the nuptial coloration was significantly higher in dominant than in either subordinate (planned comparison: z - value = -2.884, $p < 0.01$) or bystander (planned comparison: z - value = -2.840, $p < 0.01$) males, with no significant differences between the latter two male types (planned comparison: z - value = 1.654, $p = 0.10$) (Fig. 3A). In unstable groups differences in time exhibiting the nuptial coloration were significant across all male types (planned comparisons: dominant vs. subordinate: z - value = -3.158, $p < 0.01$; dominant vs. bystander: z - value = -3.218, $p < 0.01$; subordinate vs. bystander: z - value = 2.188, $p < 0.05$) (Fig. 3A).

All dominants and bystander males dug a bower during the baseline period and continued to express bower-digging behavior during the manipulation phase (i.e. stable vs. unstable treatments). Subordinate males did not express this behavior and were removed from the statistical analysis. The percentage of time spent bower digging did not differ either with

treatment or with social status (Table I, Fig. 3B). Furthermore, the interaction between treatment and social status was also not significant (Table I).

Treatment did not affect the frequency of courtship behavior but there was a significant effect of social status (Table I, Fig. 3C) due to the fact that subordinates very rarely expressed courtship (Fig. 3C). The interaction between treatment and social status was not significant (Table I).

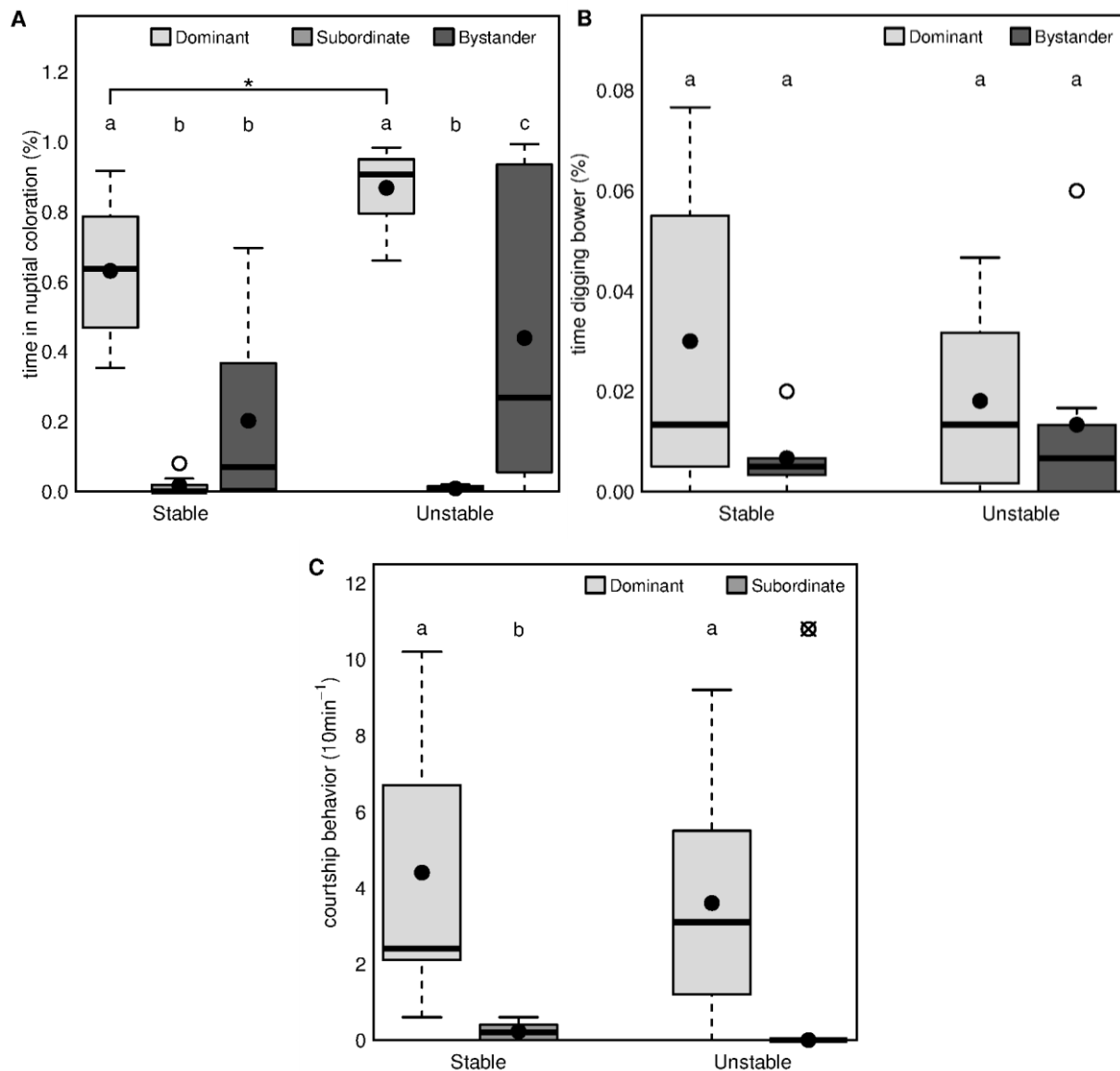


Fig 3. Effect of social manipulation on male reproductive behavior: (A) time spent (%) with nuptial coloration; (B) time spent (%) digging a nest; and (C) frequency of courtship. In A, the effects of treatment (stable and unstable) and social status (dominant, subordinate and bystander) were tested using a logistic model. In B, the effects of treatment (stable and unstable) and social status (dominant and bystander) were tested using a two-way ANOVA Type II SS. In C, the effects of treatment (stable and unstable) and social status (dominant and subordinate) were tested using a two-way ANOVA Type II SS. Significant relevant *a priori* planned comparisons are presented. Asterisks indicate significant differences (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; and ***, $p < 0.001$) between treatments (stable vs. unstable) for each male type, letters indicate significant difference between male types within each setting ($p < 0.05$). A standard boxplot is presented with a dark dot representing the mean value. Note that, in C, no variation was found in subordinates in stable treatment.

Table I. ANOVA analyses for male aggressive and reproductive behaviors in the Social Manipulation and Territorial Intrusion phases using as categorical variables (in this order): period of observation (immediately after and 24h after the social manipulation; only in aggression towards males and females); treatment (Stable and Unstable); and Social Status (Dominant, Subordinate and Bystander). Main effects and interaction are from either a linear mixed model, a two-way ANOVA type II SS and a logistic model as appropriate. Results from planned comparisons are also presented.

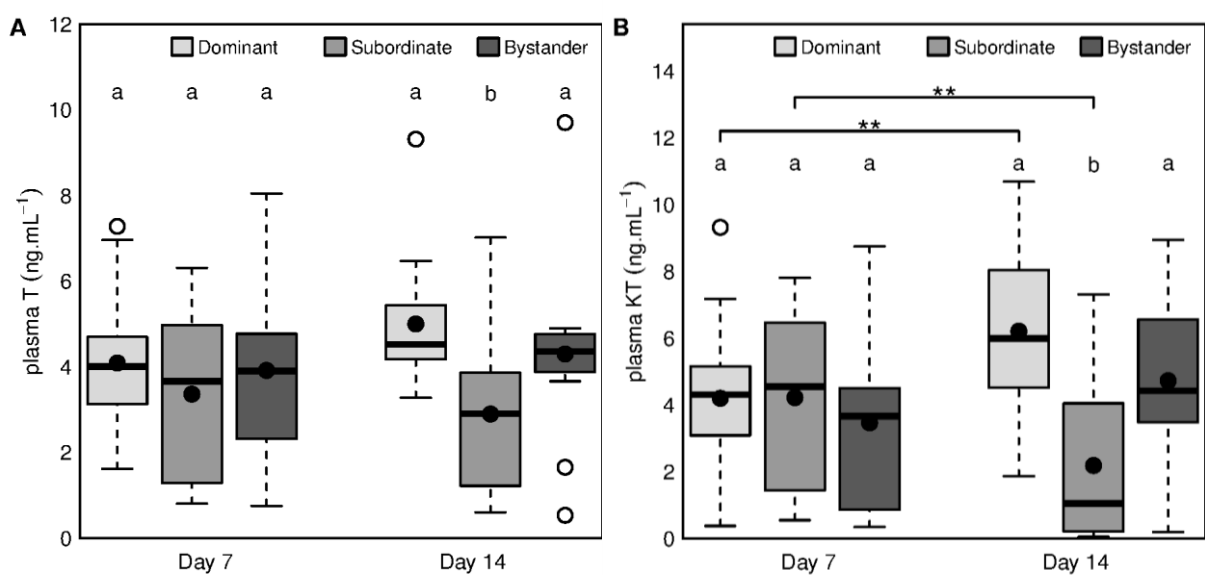
	Agressive Behavior						Reproductive Behavior					
	male-male		male-female		male-intruder		coloration		digging ¹		courtship	
	F	p-value	F	p-value	F	p-value	Chi-sq	p-value	F	p-value	F	p-value
Period	11,86	0,002	1,40	0,247	--	--	--	--	--	--	--	--
Treatment	2,32	0,140	0,51	0,481	0,09	0,770	3,94	0,047	0,18	0,675	3,44	0,075
Status	51,97	<0,001	1,08	0,308	45,54	<0,001	81,30	<0,001	2,10	0,161	65,17	<0,001
Period*Treatment	1,15	0,294	14,54	<0,001	--	--	--	--	--	--	--	--
Period*Status	2,89	0,102	6,25	0,019	--	--	--	--	--	--	--	--
Treatment*Status	0,01	0,910	0,61	0,443	0,92	0,348	0,63	0,731	0,46	0,502	0,47	0,500
Period*Treatment*Status	4,81	0,038	0,40	0,531	--	--	--	--	--	--	--	--
Planned comparisons I (Period*Treatment)												
	z-value		p-value		z-value		p-value		z-value		p-value	
St: 24h-IA	-2,83	0,005	-3,35	<0,001	--	--	--	--	--	--	--	--
Un: 24h-IA	-1,51	0,131	1,65	0,100	--	--	--	--	--	--	--	--
Planned comparisons II (Period*Treatment*Time)												
	z-value		p-value		z-value		p-value		z-value		p-value	
St; D: 24h-IA	-2,64	0,008	-1,73	0,084	--	--	--	--	--	--	--	--
St; S: 24h-IA	-2,01	0,044	-3,68	<0,001	--	--	--	--	--	--	--	--
Un; D: 24h-IA	0,91	0,361	3,10	0,002	--	--	--	--	--	--	--	--
Un; S: 24h-IA	-3,32	0,001	-0,24	0,813	--	--	--	--	--	--	--	--
IA; D: Un-St	-0,38	0,705	-0,10	0,920	--	--	--	--	--	--	--	--
IA; S: Un-St	1,42	0,156	-0,88	0,380	--	--	--	--	--	--	--	--
24h; D: Un-St	2,57	0,010	2,33	0,020	--	--	--	--	--	--	--	--
24h; S: Un-St	0,48	0,630	0,89	0,372	--	--	--	--	--	--	--	--
Planned comparisons III (Status*Treatment)												
	t-value		p-value		z-value		p-value		t-value		p-value	
D: Un-St	--	--	--	--	-0,91	0,376	1,97	0,049	-0,72	0,474	-0,83	0,4157
S: Un-St	--	--	--	--	0,44	0,666	-0,28	0,783	--	--	-1,80	0,0843
B: Un-St	--	--	--	--	--	--	1,73	0,083	0,23	0,820	--	--
St: S-D	--	--	--	--	--	--	-2,88	0,004	--	--	-5,02	<0,001
St: B-D	--	--	--	--	--	--	-2,84	0,005	-1,43	0,152	--	--
St: B-S	--	--	--	--	--	--	1,65	0,098	--	--	--	--
Un: S-D	--	--	--	--	--	--	-3,16	0,002	--	--	-6,36	<0,001
Un: B-D	--	--	--	--	--	--	-3,22	0,001	-0,60	0,549	--	--
Un: B-S	--	--	--	--	--	--	2,19	0,029	--	--	--	--

Abbreviations: Period, period of observation; Status, Social Status; male-male, male aggressiveness towards males; male-female, male aggressiveness towards females; male-intruder, male aggressiveness towards intruders; coloration, percentage of time males presented nuptial coloration; digging, percentage of time males spent digging nests; courtship, male courtship towards females; St, Stable Treatment; Un, Unstable Treatment; 24h, observation 24 hours after social manipulation; IA, observation immediately after social manipulation; D, Dominant Status; S, Subordinate Status; B, Bystander Status. ¹ – Subordinates did not dig a nest. ² – Bystanders did not court females.

Effect of social manipulations on hormonal variables

Effects of group formation on steroid hormone levels

The effects of initial group formation on steroid hormones (T, KT, cortisol) were assessed by comparing the hormone levels before (d7) and after (d14) group formation, using a linear mixed model, followed by planned comparisons, that also took into consideration the social status of the animals. There was a main effect of social status (dominant vs. subordinate vs. bystander) on T and KT but not on cortisol levels (Table II), whereas sampling period (d7 vs. d14) was not significant for any of the steroids measured. There was a significant interaction between social status and sampling period for KT but not for the other two steroids (Table II). Planned comparisons showed no significant differences between males of different social statuses for any of the measured steroids before group formation (d7). In contrast, after group formation dominants had similar androgen levels (T and KT) to those of bystanders, and both had significantly higher androgen levels than those of subordinates (Table II, Fig. 4). After group formation cortisol levels were lower in bystanders than in either dominants or subordinates (Table II, Fig. 4). Planned comparisons for sampling time (d7 vs. d14) showed a significant increase in KT in dominant males and a significant decrease in KT in subordinates following group formation (Table II, Fig. 4). Similarly there was a significant decrease in cortisol with group formation (d7 vs. d14) in bystanders (Table II, Fig. 4). All other planned comparisons for sampling period were non-significant (Table II, Fig. 4).



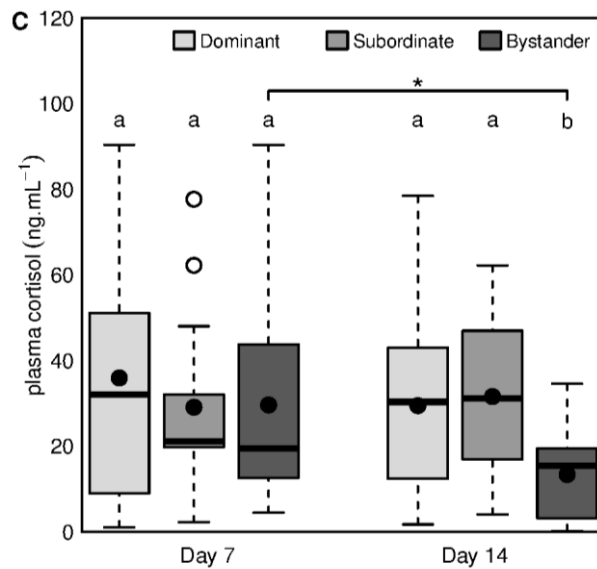


Fig. 4. Effect of group formation on hormonal levels: (A) testosterone; (B) keto-testosterone; and (C) cortisol. In A, B and C the effects of social status (dominant, subordinate and bystander) and sampling time (day 7 and day 14) were tested using a linear mixed model. Significant relevant *a priori* planned comparisons are presented. Asterisks indicate significant differences (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; and ***, $p < 0.001$) between sampling times (day 7 vs. day 14) for each male type, letters indicate significant difference between male types within each setting ($p < 0.05$). A standard boxplot is presented with a dark dot representing the mean value.

Table II. ANOVA analyses for hormonal level in the Group Formation phase using as categorical variables (in this order): sampling time (before, day 7, and after, day 14, the Group Formation phase); and Social Status (Dominant, Subordinate and Bystander). Main effects and interaction are from a linear mixed model. Results from planned comparisons are also presented.

	T		11KT		cortisol	
	F	p-value	F	p-value	F	p-value
Time	0,48	0,492	0,69	0,412	1,91	0,175
Status	3,27	0,048	3,54	0,038	2,03	0,145
Time*Status	1,45	0,247	7,89	0,001	2,04	0,144
Planned comparisons						
	z-value	p-value	z-value	p-value	z-value	p-value
D: 14-7	1,59	0,112	2,67	0,008	-0,53	0,594
S: 14-7	-0,93	0,352	-2,79	0,005	0,49	0,625
B: 14-7	0,63	0,527	1,73	0,084	-2,45	0,014
7: S-D	-0,90	0,369	0,06	0,951	-0,49	0,628
7: B-D	-0,26	0,798	-0,82	0,410	-0,48	0,629
7: B-S	0,64	0,522	-0,86	0,390	0,01	0,991
14: S-D	-3,14	0,002	-4,43	<0,001	0,46	0,647
14: B-D	-1,01	0,310	-1,55	0,121	-2,29	0,022
14: B-S	2,04	0,042	2,85	0,004	-2,70	0,007

Abbreviations: T, testosterone level; 11KT, keto-testosterone level; cortisol, cortisol level; Time, sampling time; Status, Social Status; D, Dominant Status; S, Subordinate Status; B, Bystander Status; 7, sampling at day 7; 14, sampling at day 14.

Effects of social manipulation on steroid hormone levels

The effects of social manipulation (stable vs. unstable) on steroid hormones (T, KT, cortisol) were assessed by comparing the hormone levels before and after the manipulation, using a linear mixed model, followed by planned comparisons, that also took into consideration the social status of the animals. During the social manipulation and territorial phases there was a main effect of social status on KT and cortisol levels, and a main effect of sampling time on cortisol levels (Table III). A significant interaction was also observed between social status and sampling time for KT levels (Table III). All other interactions among independent variables were not significant (Table III).

Planned comparisons were computed between pre- (d14) and post-manipulation (d20) levels for each treatment (stable, unstable) irrespective of social status. Only T levels increased from pre- (d14) to post-manipulation (d20) in the unstable but not in the stable treatment (Table III). For KT and cortisol there were no significant differences between pre- (d14) and post-manipulation (d20) levels for any of the treatments (stable, unstable) (Table III).

To further assess the relative roles of social status (dominant vs. subordinate vs. bystander) and sampling time (before manipulation = d14 vs. after manipulation = d20) other planned comparisons were also computed between the relevant pairs of variables (see Table III). Significant differences between the stable and the unstable treatments for any social status (dominant, subordinate, bystander) were only observed at d20 where T levels were lower in subordinate males of the unstable group than the ones of the stable group (Table III, Fig. 5A). Significant differences in hormone levels between males of different social status were observed at d14 between the following pairs: T: dominant > subordinate in unstable groups; KT: dominant = bystander > subordinate in unstable groups and dominant > subordinate in stable groups; cortisol: dominant = subordinate > bystander in unstable groups (Table III, Fig. 5). At d20 significant differences were observed between the following pairs: T: dominant > subordinate in unstable groups; KT: dominant > bystander in stable groups (Table III, Fig. 5). The variation between hormone levels before (d14) and after (d20) the social manipulation was only significant for androgens in subordinate males, where an increase of T was observed in the stable treatment, and an increase of KT was observed in the unstable treatment (Table III, Fig. 5A, B).

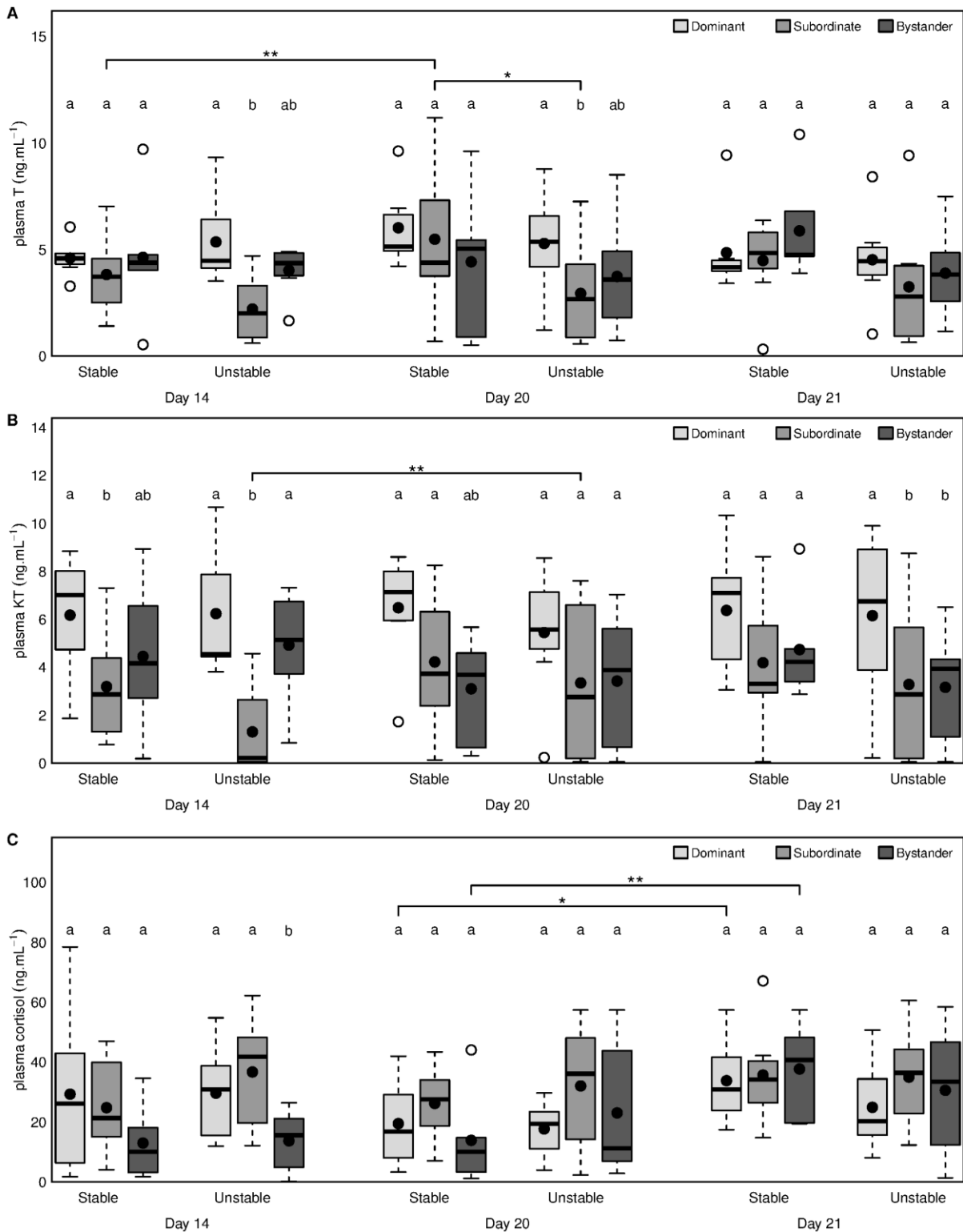


Fig 5. Effect of social manipulation and territorial intrusion on hormonal levels: (A) testosterone; (B) keto-testosterone; and (C) cortisol. In A, B and C the effects of treatment (stable and unstable), social status (dominant, subordinate and bystander) and sampling time (day 14, day 20 and day 21) were tested using a linear mixed model. Significant relevant *a priori* planned comparisons are presented. Asterisks indicate significant differences (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; and ***, $p < 0.001$) between sampling times (day 14 vs. day 20 and day 20 vs day 21) and between treatments (stable vs. unstable) for each male type, letters indicate significant difference between male types within each setting ($p < 0.05$). A standard boxplot is presented with a dark dot representing the mean value.

Effects of territorial intrusion on steroid hormone levels

To assess the effects of a simulated territorial intrusion on hormone levels (T, KT, cortisol) planned comparisons were computed between pre- (d20) and post-territorial intrusion (d21) levels for each treatment (stable, unstable) irrespective of social status.

Only cortisol levels increased from pre- (d20) to post-intrusion (d21) and this occurred in the stable but not in the unstable treatment (Table III). There was no observable androgen response to simulated territorial intrusion [i.e. there were no significant differences between pre- (d20) and post-intrusion (d21) T or KT levels for any of the treatments (stable, unstable); Table III].

To further assess the relative roles of social status (dominant vs. subordinate vs. bystander) and sampling time (before intrusion = d20 vs. after intrusion = d21) planned comparisons were also computed between the relevant pairs of variables (see Table III).

After the territorial intrusion (d21) there were no significant differences between the stable and the unstable treatments for any social status (dominant, subordinate, bystander) (Table III, Fig. 5A). After the territorial intrusion (d21) significant differences in hormone levels between males of different social status were only observed for KT in unstable groups (dominant > bystander = subordinate; Table III, Fig. 5). The variation between hormone levels before (d20) and after (d21) the territorial intrusion was only significant for cortisol in both dominants and bystanders in the stable treatment, in which an increase in cortisol levels were observed (Table III, Fig. 5C).

Table III. ANOVA analyses for hormonal level in the Social Manipulation phase using as categorical variables (in this order): sampling time (before, day 14, and after, day 20, the Social Manipulation and after Territorial Intrusion phase, day 21); treatment (Stable and Unstable); and Social Status (Dominant, Subordinate and Bystander). Main effects and interaction are from a linear mixed model. Results from planned comparisons are also presented.

	T		11KT		cortisol	
	F	p-value	F	p-value	F	p-value
Time	2,17	0,121	0,25	0,783	6,66	0,002
Treatment	2,77	0,105	0,75	0,391	0,11	0,742
Status	2,28	0,116	6,72	0,003	3,55	0,039
Time*Treatment	1,21	0,305	0,32	0,730	1,83	0,167
Time*Status	1,99	0,105	3,27	0,016	2,07	0,094
Treatment*Status	0,59	0,562	0,23	0,795	0,23	0,798
Time*Treatment*Status	0,82	0,518	1,03	0,399	0,36	0,833
Planned comparisons I (Time*Treatment)						
	z-value	p-value	z-value	p-value	z-value	p-value
St:20-14	2,47	0,014	0,11	0,909	-0,24	0,812
Un:20-14	0,52	0,605	-0,10	0,921	-0,63	0,528
St:21-20	-0,70	0,487	0,80	0,426	3,50	<0,001
Un:21-20	-0,24	0,815	0,06	0,956	1,51	0,130
Planned comparisons II (Time*Treatment*Status)						
	z-value	p-value	z-value	p-value	z-value	p-value
14;St:D-S	-1,14	0,256	-2,22	0,027	-0,02	0,981
14;St:B-D	0,03	0,976	-1,23	0,219	-1,67	0,095
14;St:B-S	1,12	0,262	0,90	0,367	-1,59	0,112
14;Un:S-D	-2,95	0,003	-4,09	<0,001	0,73	0,467
14;Un:B-D	-1,49	0,135	-1,27	0,203	-2,35	0,019
14;Un:B-S	1,40	0,161	2,87	0,004	-3,07	0,002
20;St:S-D	-0,47	0,639	-1,68	0,093	1,00	0,319
20;St:B-D	-1,35	0,179	-2,41	0,016	-0,88	0,381
20;St:B-S	-0,89	0,371	-0,80	0,425	-1,83	0,067
20;Un:S-D	-2,20	0,028	-1,89	0,059	1,51	0,131
20;Un:B-D	-1,45	0,147	-1,83	0,067	0,30	0,765
20;Un:B-S	0,75	0,456	0,06	0,951	-1,21	0,225
21;St:S-D	-0,33	0,744	-1,62	0,105	0,13	0,893
21;St:B-D	0,87	0,386	-1,17	0,243	0,34	0,733
21;St:B-S	1,18	0,238	0,39	0,695	0,21	0,832
21;Un:S-D	-1,19	0,234	-2,28	0,023	1,16	0,246
21;Un:B-D	-0,59	0,555	-2,38	0,018	0,34	0,734
21;Un:B-S	0,60	0,548	-0,10	0,924	-0,82	0,413
14;D:Un-St	0,69	0,492	0,29	0,770	0,64	0,523
14;S:Un-St	-0,94	0,346	-1,45	0,148	1,32	0,188
14;B:Un-St	-0,77	0,442	0,35	0,730	0,16	0,873
20;D:Un-St	-0,67	0,506	-0,53	0,595	-0,01	0,989
20;S:Un-St	-2,30	0,021	-0,67	0,502	0,42	0,676
20;B:Un-St	-0,60	0,551	0,24	0,813	1,17	0,243
21;D:Un-St	-0,30	0,765	-0,17	0,866	-1,05	0,296
21;S:Un-St	-1,11	0,266	-0,70	0,487	-0,06	0,949
21;B:Un-St	-1,73	0,084	-1,16	0,247	-1,04	0,299
St;D:20-14	1,94	0,052	0,37	0,713	-0,86	0,390
St;S:20-14	2,86	0,004	1,23	0,221	0,29	0,774
St;B:20-14	-0,27	0,789	-1,49	0,137	0,07	0,942
Un;D:20-14	-0,11	0,914	-0,94	0,350	-1,69	0,092
Un;S:20-14	1,07	0,284	2,59	0,009	-0,80	0,427
Un;B:20-14	0,00	0,997	-1,91	0,056	1,32	0,187
St;D:21-20	-1,60	0,110	-0,13	0,895	2,11	0,034
St;S:21-20	-1,37	0,169	-0,04	0,970	1,14	0,257
St;B:21-20	1,84	0,065	1,80	0,072	3,29	0,001
Un;D:21-20	-1,12	0,264	0,45	0,651	1,05	0,295
Un;S:21-20	0,45	0,651	-0,08	0,937	0,65	0,518
Un;B:21-20	0,23	0,821	-0,33	0,740	1,09	0,274

Abbreviations: T, testosterone level; 11KT, keto-testosterone level; cortisol, cortisol level; Time, sampling time; Status, Social Status; St, Stable Treatment; Un, Unstable Treatment; D, Dominant Status; S, Subordinate Status; B, Bystander Status; 14, sampling at day 14; 20, sampling at day 20; 21, sampling at day 21.

Association patterns of hormones, behavior and hormone-behavior

Effects of group formation on hormone-behavior associations

The effects of group formation on the association patterns between hormones and behavior were assessed using Pearson correlations. Before group formation (d7) there were no significant correlations between hormonal and behavioral variables (Fig. 6A). In contrast, after group formation (d14) 9 out of 15 (60%) hormone-behavior correlations became significant. KT became positively correlated with all behavioral variables, T also became positively correlated with all behaviors except courtship and there was also a marginally non-significant correlation between cortisol and male-male aggression (Fig.6B). Therefore, group formation significantly increased the proportion of significant correlations (test for difference between two proportions: z -value = -3.586, $N = 15$, $p < 0.001$).

Effects of social manipulation on hormone-behavior associations

The effects of social manipulation (unstable vs. stable) on the association patterns between hormones and behavior were assessed using Pearson correlations. Hormone levels before social manipulations (d14) were correlated with the majority (11 out of 21, 52.4%) of the behavioral variables, observed during the manipulation period, for the unstable but not for the stable treatments (Fig. 6C,D). KT levels before the social manipulation were positively correlated with all subsequently observed behaviors except for male-female aggression at IA, and T levels were also positively correlated with all observed behaviors except for male-female aggression both at IA and at 24h. In contrast, at the end of the period of social manipulation (d20), there was only 1 significant correlation (4.8%) between hormonal and behavioral variables (T vs. nuptial colouration), and it occurred in the unstable treatment (Fig. 6E, F). Therefore, the proportion of significant correlations significantly decreased after the social manipulations in the unstable (test for difference between two proportions: z -value = 3.416, $N = 21$, $p < 0.001$) but not in the stable group.

Effects of territorial intrusions on hormone-behavior associations

The effects of simulated territorial intrusions on the association patterns between hormones and behavior were assessed using Pearson correlations. Androgen levels measured before the territorial intrusion (d20) were good predictors of the subsequent aggressive response towards the intruder. However, in the unstable treatment it was T that was significantly correlated with aggressive behavior (Fig. 6G) whereas in the stable treatment it was KT (Fig.

6H). After the simulated territorial intrusion (d21) only KT levels in the unstable group were significantly correlated with the observed aggressive response towards the intruder.

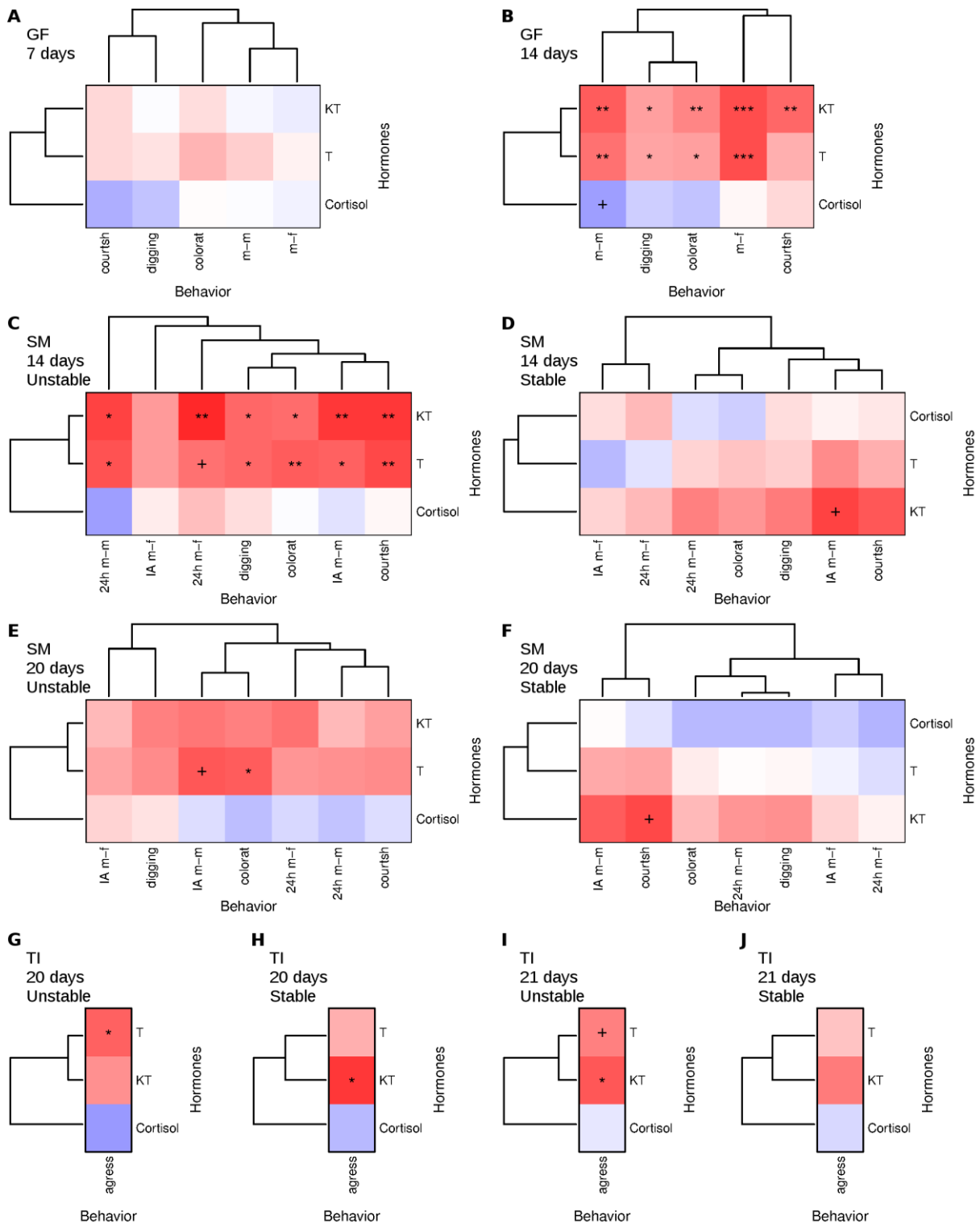


Fig. 6. Pearson correlations between hormone levels (T, testosterone; 11KT, keto-testosterone; and cortisol) and aggressive (m-m, male aggressiveness towards males; m-f, male aggressiveness towards females; agress, male aggressiveness towards intruders) and reproductive (colorat, time in nuptial coloration; digging, time digging; courtsh, courtship towards females) behaviors: (A) behavior during group formation (GF) and hormone levels at day 7; (B) behavior during group formation (GF)

and hormone levels at day 14; (C) behavior during social manipulation (SM) and hormone levels at day 14 in unstable treatment; (D) behavior during social manipulation (SM) and hormone levels at day 14 in stable treatment; (E) behavior during social manipulation (SM) and hormone levels at day 20 in unstable treatment; (F) behavior during social manipulation (SM) and hormone levels at day 20 in stable treatment; (G) behavior during territorial intrusion (TI) and hormone levels at day 20 in unstable treatment; (H) behavior during territorial intrusion (TI) and hormone levels at day 20 in stable treatment (I) behavior during territorial intrusion (TI) and hormone levels at day 21 in unstable treatment; (J) behavior during territorial intrusion (TI) and hormone levels at day 21 in stable treatment. Color scheme represents correlation values from -1 (Blue) to 1 (Red). Asterisks indicate significant correlations after p-value adjustment (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

Patterns of association between behaviors

To assess the effects of social manipulation (unstable vs. stable) on the association patterns between behaviors Pearson correlations were used. The proportion of significant correlations among behavioral variables was similar between the unstable (15 out of 28, 53.6%) and the stable treatments (13 out of 28, 46.4%) (test for difference between two proportions: z-value = -0.535, $N=28$, $p = 0.60$; see supplementary material Fig. S1). However, in an exploratory perspective we noted that the effect sizes (i.e. r-values) of the associations in the unstable treatment were generally higher than those in the stable treatment. Using conventional reference values for effect sizes of association measures (small: $r = 0.1$; medium: $r = 0.3$; large $r = 0.5$; Cohen 1988) the stable treatment had 60.7% associations with medium or large effect sizes (i.e. $r \geq 0.3$), whereas the unstable treatment had 89.2 %. This observation suggests a higher behavioral integration in the latter treatment.

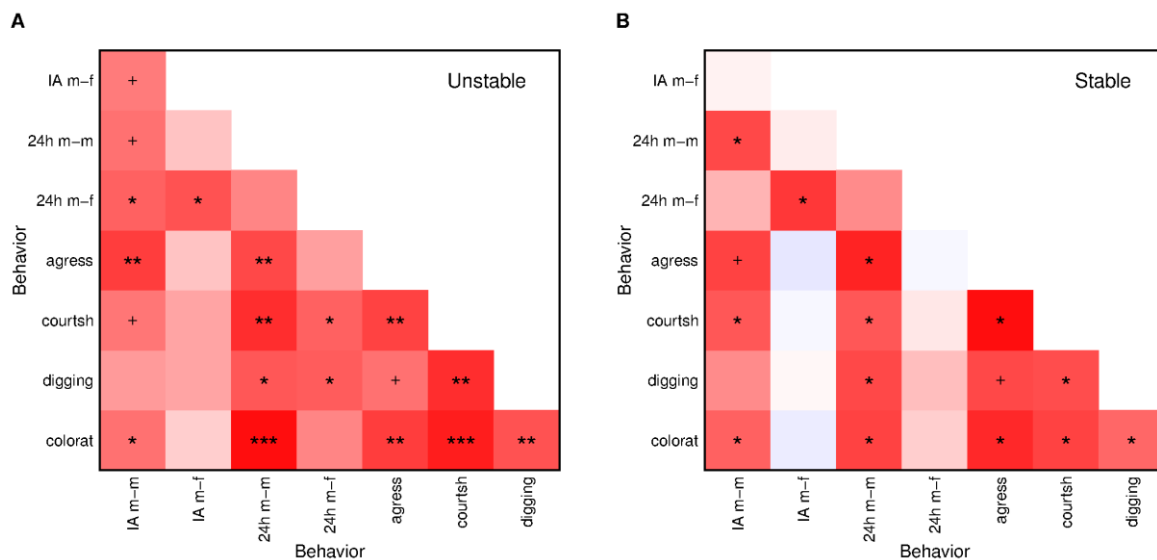
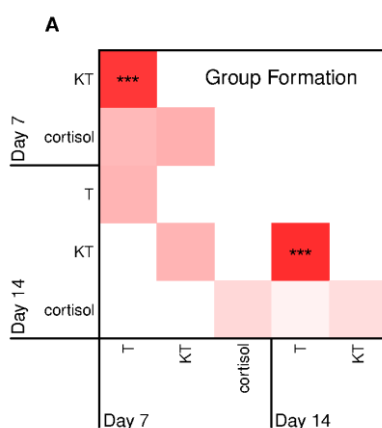


Fig. S1. (Supplementary material). Pearson correlations between aggressive (m-m, male aggressiveness towards males; m-f, male aggressiveness towards females; agress, male aggressiveness towards intruders) and reproductive (colorat, time in nuptial coloration; digging, time digging; courtsh, courtship towards females) behaviors measured during social manipulation and territorial intrusion: (A) behavior during social manipulation and territorial intrusion in unstable treatment; (B) behavior during social manipulation and territorial intrusion in stable treatment. Color scheme represents correlation values from -1 (Blue) to 1 (Red).

Patterns of association between steroid hormones

To assess the effects of group formation and social manipulation (unstable vs. stable) on the association patterns between steroid hormones Pearson correlations were used. The two measured androgens (T and KT) were positively correlated with each other, but not with cortisol, in all sampling points (d7, d14, d20, d21; see supplementary material Fig. S2). During group formation there were no significant correlations between pre- (d7) and post-group formation (d14) levels for any of the measured steroids. However, during social manipulation (d14 vs. d20) and during territorial intrusion (d20 vs. d21) pre- and post-manipulation hormone levels for each hormone tended to be correlated both in the unstable and in the stable treatment (see supplementary material Fig. S2). KT was the steroid that presented the highest temporal consistency with significant positive correlations between d14 and d20 and between d20 and d21 for both treatments (unstable, stable; see supplementary material Fig. S2). T levels were correlated across both pairs of sampling points in the unstable treatment but only between d20 and d21 (i.e. territorial intrusion phase) in the stable treatment (see supplementary material Fig. S2). Finally, cortisol was the steroid with the highest temporal inconsistency, with a significant temporal correlation only present in the unstable treatment between d20 and d21 (i.e. territorial intrusion). The proportion of significant temporal correlations for steroid levels was not different between treatments (unstable treatment: 5 out of 6, 83.3%; stable treatment: 3 out of 6, 50%; test for difference between two proportions: z-value = 1.225, N = 6, p = 0.22).



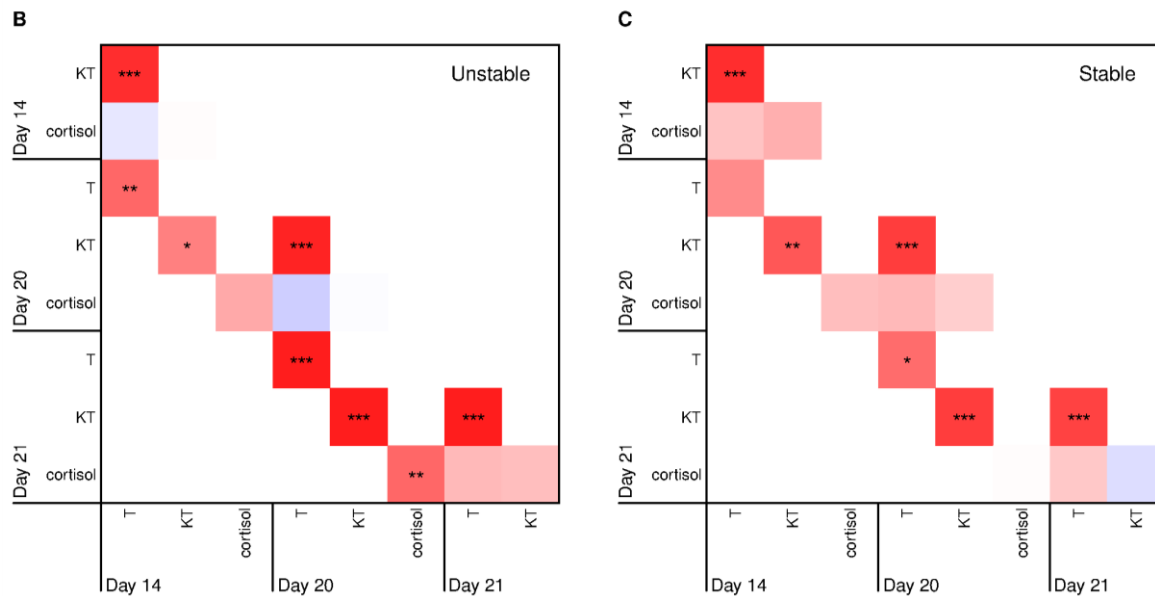


Fig. S2. (Supplementary material). Pearson correlations between hormone levels (T, testosterone; 11KT, keto-testosterone; and cortisol) measured before and after group formation, social manipulation and territorial intrusion: (A) hormone levels at day 7 and day 14; (B) hormone levels at day 14, day 20 and day 21 in unstable treatment; (C) hormone levels at day 14, day 20 and day 21 in stable treatment. Color scheme represents correlation values from -1 (Blue) to 1 (Red). Asterisks indicate significant correlations after p-value adjustment (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

DISCUSSION

During the Group formation phase males established a dominance hierarchy and the dominant male successfully established breeding territories, dug nests and courted females. Interestingly, despite being physically separated from the group and without behavioral feedback from group members due to the one-way mirror, bystander males also build a bower and adopted the nuptial colouration. These behavioral data confirm previous studies in this species that indicate that one week is enough for the establishment of dominance hierarchies and breeding territories (Oliveira and Almada, 1998).

In response to group formation KT increased in dominant males and decreased in subordinates. In contrast, the response of cortisol to group formation was only significant in bystanders where a decrease was observed. Finally, there were no correlations between any of the steroid hormones measured before group formation (d_7) and the behavior expressed during group formation, but androgen (both KT and T) and not cortisol levels measured after group formation (d_{14}) were positively correlated with most of the behavioral variables. This pattern of androgen response to group formation in dominants and subordinates confirms previously results on this species (Oliveira et al., 1996) that found that androgens levels

before group formation were not good predictors of social status achieved after group formation, but that social status achieved (dominant vs. subordinate) would predict androgen levels after group formation, with dominants having higher levels than subordinates. It is worth noting that the similarity in these results was obtained using two different methodologies, since here we have assayed steroids directly from the plasma and in the previous study (Oliveira et al., 1996) steroids were measured from urine. Thus, urinary steroid levels in this species seem to reflect accurately the responses of circulating levels to social challenges. This pattern of androgen response to group formation also matches the prediction of the challenge hypothesis (Wingfield et al., 1990, 2000) that in response to social challenges, posed both by the presence of reproductive females and male competitors, androgens should increase from a constitutive breeding baseline, mimicked here in lab conditions by the right temperature and photoperiod, to an heightened level, hypothetically close to the physiological maximum.

Given that the raise in androgen levels above a constitutive breeding baseline are supposed to be driven by social challenges (Wingfield et al., 1990, 2000) we hypothesized that different regimes of social challenge would elicit different androgen responses. Therefore, it was predicted that in the unstable groups, where there is a new dominant male each day that faces the challenge of re-establishing its status and creates a social opportunity for subordinate males to gain status, androgen levels would increase from pre- to post-manipulation, whereas in the stable groups, where dominant males are removed but placed back on the group, therefore not disrupting the social hierarchy, androgens levels were not predicted to vary with manipulation. According to the same rationale it was also hypothesized that a territorial intrusion after the social manipulation phase would drive androgen levels very close to their physiological maximum and therefore the androgen responsiveness to the intrusion should be smaller in the unstable group where androgen levels would already be closer their physiological maximum, than in stable groups in which the scope for responses would still be larger.

In contrast to our first prediction, only T levels significantly changed from the pre- (d14) to the post-manipulation (d20) sampling point and it was in the stable, rather than in the unstable, treatment. Despite these overall negative results for the hormonal response to the social manipulation, the success of the social manipulation treatment used to create socially stable vs. socially unstable groups was confirmed by the differences in aggressive behavior observed between the two treatments. Interestingly these differences were not observed immediately after swapping the dominant males among the groups, but rather 24h after the manipulation. This suggests that immediately after an event that promotes social instability

there is a period of mutual assessment of competitive abilities by the males, only after which the asymmetries in aggressive behavior are expressed. Thus, the behavioral data indicate that animals perceived the two treatments differently, hence the lack in androgen responsiveness to the social manipulation was not due to a lack of discrimination between the two treatments. An explanation for this lack of androgen response could be that maximum physiological levels have already been achieved by the social challenges involved in group formation, and thus there was no further scope of response for the subsequent social challenges. However, a closer look at Fig. 5 suggests that overall androgen levels tend to increase from the end of group formation to the end of the social manipulation period, but that this increase is present both in the stable and the unstable treatments. An alternative explanation is that above a certain threshold of social challenge fish no longer adjust the androgen response to the level of perceived aggressiveness, and that this threshold has been achieved in both treatments. Future research, using a behavioral reaction norm approach (*sensu* (Dingemanse et al., 2010) in which individuals are exposed to a gradient of social challenges, is needed to clarify this point.

In contrast to our second prediction, the territorial intrusion also failed to elicit an androgen response in both treatments (stable, unstable). However, an effect of the treatment was detected on the cortisol response to the territorial intrusion, with males from socially stable groups displaying a higher response. The lack of androgen response to the territorial intrusion treatment by the dominant males observed in this study contrasts with previous results in this species where socially isolated males or males kept in the presence of gravid females increased their androgen levels in response to a territorial intrusion (Hirschenhauser et al., 2004) or even to the observation of a fight between third parties (Oliveira et al., 2001), and is compatible with the social challenge threshold hypothesis proposed above according to which above a certain threshold of social challenge (achieved in this study by the group formation followed by the social manipulations both in the stable and the unstable treatments) no further scope of androgen response is available. In a reassessment of the challenge hypothesis, Goymann and co-workers (2007) noted that the original predictions of the challenge hypothesis referred to variation in the seasonal androgen responsiveness and that this differs from the androgen responsiveness to a social challenge alone, in a number of species. Moreover, it was noted that among birds, males from multiple brooded species tend to exhibit an androgen response to social challenges whereas males from single-brooded species lack this response despite the high seasonal androgen responsiveness. Thus, apparently in some species males may become irresponsive to social challenges, even if they still have a physiological scope of response (e.g. Apfelbeck and Goymann, 2011). As mentioned above previous studies in the Mozambique tilapia have documented male

androgen responsiveness to different social stimuli, namely territorial intrusions, gravid females alone, or a territorial intrusion in males already in the presence of gravid females (Oliveira et al., 2001; Hirschenhauser et al., 2004). Taken, together these results support this hypothesis that males may become irresponsive after a certain threshold of social stimulation has been achieved.

The main focus of this study was to test if variation in the stability of the social environment could induce changes in the patterns of hormone-behavior associations. Heterogeneous environments are known to promote both phenotypic plasticity (Schlichting, 2002) and flexible correlation structures among phenotypic traits (i.e. plasticity of integration, Schlichting, 1989; Earley et al., 2012). Thus, the heterogeneity that typically characterizes the social environment, which may offer periods of social stability alternating with periods of social instability, could be viewed as promoting variation both in the degree and pattern of correlations among behavioral traits and between these and the hormones responsible for their phenotypic integration. Phenotypic integration (as expressed by the correlations among traits and between them and the physiological integrator) was predicted to increase in periods of social instability, when behavioral traits need to be co-expressed in face of the social challenges/ opportunities that the individuals are face with. In contrast, in periods of social stability, characterized by the lack of social challenges/ opportunities it was predicted that the correlations among behavioral traits and between them and the underlying physiological integrator (e.g. hormone) could become relaxed. The results of this study fully confirm these predictions. In the unstable treatment there was a tighter association among behaviors and between hormones and behavior as revealed by the higher proportion of significant correlations (see Figs. 6 and supplementary material Fig. S1). In particular it was the hormone levels measured before the manipulation that were correlated with subsequent behavior and only in the unstable treatment. This result suggest that in periods of social instability steroid hormones act as phenotypic integrators that blend together a set of behaviors (aggressive and reproductive behaviors), which are more free to vary in response to various environmental factors in periods of social stability, where behavior becomes dissociated from hormones. In this respect it is also interesting to note the lack of hormone-behavior associations at the end of the social isolation period (d7), and its appearance after the group formation phase (d14), when sets of behaviors have to be co-expressed. A similar pattern of a socially-driven shift between associated and dissociated hormone-behavior association patterns has been recently described for another cichlid fish (Maruska and Fernald, 2010). In *Astatotilapia burtoni* when subordinate males are given the opportunity to establish a territory they rapidly change their behavior, expressing territorial and reproductive

behaviors and increase the circulating levels of KT. However, once social stability is achieved after social ascent, aggressive behavior becomes dissociated from KT (Maruska and Fernald, 2010). Thus, the results of these two studies are highly concordant and supportive of the proposed hypothesis.

Finally, the pattern of association among steroid hormones shows overall positive correlations between the 2 measured androgens (T and KT) but not between these and cortisol, suggesting an independent functioning between the reproductive and stress axis.

In summary, the results presented here support the proposed hypothesis that the role of androgens on phenotypic integration and independence may vary with the stability of the social environment. Future research should explore the mechanisms that allow this temporal variation in the hormone-behavior association patterns, such as differential expression of steroid receptors in relevant brain regions underlying aggressive and reproductive behaviors that may allow the compartmentalization of steroid effects.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank D.E. Kime who kindly provided the KT antibody for the RIA, A.V.M. Canário for the protocol to produce marked KT from cortisol, and Francine Mendonça for help with the data collection. This study was funded by research grants PTDC/PSI/71811/2006 and PTDC/MAR/72117/2006 from Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT, Portugal and the European Commission FEDER Program), and the FCT Pluriannual Program (R&D unit MAR-LVT-Lisboa-331). During this project O. Almeida was being supported by a PhD fellowship from FCT (SFRH/BD/37187/2007), J. Lopes by a post-doctoral fellowship within a FCT research grant (EXCL/BIA

REFERENCES

- Adkins-Regan, E., 2005. Activity dependent brain plasticity: does singing increase the volume of a song system nucleus? Theoretical comment on Sartor and Ball (2005).
- Apfelbeck, B., Goymann, W., 2011. Ignoring the challenge? Male black redstarts (*Phoenicurus ochruros*) do not increase testosterone levels during territorial conflicts but they do so in response to gonadotropin-releasing hormone. *Proc. Biol. Sci.* 278, 3233–42.
- Apfelbeck, B., Mortega, K., Kiefer, S., 2013. Associated and disassociated patterns in hormones, song, behavior and brain receptor expression between life-cycle stages in male black redstarts, *Phoenicurus*. ... *Endocrinol.*

- Baerends, G.P., Baerends-van Roon, J.M., 1950. An introduction to the study of the ethology of the cichlid fishes. *Behaviour Supplement*, 1–243.
- Canoine, V., Gwinner, E., 2002. Seasonal Differences in the Hormonal Control of Territorial Aggression in Free-Living European Stonechats. *Horm. Behav.* 41, 1–8.
- Cohen, A. a, Martin, L.B., Wingfield, J.C., McWilliams, S.R., Dunne, J. a, 2012. Physiological regulatory networks: ecological roles and evolutionary constraints. *Trends Ecol. Evol.* 27, 428–35.
- Cohen J. (1988). *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences* (second ed.). Lawrence Erlbaum Associates.
- Dingemanse, N.J., Kazem, A.J.N., Réale, D., Wright, J., 2010. Behavioural reaction norms: animal personality meets individual plasticity. *Trends Ecol Evol* 25, 81–89.
- Dittami, J.P., Reyer, H.-U., 1984. A Factor Analysis of Seasonal, Behavioral, Hormonal and Body Weight Changes in Adult Male Barheaded Geese, *Anser Indicus*. *Behaviour* 90, 114–123.
- Earley, R.L., Hanninen, A.F., Fuller, A., Garcia, M.J., Lee, E.A., 2012. Phenotypic plasticity and integration in the mangrove rivulus (*Kryptolebias marmoratus*): a prospectus. *Integr. Comp. Biol.* 52, 814–27.
- Foo, J.T.W., Lam, T.J., 1993. Serum cortisol response to handling stress and the effect of cortisol implantation on testosterone level in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Aquaculture* 115, 145–158.
- Goymann, W., 2009. Social modulation of androgens in male birds. *Gen. Comp. Endocrinol.* 163, 149–157.
- Hirschenhauser, K., Oliveira, R.F., 2006. Social modulation of androgens in male vertebrates: meta-analyses of the challenge hypothesis. *Anim. Behav.* 71, 265–277.
- Hirschenhauser, K., Taborsky, M., Oliveira, T., Canário, a. V.M., Oliveira, R.F., 2004. A test of the “challenge hypothesis” in cichlid fish: simulated partner and territory intruder experiments. *Anim. Behav.* 68, 741–750.
- Hirschenhauser, K., Winkler, H., Oliveira, R., 2003. Comparative analysis of male androgen responsiveness to social environment in birds: the effects of mating system and paternal incubation. *Horm. Behav.* 43, 508–519.
- Ketterson, E.D., Atwell, J.W., McGlothlin, J.W., 2009. Phenotypic integration and independence: Hormones, performance, and response to environmental change. *Integr. Comp. Biol.* 49, 365–79.
- Landys, M., Goymann, W., Schwabl, I., 2010. Impact of season and social challenge on testosterone and corticosterone levels in a year-round territorial bird. *Horm.*
- Landys, M.M., Goymann, W., Raess, M., Slagsvold, T., 2007. Hormonal responses to male-male social challenge in the blue tit *Cyanistes caeruleus*: single-broodedness as an explanatory variable. *Physiol. Biochem. Zool.* 80, 228–240.
- Logan, C.A., Wingfield, J.C., 1990. Autumnal territorial aggression is independent of plasma testosterone in mockingbirds. *Horm. Behav.* 24, 568–581.

- Lynn, S.E., Hayward, L.S., Benowitz-Fredericks, Z.M. Wingfield, J.C., 2002. Behavioural insensitivity to supplementary testosterone during the parental phase in chestnut-collared longspur, *Calcarius ornatus*. *Anim. Behav.* 63, 795–80.
- Martin, P., Bateson, P., 2007. *Measuring Behaviour: An Introductory Guide*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Maruska, K.P., Fernald, R.D., 2010. Behavioral and physiological plasticity: rapid changes during social ascent in an African cichlid fish. *Horm. Behav.* 58, 230–40.
- McGlothlin, J.W., Ketterson, E.D., 2008. Hormone-mediated suites as adaptations and evolutionary constraints. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 363, 1611–20.
- Oliveira, R.F., 2009. Social behavior in context: Hormonal modulation of behavioral plasticity and social competence. *Integr. Comp. Biol.* 49, 423–40.
- Oliveira, R.F., Almada, V.C., 1998. Mating tactics and male – male courtship in the lek-breeding cichlid *Oreochromis mossambicus*. *J. Fish Biol.* 52, 1115–1129.
- Oliveira, R.F., Almada, V.C., Canario, A.V.M., 1996. Social modulation of sex steroid concentrations in the urine of male cichlid fish *Oreochromis mossambicus*. *Horm. Behav.* 30, 2–12.
- Oliveira, R.F., Hirschenhauser, K., Carneiro, L.A., Canario, A.V.M., 2002. Social modulation of androgen levels in male teleost fish. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 132, 203–15.
- Oliveira, R.F., Lopes, M., Carneiro, L.A., Canario, A. V., 2001. Watching fights raises fish hormone levels. *Nature* 409, 475.
- Oyegbile, T., Marler, C., 2005. Winning fights elevates testosterone levels in California mice and enhances future ability to win fights. *Horm. Behav.* 48, 259–267.
- R, D.C.T., 2008. *R: A language and environment for statistical computing*.
- Schlichting, C.D., 1989. Phenotypic plasticity in *Phlox*. *Oecologia* 78, 496–501.
- Schlichting, C.D., 2002. Editorial: Phenotypic plasticity in plants. *Plant Species Biol.* 17, 85–88.
- Wingfield, J.C., 1994. Control of territorial aggression in a changing environment. *Psychoneuroendocrinology* 19, 709–721.
- Wingfield, J.C., Hegner, R.E., Dufty, A.M.J., Ball, G.F., 1990. The “Challenge Hypothesis”: Theoretical Implications for Patterns of Testosterone Secretion, Mating Systems, and Breeding Strategies. *Am. Nat.* 136., 829–846.
- Wingfield, J.C., Hunt, K.E., 2002. Arctic spring: hormone–behavior interactions in a severe environment. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* 132, 275–286.
- Wingfield, J.C., Lynn, S.E., Soma, K.K., 2001. Avoiding the “Costs” of Testosterone: Ecological Bases of Hormone-Behavior Interactions. *Brain. Behav. Evol.* 57, 239–251.

III - Mecanismos Neuroendócrinos reguladores do comportamento Social

Artigo 2: Almeida, O., Adelino, V.M., and Oliveira, R. F.,. Castration affects reproductive but not aggressive behavior in a cichlid fish. Perspectives in Cichlid Endocrinology, General and Comparative Endocrinology. **Artigo publicado (apenas versão on line disponível).**

Artigo3: Almeida, O., Gozdowska, M., Kulczykowska, E. and Oliveira, R.F. 2012. Brain levels of arginine-vasotocin and isotocin in dominant and subordinate males of a cichlid fish. Hormones and Behavior 61: 212-217- **Artigo publicado.**

Artigo 4: Almeida, O. and Oliveira, R.F Social status and arginine vasotocin neuronal phenotypes in a cichlid fish. **Artigo submetido para publicação na revista *Brain Behavior and Evolution***

1 - A castração afecta o comportamento reprodutor, mas não influencia o comportamento agonístico

Artigo 2:

CASTRATION AFFECTS REPRODUCTIVE BUT NOT AGGRESSIVE BEHAVIOUR IN A CICHLID FISH

Olinda Almeida¹, Adelino V. M. Canário² & Rui F. Oliveira^{1,3}

¹ Unidade de Investigação em Eco-Etologia, ISPA – Instituto Universitário, Rua Jardim do Tabaco, 34, 1149-041 Lisboa, Portugal

² CCMAR - Centro de Ciências do Mar, Universidade do Algarve, Gambelas, 8005-139, Faro, Portugal.

³ Champalimaud Neuroscience Programme, Instituto Gulbenkian de Ciência, Rua da Quinta Grande, 6, 2780-156 Oeiras, Portugal.

ABSTRACT

Gonads are the main source of sex steroids, which have been implicated in the regulation of sexually differentiated behavior, such as reproductive and aggressive displays. In the Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) territorial males have higher androgen levels than non-territorials, express reproductive behavior and use a urine-borne pheromone to signal their social status towards conspecifics. Here we investigated the effects of gonadectomy on the circulating levels of androgens and cortisol, and on the expression of aggressive and reproductive behavior (nest building, courtship behavior, and nuptial coloration). Males were either castrated, urine bladder damaged, or sham-operated and visually exposed to a group of females during 8 consecutive days and subsequently to a male on day 9. The urine bladder damaged treatment was included in the experimental design because a full castration procedure in this species causes quite often damage to the urine bladder. Gonadectomy lowers dramatically the circulating levels of androgens measured at 4 and 8 days post-castration and abolishes the expression of nest building, courtship behavior and nuptial coloration, but has no effect on the expression of aggressive behavior. These results confirm the gonads as the main source of androgens in this species and show that androgens are necessary for the expression of reproductive behaviors. However, the expression of aggressive behavior seems to be decoupled from gonadal steroids, namely androgens, suggesting the action of independent central mechanisms.

Keywords: Tilapia; Castration; Gonadal hormones; Androgens; Aggression; Courtship.

INTRODUCTION

The gonads are the main source of sex hormones, which have a pivotal role in sex differentiation, the development of secondary sex characters and the expression of sex specific behaviours (Nelson, 2005). Therefore, gonadal hormones have been viewed as playing an integrative role that assures the co-expression of sets of functional traits in the same phenotype, such that differentiation of the gonads into a given sex express implies the expression of the corresponding secondary sexual characters and behaviour. In males,

androgens play such a role, either directly or through aromatization into estrogens (Balthazart and Ball, 1998). Androgens have been implicated in the expression of multiple aspects of reproductive behavior including courtship displays and breeding-related aggression (e.g. defence of breeding territories or mates, Pfaff et al., 2008). However, the fact that androgens modulate the expression of sex-specific behaviour does not demonstrate per se that they are necessary for its expression. In fact, a compilation of the effects of castration on reproductive and aggressive behaviour across different fish species shows divergent results (see Oliveira and Gonçalves 2008, and Gonçalves and Oliveira 2010 for recent reviews). Castration reduced or abolished the expression of reproductive behaviors, such as nest building, nuptial coloration or courtship displays, in some species, whereas it had no effect in others (Oliveira and Gonçalves 2008; Gonçalves and Oliveira 2010). Similarly, the effects of castration on aggressive behavior ranged from negative, to neutral, and even to positive (Oliveira and Gonçalves 2008; Gonçalves and Oliveira 2010), and divergent results can be found within the same species (e.g. *Gasterosteus aculeatus*; Hoar 1962; Baggerman 1966; Wootton 1970)

Cichlid fishes have been emerging as model organisms in behavioural neuroendocrinology, given the complexity of their social and breeding behavior (e.g. cooperative breeding in *Neolamprologus pulcher*, Desjardins and Stiver 2008, Fitzpatrick 2005, Taves et al. 2009, Wong and Balshine 2011) and the diversity of mating systems and parental care types present in closely related species that allows for comparative studies (e.g. phylogenetic test of the challenge hypothesis in African cichlids with divergent mating systems, Hirschenhauser et al. 2004). In our lab we have been using the Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) as a model to study the neuroendocrinology of social behaviour. In this species androgens respond to social interactions (Oliveira et al. 1996) and socially driven changes in androgens moderate the expression of both secondary sex characters (Oliveira and Almada 1998) and male-male competitive behavior (i.e. winner effect, Oliveira et al. 2009). Therefore it became important to assess if androgens are necessary for the expression of reproductive and aggressive behaviours, which would suggest an activational role of androgens on the neural circuits underlying behavior, or if they act as moderators, which would be compatible with a neuromodulator role (e.g. facilitator) on a neural circuit that would be functional even in the absence of androgens.

Here the effects of castration on reproductive behavior (nuptial coloration, nest building and courtship displays) expressed in the presence of females, and on aggressive behaviour displayed towards a neighbouring male were tested in male *O. mossambicus*. Given that the complete excision of the gonads in this species involves damage to the urinary bladder (see

details in the methods section 2.3), and the fact that male *O. mossambicus* use urine-born compounds to communicate social status (Almeida et al., 2005, Barata et al., 2007), the effects of urinary bladder damage were also investigated. In summary, the specific aims of this study were: (1) to characterize the effects of castration in circulating levels of androgens (testosterone, T; and 11-keto-testosterone, KT); (2) to investigate the effects of castration on reproductive and aggressive behaviors; and (3) to verify the effects of urinary bladder damage on circulating levels of androgens, and on aggressive and courtship behavior

MATERIAL AND METHODS

Animals and housing

The tilapia males used in this study were part of a stock held at ISPA - Instituto Universitário (Lisboa, Portugal) that is maintained in glass tanks (120 x 40 x 50 cm, 240 L) with a fine gravel substrate, in stable social groups of 4 males and 5 females per tank. Tanks were supplied with a double filtering system (sand and external biofilter, Eheim) and constant aeration. Water quality was monitored on a weekly basis for nitrite (0.2-0.5 ppm), ammonia (<0.5 ppm) (Pallintest kit®) and pH (6.0-6.2). Fish were kept at a temperature of 26 ± 2 °C and a 12L:12D photoperiod, and fed with commercial cichlid floating and sinking sticks. The social status of the males in each tank, based on the body coloration and on the possession of a spawning pit on the substrate, was monitored on a daily basis (Oliveira and Almada, 1996a).

Experimental protocol

Twenty eight territorial males [territorial status was assessed from nuptial coloration and nest defence behaviour; body mass (mean \pm SD): castrated = 41.4 ± 7.0 g; sham = 41.7 ± 8.4 g; urinary bladder damaged = 33.3 ± 1.7 g] were removed from the stock tanks and introduced in experimental aquaria (47cm X 24 cm X 30 cm, following stock conditions) where they were left for 2 days in order to familiarize with the new aquarium (days -2 and -1, see Fig. 1 for the time line of the general protocol). One to three hours before males introduction in the experimental aquaria, 4 females [body mass (mean \pm SD): 23.2 ± 5.2 g, N=30] were collected from stock tanks and introduced in an adjacent aquarium (70cm X 37cm X 30cm) and acted as the visual stimulus to focal males. On day 0 males underwent one of three types of surgery: (1) sham operation; (2) castration; and (3) urinary bladder damage. The latter treatment was used as a complementary control treatment because the total removal of the testis implied damaging to the urinary bladder (Fig. 2). In order to prevent exposure of the

experimental males to their own hormones, that might have been released into the water, the water of the experimental aquaria was renewed immediately after surgery and any nests built by the males on days -2 , -1 and 0 (i.e. before surgery) were destroyed. Males were then returned to their experimental aquaria and kept in visual contact with females.

Blood was collected from the caudal vein (using 1 ml syringes with 25G/16 mm needles) under anaesthesia (MS-222, Pharmaq; 300-400 ppm) at days 0 (before surgery), 4 and 8. Blood sampling always took less than 4 min since the induction of anaesthesia, which prevents any possible effects of handling stress on cortisol levels (Foo and Lam, 1993). Blood was centrifuged and the plasma was stored at – 20°C until further processing.

At day 8 an unfamiliar male to the focal male was placed isolated in an adjacent aquarium (18cm X 30 cm X 15 cm) at the opposite side of the females' aquarium (the side of the male and female aquaria was randomized across replicates). During day 8 visual access between the two males was prevented by placing a white opaque partition between the aquaria.

During day 9 visual access to females was blocked by insertion of a white opaque partition and visual contact to the male in the adjacent aquarium was allowed for 15 min. The focal male behavior (bite, displays and courtship) towards the adjacent (putative intruder) male was recorded using a multievent recorder (The Observer v. 5, Noldus Technology). On day 9, fish were sacrificed by decapitation under deep anaesthesia.

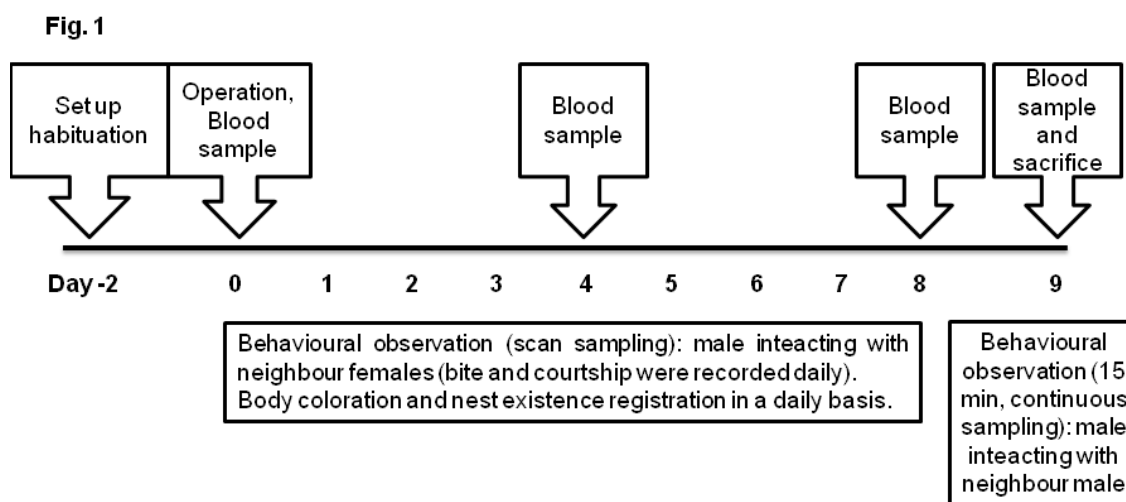


Fig. 1- Experimental design - Focal males were introduced in the experimental set up 2 days before the operation for habituation. On day 0 males were operated creating sham, castrated or urine bladder damaged males. Male interaction with neighbouring females was observed for 10 min each day. Nest presence and male nuptial coloration were registered daily. On the day 9, focal males were exposed to a territorial neighbouring male and the behaviour of the focal male was recorded for 15 min. Blood samples were collected on days 0 (before operation), 4, and day 8 - (after the interaction with the neighbour male).

Surgical procedures

Fish were anaesthetized and placed belly-up in a “V” shaped bed with an oral supply of dechlorinated and aerated water containing anaesthetic (150-200 ppm). A ventral mid-sagittal incision was made from the pelvic fin region towards the anal region. *Circa* 3-4 mm from reaching the anus opening the direction of the incision was moved 120° to the right and proceeded for ca. 0.5 cm, in order to expose the insertion of the gonads. In the castrated treatment both testis were totally removed by a proximal incision. Given the tight insertion of the testicular ducts with the urinary bladder (Fig. 2), and to make sure that no vestigial testicular tissue remained, the urinary bladder was always partially severed as a result of the complete castration procedure. To control for this injury during castration a control treatment was included consisting of a partially sectioned urinary bladder only, in which 2 side cuts (without tissue removal) were done 3 mm from the basis of the insertion of gonads, without affecting gonadal functioning. In the sham operated treatment, the ventral incision was made and sutured without either castration or urinary bladder damage. In all treatments the ventral incision was sutured using sterile synthetic absorbable braided polyglycolic acid suture (USP 5/0, 3/8 circle DS 19 mm, Surgicril®, ref. 11101519). After recovery from anaesthesia operated fish were returned to their experimental aquarium. No mortalities or secondary infections were recorded.

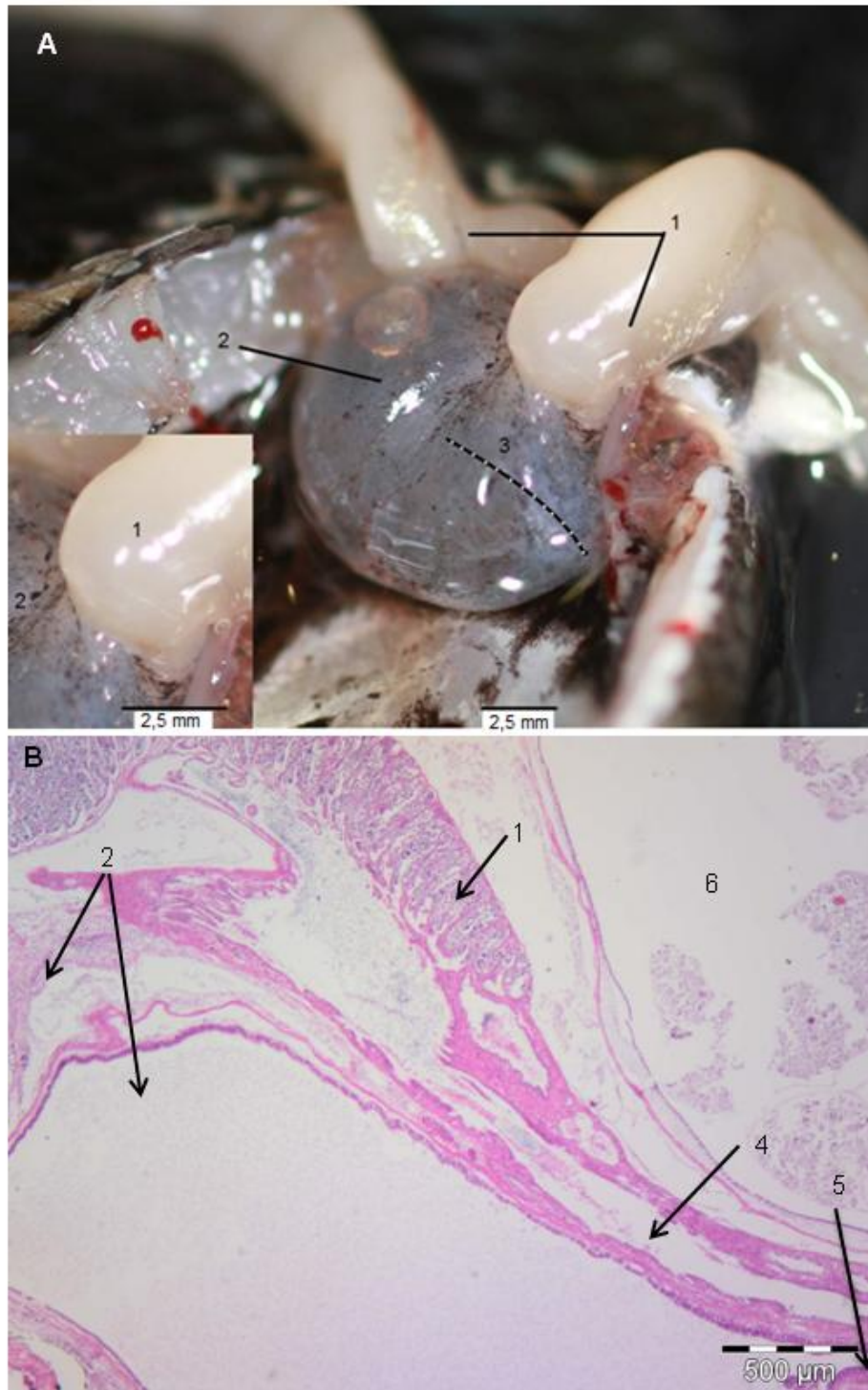


Fig. 2-- Detail of the area of the junction between the gonads and the urinary bladder. The testis and the urinary bladder are juxtaposed in the proximal region of testis. To avoid leaving any vestigial gonadal tissue that could be a source of androgens, the urinary bladder is inevitably damaged during castration. (A) In the urinary bladder damaged treatment one incision on each side of the bladder was made (3, dashed line represents the local and the extension of the incision on the left side). (B) Histological section (magnification 40x) to illustrate the proximity of the gonads and bladder that prevents a full castration to be performed without damage to the bladder: 1- gonads; 2 - urinary bladder; 3- local of incision on the left side of the urinary bladder; 4- sperm duct; 5- urethra; 6- Intestine.

Behavioral observations

Daily behavioral observations (10 min/ day) were performed from day 0 (before surgery) to day 8 using instantaneous sampling (sensu Martin and Bateson, 2007) with a 10 sec sample interval between scans, in which courtship and aggressive behavior (bite) directed towards females were recorded. Nest presence and body coloration were also recorded daily by direct visual inspection during the observation period. At day 9 the behavior directed by the focal male towards the stimulus male was recorded using continuous recording (sensu Martin and Bateson, 2007), in which the following behavioural patterns were noted: bite, displays, and courtship (for an ethogram of this species see (Baerends and Baerends-van Roon, 1950).

Quantification of androgens

Plasma samples (100 μ l) were extracted with diethyl-ether (2x4 ml) by freezing the aqueous phase in liquid nitrogen (10 min, -80°C) after mixing and centrifugation (1,000 g, 10 min, 4°C), followed by decanting the supernatant and evaporating it under a stream of nitrogen gas.

Androgen concentrations were measured by radioimmunoassay. The testosterone and 11-ketotestosterone antisera were kindly donated, respectively by Drs A. P. Scott and David Kime. The testosterone antiserum cross-reactions were 63% for androstenedione, 35% for 11-ketotestosterone, 55% for 11 β -hydroxytestosterone, 40% for 5 α -androstane-17 β -ol-3-one, 31% for 5 β -androstane-17 β -ol-3-one, 12% for 5 β -androstane-3 α ,17 β -diol, 25% for 5 α -androstane-3 α ,17 β -diol. The 11-ketotestosterone antiserum cross-reactions are given elsewhere (Kime and Manning, 1982) and were 20.1% for 11 β -hydroxytestosterone, 20.6% for testosterone, 76.9% for androstenetrione, 30.1% for 11 β -hydroxyandrostenedione, 52% for dihydrotestosterone, 3.3% for cortisol and 1.3% for cortisone. Tritiated cortisol and testosterone were purchased from GE Healthcare Europe GmbH (Carnaxide, Portugal). The 11-ketotestosterone label was produced from tritiated cortisol (Kime and Manning, 1982). Inter- and intra-assay variability was respectively 15.29% and 3.47 % for testosterone and 9.55% and 3.58% for KT.

Data analysis

Data were assessed for the assumptions of parametric statistics (normality and homogeneity of variances, using Levene's test). When data did not conform to these assumptions it was

transformed by using the transformation that best corrected the detected deviations. When no transformations yielded satisfactory results non-parametric statistics were used. Following these procedure:

(1) data for both androgens (T and KT) were log transformed and subsequently used in a repeated measures ANOVA to test for the main effect of treatment (categorical variable: castrated vs. sham operated vs. urinary bladder damaged) on hormone levels in the experimental period (repeated factor: day 0 vs. day 4 vs. day 8); planned comparisons defined a priori were also used to assess: (A) the temporal effect (Day 0 vs. Day 4 and Day 0 vs. Day 8) of each treatment (castrated, sham operated, urinary bladder damaged) on hormone levels; and (B) the difference between treatments (castrated vs. sham operated vs. urinary bladder damaged) at each sampling point (Day 0, Day 4, Day 8);

(2) behavioral data measured by instantaneous sampling (Day1-Day8) did not conform to the assumptions of parametric statistics and therefore non-parametric tests were used; main effect of treatment on the behavioral variables was tested using Kruskal-Wallis tests, followed by post-hoc Mann-Whitney tests to contrast each pair of treatments (i.e. sham vs. castration, sham vs. bladder damage, and castration vs. bladder damage);

(3) behavioural data measured by continuous recording (Day 9) fit parametric assumptions (except for % of time spent in display which was log transformed) and non-transformed raw data was used; a One-way ANOVA was used to test for the effect of treatment (castrated vs. sham operated vs. urinary bladder damaged) on aggressive behaviour towards a putative intruder male.

Outliers (diagnosed with Grubber's Test) were handled in two different ways (Cousineau and Chartier, 2010): (1) they were replaced by the mean of the group in the repeated measures ANOVA to avoid losing a whole case; (2) they were removed from the analysis in the non-parametric analysis and in the one-way ANOVAs.

Initial sample sizes were as follows: sham-operated males = 10; urinary bladder damaged males = 9, castrated males =9. However, sample size may vary across days because of the removal of outliers. One sample was lost during T analysis.

The effect of treatment on courtship and male aggression towards females was analysed by using the mean value of post-surgery behaviour (days 1-8). Presence of nest and nuptial coloration were analysed as % number over the period of days (for a total of 8 days) after surgery.

Two-tailed tests with a significance of $p < 0.05$ were used in all tests. All statistical analyses were performed using the software package Statistica v.7 (StatSoft Inc. 2004).

RESULTS

Effects of castration on steroid levels

There were significant main effects of both treatment (castrated vs. sham operated vs. urinary bladder damaged) and sampling period (day 0 vs. day 4 vs. day 8) on androgen levels (Table I, Fig 3A,B). There was also an interaction between treatment and sampling period (Table I). There were no differences in androgens levels (both T and KT) among the treatments before surgery (Day0). However, both at Day 4 and at Day 8 after surgery androgen levels were significantly lower in the castrated treatment than either in the sham operated or urinary bladder damaged treatments (Table I, Fig 3A,B). Similarly, androgen levels decreased with surgery in the castrated group, but not either in the sham operated or urinary bladder damaged groups (Table I, Fig 3A,B).

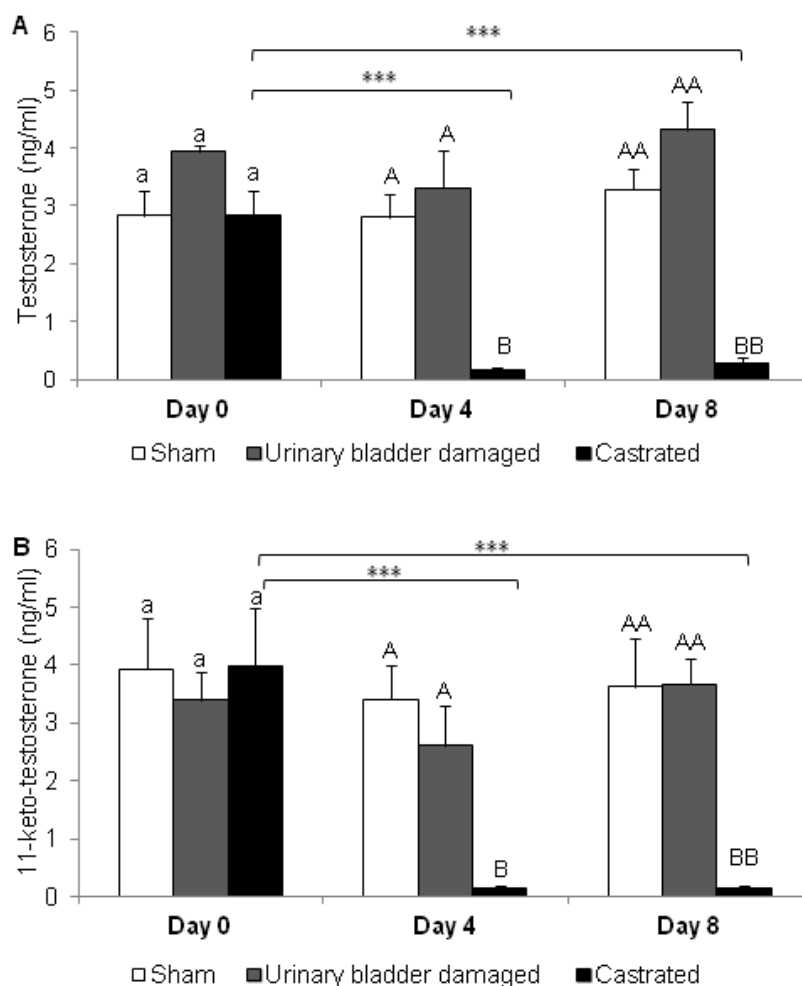


Fig. 3 - Blood plasma androgen levels in sham, urinary bladder damaged and castrated males at days 0, 4 and 8 (mean \pm standard error): (A) testosterone; (B) 11-ketotestosterone. Significant differences (planned comparisons, $P < 0.05$) between groups at each sampling point are marked with different letters. Significant differences in androgen levels between pre- and post- surgery sampling points (i.e. Day 0 vs. Day 4 and Day 0 vs. Day 8) are marked with an asterisk.

Table I - Repeated measures ANOVA analyses for androgen levels (testosterone, 11-ketotestosterone) using period of observation (Day 0 vs. Day 4 vs. Day 8) as a repeated factor and treatment (sham operated vs. urinary bladder damaged vs. castrated) as a categorical factor. Results from *a priori* planned comparisons are also presented.

ANOVA	Testosterone		11-ketotestosterone	
	F	p-value	F	p-value
Period	24.75	<0.001	21.30	<0.001
Treatment	44.17	<0.001	19.99	<0.001
Period*Treatment	22.08	<0.001	19.17	<0.001
Planned comparisons				
D0:SH-UBD	3.34	0.079	0.10	0.760
D0:SH-CA	0.28	0.603	0.09	0.765
D0:UBD-CA	1.61	0.216	0.00004	0.995
D4:SH-UBD	0.01	0.945	0.15	0.702
D4:SH-CA	60.16	<0.001	37.72	<0.001
D4:UBD-CA	58.18	<0.001	31.47	<0.001
D8:SH-UBD	1.27	0.271	0.59	0.452
D8:SH-CA	105.19	<0.001	74.55	<0.001
D8:UBD-CA	123.07	<0.001	83.92	<0.001
SH:D0-D4	0.16	0.696	0.01	0.929
SH:D0-D8	2.15	0.155	0.03	0.856
UBD:D0-D4	2.15	0.155	0.97	0.334
UBD:D0-D8	0.03	0.874	0.24	0.632
CA:D0-D4	91.90	<0.001	69.67	<0.001
CA:D0-D8	87.76	<0.001	75.43	<0.001

Abbreviations: Period = period of observation; SH = sham males; UBD = urinary bladder damaged males; CA = castrated males; D0 = Day 0; D4 = Day 4; D8 = Day 8.

Effects of castration on reproductive and aggressive behavior

A main effect of treatment was found on all reproductive behaviors: courtship, presence of nests, and nuptial coloration (Table II, Figs. 4). In contrast to sham or urinary bladder damaged males, courtship was never observed in castrated males. The frequency of courtship behavior did not differ between sham and urinary bladder damaged males (Table II, Fig. 4A). After surgery nest presence was observed on 65 % of the days for both sham and urinary bladder damaged males, but no nests were built by castrated males (Table II, fig. 4B). Among castrated males nuptial coloration was observed just once and for few seconds in one male in a single day. In contrast, nuptial coloration was often observed in males from the sham and urinary bladder damaged treatments (Table II, fig.4C).

Male aggression towards females was not significantly different across treatments (Table II; Fig 4D).

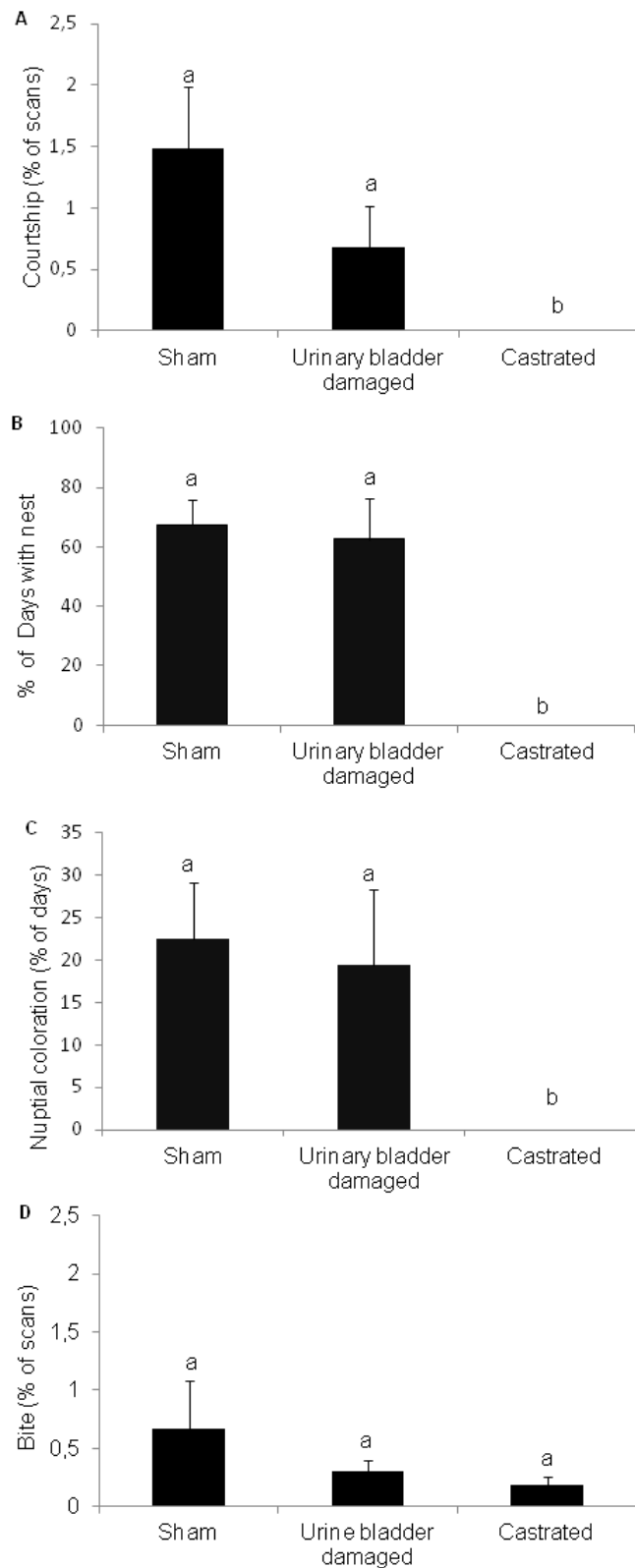


Fig.5 - Percentage of time (mean percentage of days 1 to 8 \pm SE) that males exhibited reproductive and aggressive behaviours towards females: (A) Courtship (sham n=10; urinary bladder damaged, n=8; castrated, n=9); (B) nest presence (sham n=10; urinary bladder damaged, n=9; castrated, n=9); (C) nuptial colouration (sham n=10; urinary bladder damaged, n=9; castrated, n=8); (D) aggression (sham n=9; urinary bladder damaged, n=8; castrated, n=9). Groups that differed significantly according to Mann-Whitney U tests are marked with different letters.

Table II - Kruskal-Wallis analyses for aggressive (bite) and reproductive behavior (courtship, nuptial coloration and nest presence) using as categorical variables: treatment (castrated, urinary bladder damaged and castrated) measured during day 1 to day 8. Planned comparisons using Mann Whitney U tests are also presented.

Kruskal-Wallis test	Aggressive behavior		Reproductive behavior					
	bite		courtship		coloration		nest presence	
	H	p-value	H	p-value	H	p-value	H	p-value
Treatment	0.54	0.763	11.81	<0.01	7.54	<0.05	15.29	<0.001

Mann Whitney U test	Aggressive behavior		courtship		coloration		nest presence	
	z-value	p-value	z-value	p-value	z-value	p-value	z-value	p-value
SH-UBD	0.22	0.825	1.20	0.230	0.52	0.60	0.000	1.00
SH-CA	0.18	0.86	2.90	<0.01	2.80	<0.01	3.63	<0.001
UBD-CA	0.75	0.45	2.12	<0.05	2.01	<0.05	-2.74	<0.01

Abbreviations: SH, sham males; UBD, urinary bladder damaged males; CA, castrated males.

Males of all treatments responded equally aggressively towards the neighboring male during the social challenge test on day 9 (frequency: bite, $F_{2,25} = 0.75$, $p = 0.481$, display, $F_{2,25} = 0.47$, $p = 0.629$; percent of time: display, $F_{2,25} = 0.56$, $p = 0.578$ Fig. 5). Three out of 10 sham males and 3 out of 9 urine bladder damaged males exhibited courtship towards the neighbor male, whereas castrated males never exhibited this behavior.

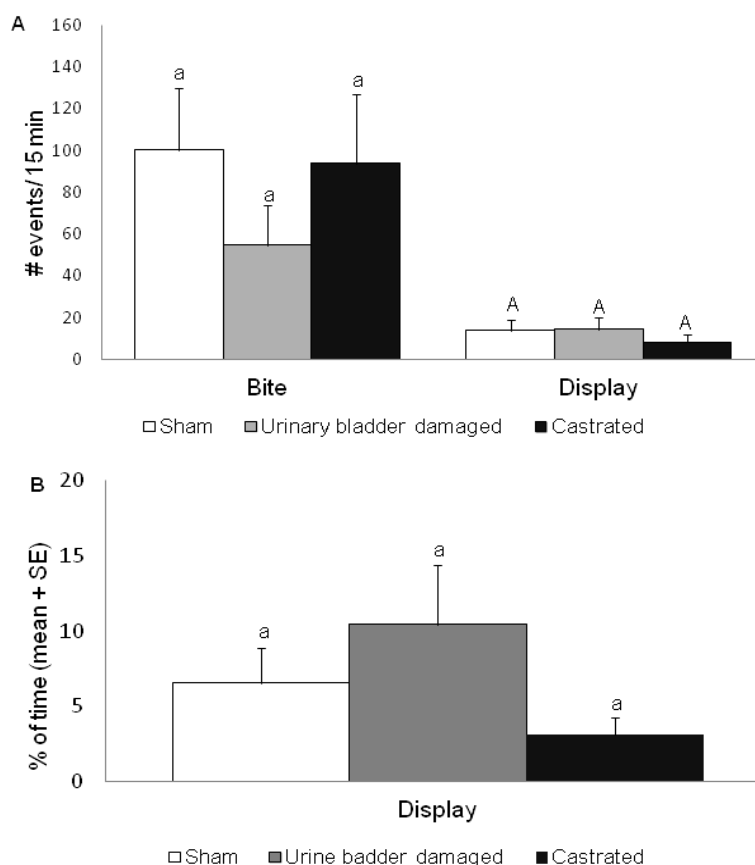


Fig. 5 - Frequency (A) and duration (B) of aggressive behaviours directed towards the neighbouring male during the social challenge at day 9 (mean number of events in 15 min \pm SE). Frequency: bite, sham n=10; urinary bladder damaged, n=9; castrated, n=9; displays, sham n=10; urinary bladder damaged, n=8; castrated, n=9. Percent of time of displays exhibition (sham n=10; urinary bladder damaged, n=8; castrated, n=9).

DISCUSSION

Castration in Mozambique tilapia decreased circulating levels of androgens in 90% for T and almost in 100% for KT (to below 100 pg/ml). Concomitantly, courtship behaviour, nest building and nuptial coloration were abolished in castrated males, whereas aggressive behavior was not significantly affected. The data from the urinary bladder males confirms the effect of castration on androgens since males from this treatment were similar to those of the sham operated group.

The reduction of androgen levels in castrated males has been previously demonstrated in many species and confirms role of the testis as the main source of androgens in tilapia. The extinction of the whole set of reproductive behaviors (i.e. nuptial colouration, nest building and courtship) in castrated males that experience a major reduction in circulating androgen levels further supports a key role for androgens produced in the testis in the linkage between gonadal maturation and the expression of reproductive behavior. The lack of effects of castration on aggressive behaviors apparently contrasts with previous studies in this species where circulating androgens have been shown to be correlated with dominant behavior (Oliveira et al. 1996) and to mediate experience-dependent effects on male competitive behavior (Oliveira et al. 2009). However, these apparently contradictory results can be explained by androgens playing either a mediator or a moderator role in the regulation of aggressive behavior, since only a mediator role would predict androgens to be necessary and sufficient. In other words the data presented here that demonstrates that androgens (T and KT, at least) are not necessary for the expression of aggressive behaviour do not rule out a moderator role for androgens on the expression of aggressive behaviors. This hypothesis needs further examination with castration followed by androgen replacement therapy. However, the variation in the effects of castration on aggressive behavior within the same species reported in the literature for individuals under different environmental conditions or reproductive state may provide some light. For example, in pre-nesting three-spined stickleback males, castration and consequently low androgen levels had no effect under short-days and increased aggression under long days (Hoar, 1962) whereas it decreased aggressive behavior in parental males (Baggerman, 1996, Wootton, 1970). Moreover, a meta-analysis on the effects of exogenous administration of androgens on reproductive and aggressive behaviors across vertebrates showed a wide variation in the magnitude of the effect, with larger effects on promiscuous and non-paternal species than on monogamous and paternal (Hirschenhauser and Oliveira, 2006). Altogether, these data support a moderator, rather than a mediator, role of androgens on the expression of aggressive behavior.

The fact that castration did not affect aggressive behaviour while abolishing reproductive behaviors also indicates a decoupling of the control mechanisms for the two types of behaviours, with the putative presence of independent reproductive and aggressive neural circuits, and a compartmentalization of the androgen effects on these two modules. This compartmentalization can be achieved for example by the differential expression of androgen receptors between the two modules, and allows for independent responses of the aggressive and the reproductive neural modules to the same circulating levels of androgens. This putative variation in target tissue androgen sensitivity provides a mechanism for independent evolution of reproductive and aggressive behaviours in this species. According to this hypothesis the two modules would escape the pleiotropic-like effects that would be imposed by a similar response to a shared endocrine signal, androgens in this case. This scenario conforms to the “evolutionary potential hypothesis”, that postulates that endocrine dependent traits have higher evolvability if selection acts on target tissue sensitivity than on circulating levels of the endocrine signal (Oliveira 2009).

CONCLUSIONS

In summary, it was demonstrated that androgens are necessary for the expression of reproductive behaviors but not for the expression of aggressive behaviour in male tilapia, suggesting a mediator role in the former case and a moderator role in the later. Future studies combining castration with the exogenous administration of different androgens are needed to further explore the moderator role of androgens on aggressive behaviour in this species.

Acknowledgments

The authors thank Elsa Couto for running the radioimmunoassays in the lab. This study was funded by the research grants PTDC/PSI/71811/2006 and PTDC/MAR/72117/2006 from Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT, Portugal; grant holder: R. Oliveira), the European Commission FEDER Program, and the FCT Pluriannual Program (R&D unit MAR-LVT-Lisboa-331; grant holder: R. Oliveira). During this project O. Almeida was being supported by a PhD fellowship from FCT (SFRH/BD/37187/2007).

REFERENCES

- Almeida, O.G., Miranda, A., Frade, P., Hubbard, P.C., Barata, E.N., Canário, A.V.M., 2005. Urine as a social signal in the mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Chem. Senses* 30 Suppl 1, i309–10.
- Baerends, G.P., Baerends-van Roon, J.M., 1950. An introduction to the study of the ethology of the cichlid fishes. *Behaviour Supplement*, 1–243.
- Baggerman, B., 1966. On the endocrine control of reproductive behaviour in the male three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.), in: *Symposia of the Society for Experimental Biology*. pp. 427–456.
- Balthazart, J., Ball, G.F., 1998. New insights into the regulation and function of brain estrogen synthase (aromatase). *Trends Neurosci.* 21, 243–249.
- Barata, E.N., Hubbard, P.C., Almeida, O.G., Miranda, A., Canário, A.V.M., 2007. Male urine signals social rank in the Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *BMC Biol* 5, 54.
- Cousineau, D., Chartier, S., 2010. Outliers detection and treatment : a review. *Int. J. Psychol.* 3, 58–67.
- Desjardins, J.K., Stiver, K.A., Fitzpatrick, J.L., Milligan, N., Kraak, G.J., Balshine, S., 2007. Sex and status in a cooperative breeding fish: behavior and androgens. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 62, 785–794.
- Fitzpatrick, J.L., 2005. Male reproductive suppression in the cooperatively breeding fish *Neolamprologus pulcher*. *Behav. Ecol.* 17, 25–33.
- Gonçalves, D., Oliveira, R., 2010. Hormones and sexual behavior of teleost fishes, in: Norris, D., Lopez, K. (Eds.), *Hormones and Reproduction of Vertebrates*. Academic Press, pp. 119–147.
- Hirschenhauser, K., Oliveira, R.F., 2006. Social modulation of androgens in male vertebrates: meta-analyses of the challenge hypothesis. *Anim. Behav.* 71, 265–277.
- Hirschenhauser, K., Taborsky, M., Oliveira, T., Canário, a. V.M., Oliveira, R.F., 2004. A test of the “challenge hypothesis” in cichlid fish: simulated partner and territory intruder experiments. *Anim. Behav.* 68, 741–750.
- Hoar, W.S., 1962. Hormones and the reproductive behaviour of the male Three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *Anim. Behav.* 10, 247–266.
- Kime, D.E., Manning, N.J., 1982. Seasonal patterns of free and conjugated androgens in the brown trout *Salmo trutta*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 48, 222–231.
- Martin, P., Bateson, P., 2007. *Measuring Behaviour: An Introductory Guide*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Nelson, R., 2005. *An introduction to behavioural endocrinology*, 3rd ed. Sunderland, MA: Sinauer.

- Oliveira, R., Almada, V.C., 1998. Androgenization of dominant males in a cichlid fish: androgens mediate the social modulation of sexually dimorphic traits. *Ethology* 104, 841–858.
- Oliveira, R.F., 2009. Social behavior in context: Hormonal modulation of behavioral plasticity and social competence. *Integr. Comp. Biol.* 49, 423–40.
- Oliveira, R.F., Almada, V.C., Canario, A.V.M., 1996. Social modulation of sex steroid concentrations in the urine of male cichlid fish *Oreochromis mossambicus*. *Horm. Behav.* 30, 2–12.
- Oliveira, R.F., Gonçalves, D.M., 2008. Hormones and social behaviour of teleost fish, in: Magnhagen, C., Braithwaite, V.A., Forsgren, E., Kapoor, B.G. (Eds.), *Fish Behaviour*. Science Publishers, Enfield, NH, pp. 61–150.
- Oliveira, R.F., Silva, A., Canário, A.V.M., 2009. Why do winners keep winning? Androgen mediation of winner but not loser effects in cichlid fish. *Proc. Biol. Sci.* 276, 2249–56.
- Pfaff, D.W., Kordon, C., Chanson, P., Christen, Y. (Eds.), 2008. *Hormones and Social Behaviour*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Taves, M.D., Desjardins, J.K., Mishra, S., Balshine, S., 2009. Androgens and dominance: sex-specific patterns in a highly social fish (*Neolamprologus pulcher*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 161, 202–7.
- Wong, M., Balshine, S., 2011. The evolution of cooperative breeding in the African cichlid fish, *Neolamprologus pulcher*. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 86, 511–30.
- Wootton, R.J., 1970. Aggression in the early phases of the reproductive cycle of the male three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *Anim. Behav.* 18, 740–746.

2- Níveis cerebrais de arginina vasotocina e isotocina em machos dominantes e subordinados

Artigo 3:



ABSTRACT

The nonapeptides arginine-vasotocin (AVT) and isotocin (IT), which are the teleost homologues of arginine-vasopressin and oxytocin in mammals, have well established peripheral effects on osmoregulation and stress response, and central effects on social behavior. However, all studies that have looked so far into the relationship between these nonapeptides and social behavior have used indirect measures of AVT/IT activity (i.e. immunohistochemistry of AVT/IT immunoreactive neurons, or AVT/IT or their receptors mRNA expression with in situ hybridization or qPCR) and therefore direct measures of peptide levels in relation to social behavior are still lacking. Here we use a recently developed high-performance liquid chromatography analysis with fluorescence detection (HPLC-FL) method to quantify the levels of both AVT and IT in macro-dissected brain areas [i.e. olfactory bulbs, telencephalon, diencephalon, optic tectum, cerebellum, and hindbrain (= rhombencephalon minus cerebellum) and pituitary of dominant and subordinate male cichlid fish (*Oreochromis mossambicus*). The pituitary shows higher levels of both peptides than any of the brain macroareas, and the olfactory bulbs have the highest AVT among all brain areas. Except for IT in the telencephalon there is a lack of correlations between central levels and

pituitary peptide levels, suggesting an independent control of hypophysial and CNS nonapeptide secretion. There were also no correlations between AVT and IT levels either for each brain region or for the pituitary gland, suggesting a decoupled activity of the AVT and IT systems at the CNS level. Subordinate AVT pituitary levels are significantly higher than those of dominants and dominant hindbrain IT levels are significantly higher than those of subordinates, suggesting a potential involvement of AVT in social stress in subordinate fish and of IT in the regulation of dominant behavior at the level of the hindbrain. Since in this species dominant males use urine to communicate social status and since AVT is known to have an antidiuretic effect, we have also investigated the effect of social status on urine storage. As predicted, dominant males stored significantly more urine than subordinates. Given these results we suggest that AVT/IT play a key role in orchestrating social phenotypes, acting both as central neuromodulators that promote behavioral plasticity and as peripheral hormones that promote integrated physiological changes.

Keywords: Fish, Tilapia, Vasotocin, AVT, Isotocin, Brain, Social status.

INTRODUCTION

The nonapeptides arginine–vasotocin (AVT) and isotocin (IT), which are the teleost homologues of the mammalian arginine–vasopressin (AVP) and oxytocin (OT), have both peripheral effects on osmoregulation, cardiovascular and stress responses and central effects on the regulation of social behavior (Balment et al., 2006; Goodson and Bass, 2001; Kulczykowska, 2007). In fish these nonapeptides are produced by neurons localized in the parvocellular and magnocellular nuclei of the preoptic area, that project both to the neurohypophysis, where AVT/IT are released in the systemic circulation, and to multiple extrahypothalamic regions, namely the ventral telencephalon, the thalamus and the mesencephalon (Goodson and Bass, 2001; Goodson et al., 2003; Holmqvist and Ekstrom, 1995; Thompson and Walton, 2009). The functionality of the wide extrahypothalamic projections is confirmed by the presence of AVT/IT receptors in most brain regions, in particular the AVT V1a receptor (Hausmann et al., 1995; Kline et al., 2011; Lema, 2010; Lema et al., 2010). Regarding the behavioral effects of nonapeptides AVT induces the expression of mating behavior in fish (e.g. Bastian et al., 2001; Carneiro et al., 2003; Pickford and Strecker, 1977; Salek et al., 2002; Semsar et al., 2001), and has effects on aggressive behavior that can be of opposite direction depending on the species. There are examples of AVT promoting (e.g. beaugregory damselfish, *Stegastes leucostictus*, Santangelo and Bass, 2006; multiband butterflyfish, *Chaetodon multicinctus*, Dewan and Tricas, 2011), decreasing (e.g. plainfin midshipman, *Porichthys notatus*, Goodson and Bass, 2000b; electric fish,

Apteronotus leptorhynchus, Bastian et al., 2001; Amargosa pupfish, *Cyprinodon nevadensis amargosae*, Lema and Nevitt, 2004) or having inconclusive effects (bluehead wrasse, Semsar et al., 2001). The effects of IT on social behavior have been less studied than those of AVT. Central infusions of IT stimulate social approach towards conspecifics in goldfish (*Carassius auratus*), whereas AVT inhibits it (Thompson and Walton, 2004), and modulates social vocalizations in females and non-territorial males of the plainfin midshipman (*P. notatus*), whereas AVT modulates the same vocalizations in territorial males (Goodson and Bass, 2000a). Given the effects of these neuropeptides on social behavior it is expected to find an association between different AVT/IT profiles and social phenotypes within the same species. For example, in species with alternative reproductive tactics, where two male morphs occur (bourgeois and parasitic males, sensu Taborsky, 1997) but only one of them expresses courtship behavior, there is an association between the expression of courtship behavior and forebrain AVT activity as measured by soma size or number of AVT-ir neurons or by AVT mRNA expression (for a review see Oliveira, 2006). AVT also correlates with social status in fish, but this relationship may differ depending on the AVT neuronal population. Territorial or dominant social status has been consistently associated with lower activity of parvocellular neurons and higher activity of gigantocellular neurons, as indicated either by smaller soma sizes or by smaller number of AVT-ir neurons or by lower mRNA expression (zebrafish, *Danio rerio*, Larson et al., 2006; African cichlid, *Astatotilapia burtoni*, Greenwood et al., 2008). Furthermore, in recent inter-specific studies comparing closely related butterflyfish species that differ in social organization (i.e. territoriality, level of aggressiveness, and mating system) it was found that territorial species have larger AVT-ir neurons in the POA and a higher density of AVT fibers in the telencephalon (Dewan et al., 2008), and that the density of AVT-ir varicosities within the ventral nucleus of the ventral telencephalon (the teleost homologue of the mammalian lateral septum, Wullimann and Mueller, 2004), is the strongest predictor of the social system (Dewan et al., 2011). In this respect it is relevant to point out that all studies that have looked into the relationship between neuropeptides and social phenotypes have used immunocytochemistry and/or in situ hybridization or qPCR and therefore have focused on measures of AVT-ir neuron morphology and mRNA expression and direct measures of peptide levels in different brain areas, where they are hypothesized to act as neuromodulators, in relation to social behavior are still lacking. Here we use a recently developed high-performance liquid chromatography analysis with fluorescence detection (HPLC-FL, Gozdowska and Kulczykowska, 2004; Gozdowska et al., 2006) method to quantify the levels of both AVT and IT in different brain areas and pituitary of dominant and subordinate male cichlid fish (*Oreochromis mossambicus*). Since in this species dominant males use urine to communicate social status (Almeida et al., 2005; Barata et al., 2007) and since AVT is known to have an antidiuretic effect in fish by

decreasing glomerular filtration rate (Amer and Brown, 1995; Balment et al., 1993), we have also tested the hypothesis that higher volumes of urine stored by dominant males are associated with lower levels of systemic AVT. Therefore, this study has the following specific aims:

- 1: to characterize the quantitative distribution of AVT and IT in different brain regions and in the pituitary;
- 2: to compare the quantitative levels of AVT and IT in the different brain regions and pituitary in males of different social status that exhibit different social behavior phenotypes;
- 3: to investigate if the hypophysial and extrahypothalamic levels of AVT and IT are coupled or not;
- 4: to assess if stress levels, as measured by circulating cortisol, are correlated with hypophysial levels of AVT;
- 5: to investigate the association between peripheral levels of AVT, as measured by the concentration of AVT in the pituitary, and urine storage in males of different social status.

MATERIALS AND METHODS

Social phenotypes in Mozambique tilapia males

The Mozambique tilapia is an African cichlid fish where two male phenotypes can be recognized (Oliveira and Almada, 1998). Dominant males form dense aggregations of breeding territories in shallowwaters. They adopt a dark coloration, dig and defend spawning pits, and actively court females (Baerends and Baerends van Roon, 1950; Neil, 1964). Subordinate non-territorial males maintain a pale silver coloration similar to that of females and when courted by dominant males performed the full female sexual behavior, including following the courting male to the spawning pit, assuming a pivot position in the nest while the territorial male circles them, and performing chewing movements close to the genital papillae of the courting male (Oliveira and Almada, 1998). By adopting this female-mimicking behavior non-territorial males are able to remain inside the breeding aggregations and when spawning episodes occur they intrude in the spawning pits trying to achieve sneaking fertilizations (Oliveira and Almada, 1998). Non-territorial males can also rapidly become territorial when social opportunities appear (Oliveira and Almada, 1996a, 1996b). Females live in shoals and visit the breeding aggregations when they are ready to spawn. Spawning takes place in the pit and the female quickly takes eggs and sperm into her mouth where fertilization takes place (Baerends and Baerends van Roon, 1950; Neil, 1964). Females then leave the breeding area and mouthbrooding of eggs and fry is exclusively provided by the females (Bruton and Bolt, 1975; Fryer and Iles, 1972).

Animals and housing

The tilapia males used in this study were part of a stock held at ISPA—Instituto Universitário (Lisboa, Portugal) that is maintained in glass tanks (120×40×50 cm, 240 L) with a fine gravel substrate, in stable social groups of 4 males and 5 females per tank. Tanks are supplied with a double filtering system (sand and external biofilter, Eheim) and constant aeration. Water quality is monitored on a weekly basis for nitrites (0.2–0.5 ppm), ammonia (b0.5 ppm) (Pallintest kit®) and pH (6.0–6.2). Fish are kept at a temperature of 26±2 °C and a 12L:12D photoperiod, and are fed with commercial cichlid floating and sinking sticks. The social status of the males on each tank is monitored on a daily basis, based on the body coloration and on the possession of a spawning pit on the substrate (Oliveira and Almada, 1996a).

Experimental protocol

Sixteen animals [8 dominants and 8 subordinates; body mass (mean±S.E.M.): dominants=89.6±17.4 g, subordinates=73.1± 12.8 g; T-test: $t=0.741$, $p=0.47$] were collected from the stock tanks containing stable groups (i.e. groups that had been established between 5 and 8 weeks prior to sampling; typically each tank houses 2 dominant males, 2 subordinate males and 5 females), quickly anesthetised (MS-222, Pharmaq; 300–400 ppm) and blood samples were taken from the caudal vein (using 1 ml syringes with 25 G/16 mm needles). Blood sampling always took less than 4 min since the induction of anesthesia to prevent possible effects of handling stress on sampled cortisol levels (Foo and Lam, 1993). Blood sample were centrifuged and the plasma was stored at -20 °C until further processing. After blood sampling fish were returned to the anesthesia solution until muscular and opercular movements completely stop, afterwhich they were sacrificed by decapitation. The brain and pituitary gland were then extracted from the cranial cavity and dissected into the following major brain areas¹: olfactory bulbs (OB), telencephalon (TL), optic tectum (TO), cerebellum (CB), hindbrain (= rhombencephalon minus cerebellum) (HB), diencephalon (DE) and pituitary gland (PT). The major brain areas were immediately frozen in dry ice and stored at -80 °C until subsequent analysis. A second set of 16 males (8 dominants and 8 subordinates) was used for the collection of urine samples. Urine was collected by gently squeezing the abdomen immediately above and anterior to the genital papilla, following the procedure described by Oliveira et al. (1996). Animal procedures used in this study have

¹ Ver representação das macro-áreas em fotografia- Anexo 1

been approved by the Portuguese Veterinary Office (Direcção Geral de Veterinária, license # 0420/000/000/2007).

Quantification of nonapeptides by high performance liquid chromatography with fluorescence detection (HPLC-FL). A recently described method of nonapeptide quantification using HPLC-FL (Gozdowska and Kulczykowska, 2004) that has been proven to be efficient in brain and pituitary tissue of other fish species (Gozdowska et al., 2006; Kleszczyńska et al., 2006, 2007) was used. In brief the procedure consisted of the following. Brain samples were weighted, individually homogenized (using ultrasonic cell disruptor) in 1 mL distilled water, acidified with acetic acid (10 μ L), and placed in a boiling water bath for 3.5 min. The extracts were then centrifuged (20,000 g, 20 min, 4 °C) and the supernatants were decanted and loaded into solid phase extraction (SPE) columns (Baker Bond, C18, 20 mg 1 mL, pore size 60 Å, particle diameter 40 μ m), that had been pre-conditioned with three portions of methanol followed by three portions of Millipore water (each of 1 mL). The Baker SPE 12 G Column Processor (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA), a specially designed vacuum manifold capable of processing simultaneously up to 12 SPE columns, was used for solid phase extraction. To purify the samples the columns were washed successively by 1 mL of 5% CH₃COOH, followed by 1 mL ultra pure water and finally by 1 mL of 5% methanol. The derivatization (cf. Gozdowska and Kulczykowska, 2004) was performed using 10 μ L NBD-F (4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole: 30 mg/mL acetonitrile) in 90 μ L borate buffer (pH 9.5) for 20 min at room temperature. After washing by-products with 0.5 mL water and 0.5 mL methanol (10%), the peptides were eluted with a 2 mL mixture of ethanol:HCl (2000:1). The eluate was collected, dried under air and stored at -80 °C until further processing. HPLC analyses were performed with the Beckman Instruments (San Ramon, CA, USA) connected with a spectrofluorometric detector RF-551 (Shimadzu, Columbia, MD). Chromatographic separation of peptides was accomplished on an Ultrasphere ODS column (250×4.6 mm I.D., 5 μ m particles diameter) preceded by a pre-column (45×4.6 mm I.D.) filled with the same material and both obtained from Beckman Instruments. A linear gradient system was employed for the separation of derivatized hormones consisting of 48–80% of solvent B (0.1% TFA in acetonitrile–water, 3:1) in solvent A (0.1% TFA in water) for 20 min. The column temperature was 22 °C and the flow rate 1 mL/min. Fluorescence detection was carried out at 530 nm with excitation at 470 nm. The two peptides were analyzed simultaneously in every sample and data expressed as pmol of peptide per tissue weight (mg).

Quantification of cortisol levels by radioimmunoassay

Free cortisol was extracted from plasma samples by adding diethyl-ether to the samples, centrifuging the mix (3000 rpm, 10 min, 4 °C) and subsequently freezing it (10 min, -80 °C) in order to separate the ether fraction (containing the free cortisol)

from the aqueous one, which was then evaporated and the steroids were re-suspended in phosphate buffer. Cortisol concentrations were measured by radioimmunoassay, using a commercial antibody (Cortisol-32, ref. 20-CR50, Interchim/Fitzgerald, Montluçon, France) and a reactive marker ([1,2,6,7-3H] Cortisol, ref. TRK407-250 mCi, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA). Inter- and intra-assay variabilities were 5.7% and 5.2% respectively.

Data analysis

Variables conform to parametric parameters (normality and homogeneity of variances as assessed by Levene's test) and therefore no transformations were performed. A repeated measures ANOVA (repeated factor: brain macroareas with 7 levels, one for each area; independent factor: male status with 2 levels, dominant vs. subordinate status) was used to investigate the main effects and the interaction between brain area and social status on AVT and IT levels, followed by the Tukey post-hoc tests for unequal sample sizes to assess the effects of brain area and of social status per se. Although we have sampled 8 dominant and 8 subordinate males, sample sizes may vary across different brain areas because some samples were lost during different phases of processing. We have also removed one AVT data point from HB that was identified as an outlier (i.e. value over 3 standard deviations) and another from DE that failed to show an AVT peak. T-tests were used to compare AVT and IT levels for each brain area, as well as circulating cortisol levels, between dominant and subordinate males. Pearson correlations were used to assess the association between AVT and IT levels across different brain areas, and between pituitary AVT and circulating cortisol levels. All statistical analyses were performed using the software package STATISTICA v.10 (StatSoft, Inc., 2011).

RESULTS

There is a significant main effect of brain area but not of social status on the brain concentrations of both AVT (repeated measures ANOVA, brain areamain effect: $F_{6,24}=56,34$, $p<0.0001$; social status main effect: $F_{1,4}=2,81$, $p=0.17$) and IT (repeated measures ANOVA, brain area main effect: $F_{6,30}=187$, $p<0.0001$; social status main effect: $F_{1,5}=1,86$, $p=0.23$). The post-hoc analyses reveal that AVT levels are significantly higher in the pituitary, followed by

the olfactory bulbs that also have significantly higher levels than the rest of the brain areas (see Fig. 1A), and that IT levels are significantly higher in the pituitary than in any of the brain areas (see Fig. 1B). There is also a significant interaction between the 2 main factors (i.e. brain area and social status) both for AVT ($F_{6,24}=3,60$, $p<0.05$) and for IT ($F_{6,30}=2,84$, $p<0.05$), suggesting that the effect of social status on nonapeptide levels is not homogeneous across all brain areas. Contrast analysis of AVT and IT levels of an area by area basis revealed that AVT levels are significantly higher in subordinate males in the pituitary gland (t-test: $T=-3.219$, $p<0.01$), and that IT levels are significantly higher in dominants in the rombencephalon (t-test: $T=-3.146$, $p<0.01$).

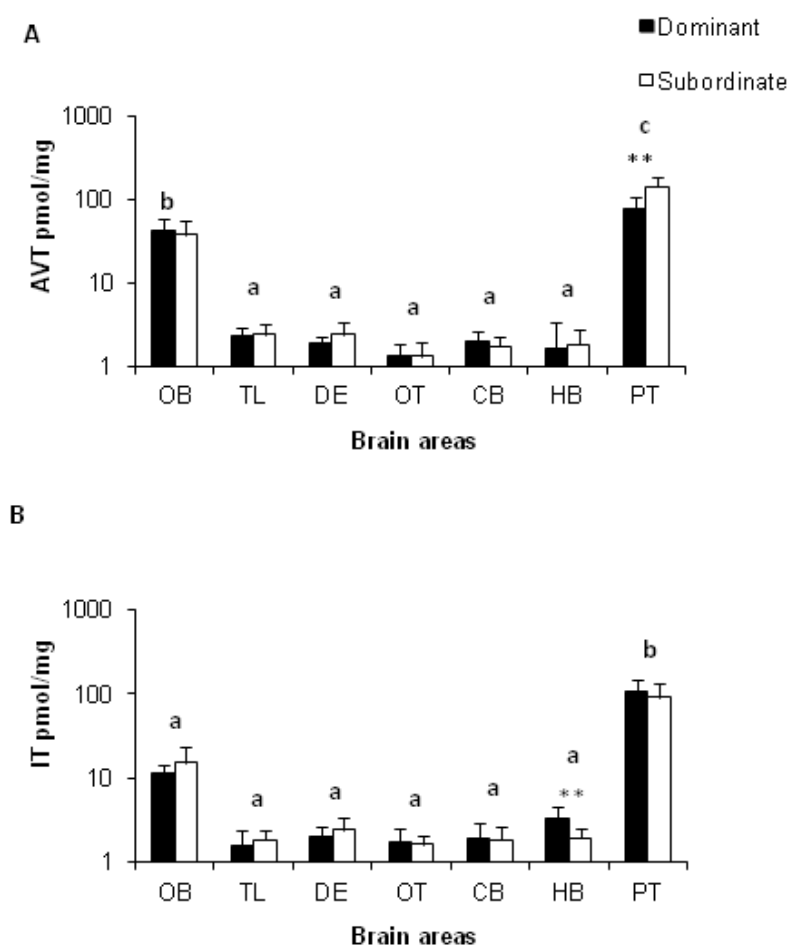


Fig. 1 - Arginine vasotocin (**A**) and isotocin (**B**) brain area levels (Mean+SD) in dominants (filled bars) and subordinates (open bars) of *O. mossambicus*. Brain areas (sample size for dominants, sample size for subordinates): OB, olfactory bulbs (4, 4); TL, telencephalon (8, 8); DE, diencephalon (6, 8 for AVT; 7, 8 for IT); OT, optic tectum (7, 8); CB, cerebellum (8, 8); HB, hindbrain (8, 7 for AVT; 8, 8 for IT) and PT, pituitary (8, 6). Significant correlations are marked with ** for $p<0.01$.

Correlations in nonapeptide levels between the pituitary and different brain areas are mostly absent (Table 1). Only IT levels in the telencephalon are negatively correlated with IT pituitary levels, suggesting that overall the peripheral and the central secretions of these

nonapeptides are independent from each other. AVT and IT levels were not correlated neither within each brain area (OB: $r=-0.059$, $N=8$, $p=0.89$; TL: $r=-0.304$, $N=16$, $p=0.253$; DE: $r=-0.158$, $N=14$, $p=0.589$; OT: $r=0.436$, $N=15$, $p=0.104$; CB: $r=-0.407$, $N=16$, $p=0.117$; RB: $r=0.336$, $N=15$, $p=0.221$) nor in the pituitary ($r=-0.1273$, $N=14$, $p=0.664$).

Table 1-Correlations of AVT (below the diagonal) and IT (above the diagonal) levels between the different brain areas (olfactory bulbs, OB; telencephalon, TL; optic tectum, OT; cerebellum, CB; hindbrain, HB; diencephalon, DE) and pituitary gland (PT); sample sizes are given between brackets; significant correlations are highlighted in bold marked with * for $p<0.05$ and with ** for $p<0.01$.

	OB	TL	OT	CB	HB	DE	PT
OB	-	0.548 (8)	-0.177 (8)	0.004 (8)	-0.396 (8)	-0.129 (8)	0.084 (7)
TL	0.500 (8)	-	-0.044 (15)	0.154 (16)	-0.174 (16)	0.306 (15)	-0.703** (14)
OT	-0.423 (8)	0.058 (15)	-	-0.132 (15)	0.430 (15)	0.239 (15)	-0.107 (13)
CB	-0.229 (8)	0.338 (16)	0.532* (15)	-	-0.573* (16)	0.400 (15)	-0.449 (14)
HB	0.319 (8)	-0.154 (15)	0.183 (14)	-0.021 (15)	-	-0.391 (15)	0.399 (14)
DE	0.177 (7)	0.453 (14)	0.044 (14)	0.293 (14)	0.247 (13)	-	-0.252 (13)
PT	-0.033 (7)	-0.121 (14)	0.466 (13)	-0.182 (14)	0.432 (14)	0.340 (12)	-

There are no differences in cortisol levels between dominant and subordinate males (mean±S.E.M.: dominants=29.4±5.7 ng/mL, subordinates=43.3±7.4 ng/mL; t-test: $t=-1.50$, d.f.=14, $p=0.157$) and there are no significant correlations between plasma cortisol levels and AVT or IT peptide levels in the pituitary (AVT, $r=0.245$, $n=14$, $p=0.40$; IT, $r=0.12$, $n=14$, $p=0.68$). Dominant males store more urine than subordinates (t-test: $T=3.453$, $p<0.01$; Fig. 2).

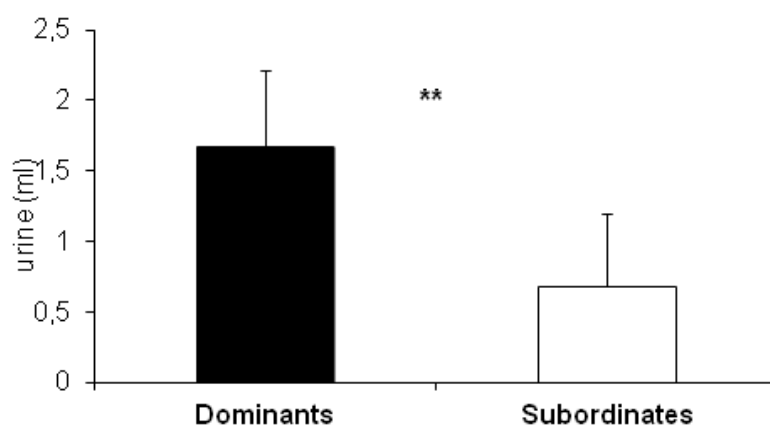


Fig. 2. Volume of urine (Mean±SD) stored by dominants (N=8) and subordinates(N=8) males of *O. mossambicus*. ** $p<0.01$.

DISCUSSION

The results presented here indicate that AVT and IT levels are much higher in the pituitary gland than in any of the major brain areas which support the main role of these nonapeptides as peripheral hormones that promote integrated physiological changes. However, both AVT and IT are also present in quantifiable levels in all major brain areas, therefore confirming the ubiquitous presence of these neuropeptides in the teleost fish brain as suggested by previous ICC and ISH studies (Dewan and Tricas, 2011; Dewan et al., 2008, 2011; Goodson and Bass, 2001; Goodson et al., 2003; Holmqvist and Ekstrom, 1995; Saito et al., 2004; Thompson and Walton, 2009) and supporting their role as central neuromodulators (Goodson, 2008; Goodson and Thompson, 2010). In this respect it is particularly interesting the finding of significantly high levels of AVT in the olfactory bulbs, which was by far the brain region with the highest concentration of this peptide. In rodents AVP plays an important role in the modulation of olfactory-based social recognition, an effect mainly regulated by the lateral septum (for a comprehensive review see McEwen, 2004). More recently, new populations of AVP neurons have been identified both intrinsically in the olfactory bulbs and in the anterior olfactory nucleus of the rat cortex (Tobin et al., 2010; Wacker et al., 2010), and the expression of AVP receptors has also been described for these two regions (e.g. V1a receptors in granular cells and V1b receptors in mitral cells of the main olfactory bulbs; see Wacker et al., 2011 for a review). Finally, the role of AVP modulation in the olfactory bulbs is confirmed by the negative effect on social memory retention induced by the infusion of a V1 receptor antagonist or by genetically ablating AVP neurons in the main olfactory bulbs (Tobin et al., 2010). Thus, AVP acting at the level of the olfactory bulbs facilitates short-term social odor memory in rodents.

In fish olfaction also plays a major role in intra-specific communication (Stacey and Sorensen, 2002), including social recognition (Gerlach et al., 2008). Although an AVT neuronal population has never been described in the olfactory bulbs of teleosts, V1a receptors have been identified in this area (Kline et al., 2011), which together with the high AVT peptide levels reported here, suggest a role for AVT in the processing of olfactory stimuli in fish. The Mozambique tilapia may prove to be an excellent model species for investigating the AVT modulation of olfactory-based social communication in fish, since urine-borne compounds are actively used both in agonistic male–male interactions and during courtship in this species (Almeida et al., 2005; Barata et al., 2007; Frade et al., 2002). Males store urine in the bladder and, by controlling a sphincter in the urogenital papilla, are able to release it in a pulsating way. The rate of urination has been shown to be higher in the

presence of a pre-ovulated female in contrast of a post ovulated female, demonstrating that males are able to assess the reproductive status of the female and alter their behavior accordingly (Almeida et al., 2005). Males also release short duration (ca. 1 s) pulses of urine during the assessment phase of male–male aggressive interactions, but only dominants keep on releasing urine after a clear dominance relationship is established (Barata et al., 2007). Moreover, urine from dominant males has a higher olfactory potency (as measured by an electrofactogram assay) than that of subordinates (Barata et al., 2007). Thus, the high concentrations of AVT in the olfactory bulbs of tilapia might be related with olfactory memories that may provide information on female reproductive status and on male social status.

The fact that urine is stored and used as a vehicle for chemical communication in tilapia also raises the hypothesis that AVT may be coupling the processing of chemical information at the level of the CNS with the production of the chemical signal through its antidiuretic effects in the kidney. In contrast to its predominant tubular effects in mammals, the antidiuretic effect of AVT in fish is achieved by decreasing glomerular filtration rates which results in an increase in water reabsorption and a decrease in urine flow (Amer and Brown, 1995; Konno et al., 2010; Warne et al., 2002). As a first investigation of this hypothesis we collected data on volumes of urine stored by dominant and subordinate males. In accordance to our hypothesis, dominant males that have lower pituitary concentrations of AVT than subordinates, suggesting also lower levels of peripheral AVT (assuming is released shortly after it is produced), exhibited higher volumes of stored urine. This result confirms previously published data on differential urine storage by dominant vs. subordinate males of this species (Barata et al., 2007).

At the brain level differences between dominant and subordinate males were only found for IT levels in the hindbrain. Actions of nonapeptides in the hindbrain have been reported both in relation to autonomic output and in relation to motor control centers involved in species-specific behaviors. For example, in goldfish the basic approach–withdrawal tendency towards a conspecific is regulated by AVT (negative effect) and IT (positive effect) (Thompson and Walton, 2004). Recently, the effect of AVT has been shown to be located in the hindbrain with infusions at the level of the 4th ventricle being more effective than those at the level of the 3rd ventricle, and to rely on a peripheral feedback mechanism that involves an interaction between AVT and substance P neurons in the rhombencephalon (Thompson et al., 2008). Although, no data is yet available for the effects of IT on the hindbrain it is possible that its behavioral effects described above are also acting at this level, in which case our results may suggest a higher tendency of dominant males to engage in social

interactions. It could also be argued that the differences observed between dominants and subordinates on IT hindbrain levels are due to differences in activity levels between these social phenotypes. However, previous studies on this species have shown no significant differences in activity levels between individuals of different social status (Oliveira, 1995).

At the level of the pituitary subordinate males had higher AVT levels than dominants, which could be interpreted as a potential effect of social stress on the activation of the hypophysial AVT secretion. However, and despite the established role of AVT in the stress response by acting synergistically with corticotrophin releasing hormone (CRH) as an adrenocorticotropin (ACTH) secretagogue in the hypothalamic pituitary inter-renal (HPI) axis (Baker et al., 1996), we found no significant correlation between AVT pituitary levels and circulating cortisol concentrations. We also found no differences in cortisol levels between dominant and subordinate males. Given the fact that the males used in this study were taken from stable social groups with their status being stable for over 5 to 8 weeks, it is possible that the HPA axis has habituated to social challenges and that hormone levels have become uncoupled from social behavior. Indeed, the observed higher glucocorticoid levels observed in subordinate individuals in experimental paradigms is in many cases an acute effect that is not detected when assessing the relationship between social status and basal glucocorticoid levels in stable social groups (Abbott et al., 2003; Creel, 2001). A dissociation between AVT and CRH and cortisol responses to stress has already been reported for other fish species (e.g. Backström et al., 2011), and so it could be postulated that, contrary to the CRH-cortisol system, AVT maintains a heightened response to chronic social stress in subordinate fish. However, other studies have also demonstrated a habituation of the parvocellular AVT response to chronic stress (Gilchrist et al., 2000). Thus, further research is needed to clarify this point.

The lack of correlations between pituitary and (most) brain region levels of each nonapeptide (only exception is for IT in the telencephalon) suggests an independent secretion of each of these peptides through their hypophysial and extrahypothalamic projections. These results contrast with structural data that suggests a coupling of the two systems. Two mechanisms have been described that suggest the coordinated control of neurohypophysial and central outputs of the nonapeptidergic systems. First, both AVT and IT neurons cluster together forming celltype-specific networks with synchronized electric activity (Cumming et al., 1982; Saito and Urano, 2001; Saito et al., 2004). Second, a study in rainbow trout, where projections from single cells were stained with biocytin, revealed that single AVT and IT cells have multiple projections both towards the pituitary and the extrahypothalamic regions (Saito et al., 2004). The apparent contradiction between our results and the above mentioned

evidence for a coupling between the central and peripheral nonapeptide system, can be solved if one considers that the mechanism of dendritic neuropeptide release recently described for rodents is also present in fish. In rats, magnocellular neurons can release significant amounts of vasopressin or oxytocin from their dendrites as well as from their axons, but not necessarily under the same conditions (Ludwig and Leng, 2006). This might be happening in fish as well and could explain the lack of correlation between central and peripheral levels.

There were also no correlations between AVT and IT neither for each of the brain regions nor for the pituitary, suggesting an independent secretion of these two peptides. These results are in accordance with previously published work. AVT and IT diurnal variation in Seabream (*Sparus aurata*) and juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*), and the seasonal fluctuations in three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*) are independent from each other suggesting that each peptide plays a different role in a circadian time-keeping system and an endocrine calendar in fish (Gozdowska et al., 2006). Moreover, in rainbow trout a lack of correlation of periodic Ca²⁺ pulses between AVT and IT neurons also suggests that these two neuronal groups function independently from each other (Saito and Urano, 2001).

In summary, the results presented here highlight the importance of collecting information on peptide levels to complement the structural and electrophysiological information when investigating the role of nonapeptides on social behavior.

Acknowledgments

This study was funded by the research grants PTDC/PSI/71811/2006 and PTDC/MAR/72117/2006 from Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT, Portugal; grant holder: R. Oliveira), the European Commission FEDER Program, and the FCT Pluriannual Program (R&D unitMAR-LVT-Lisboa-331; grant holder: R.Oliveira). During this project O. Almeida was being supported by a PhD fellowship from FCT (SFRH/BD/37187/2007), and received a travel grant from the COST Action 867 (STSM-867-3002) of the European Science Foundation for a short term visit to the lab of Prof. Kulczykowska in Poland. Peptide analyses were supported by the research grant 568/N-COST from Institute of Oceanology PAS (grant holder: E. Kulczykowska).

REFERENCES

- Abbott, D.H., Keverne, E.B., Bercovitch, F.B., Shively, C.A., Mendoza, S.P., Saltzman, W., Snowdon, C.T., Ziegler, T.E., Banjevic, M., Garland Jr., T., Sapolsky, R.M., 2003. Are subordinates always stressed? A comparative analysis of rank differences in cortisol levels among primates. *Horm. Behav.* 43, 67–82.
- Almeida, O.G., Miranda, A., Frade, P., Hubbard, P.C., Barata, E.N., Canário, A.V.M., 2005. Urine as a social signal in the Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Chem. Senses* 30, 309–310.
- Amer, S., Brown, J.A., 1995. Glomerular actions of arginine vasotocin in the in situ perfused trout kidney. *Am. J. Physiol.* 269 (4 Pt 2), R775–R780.
- Backström, T., Schjolden, J., Øverli, Ø., Thörnqvist, P.O., Winberg, S., 2011. Stress effects on AVT and CRF systems in two strains of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) divergent in stress responsiveness. *Horm. Behav.* 59, 180–186.
- Baerends, G.P., Baerends van Roon, J.M., 1950. An introduction to the ethology of cichlid fishes. *Behaviour Suppl.* 1, 1–242.
- Baker, B.I., Bird, D.J., Buckingham, J.C., 1996. In the trout, CRH and AVT synergize to stimulate ACTH release. *Regul. Pept.* 67, 207–210.
- Balment, R.J., Warne, J.M., Tierney, M., Hazon, N., 1993. Arginine vasotocin and fish osmoregulation. *Fish Physiol. Biochem.* 11, 189–194.
- Balment, R.J., Lu, W., Weybourne, E., Warne, J.M., 2006. Arginine vasotocin a key hormone in Wsh physiology and behaviour: a review with insights from mammalian models. *Gen. Comp. Endocrinol.* 147, 9–16.
- Barata, E.N., Hubbard, P.C., Almeida, O.G., Miranda, A., Canário, A.V.M., 2007. Male urine signals social rank in Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*, Peters 1852). *BMC Biol.* 5, 54.
- Bastian, J., Schniederjan, S., Nguyenkim, J., 2001. Arginine vasotocin modulates a sexually dimorphic communication behavior in the weakly electric fish *Apteronotus leptorhynchus*. *J. Exp. Biol.* 204, 1909–1923.
- Bruton, M.N., Boltt, R.E., 1975. Aspects of the biology of *Tilapia mossambica* Peters (Pisces:Cichlidae) in a natural freshwater lake (Lake Sibaya, South Africa). *J. Fish Biol.* 7, 423–446.
- Carneiro, L.A., Oliveira, R.F., Canário, A.V.M., Grober, M.S., 2003. The effect of arginine vasotocin on courtship behaviour in a blennioid fish with alternative reproductive tactics. *Fish Physiol. Biochem.* 28, 241–243.
- Creel, S., 2001. Social dominance and stress hormones. *Trends Ecol. Evol.* 16, 491–497.
- Cumming, R., Reaves Jr., T.A., Hayward, J.N., 1982. Ultrastructural immunocytochemical characterization of isotocin, vasotocin and neurophysin neurons in the magnocellular preoptic nucleus of the goldfish. *Cell Tissue Res.* 223, 685–694.

- Dewan, A.K., Tricas, T.C., 2011. Arginine vasotocin neuronal phenotypes and their relationship to aggressive behavior in the territorial monogamous multiband butterflyfish, *Chaetodon multicinctus*. *Brain Res.* 1401, 74–84.
- Dewan, A.K., Maruska, K.P., Tricas, T.C., 2008. Arginine vasotocin neuronal phenotypes among congeneric territorial and shoaling reef butterflyfishes: species, sex and reproductive season comparisons. *J. Neuroendocrinol.* 20, 1382–1394.
- Dewan, A.K., Ramey, M.L., Tricas, T.C., 2011. Arginine vasotocin neuronal phenotypes, telencephalic fiber varicosities, and social behavior in butterflyfishes (*Chaetodontidae*): potential similarities to birds and mammals. *Horm. Behav.* 59, 56–66.
- Foo, J.T.W., Lam, T.J., 1993. Serum cortisol response to handling stress and the effect of cortisol implantation on testosterone level in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Aquaculture* 115, 145–158.
- Frade, P., Hubbard, P.C., Barata, E.N., Canário, A.V.M., 2002. Olfactory sensitivity of the Mozambique tilapia to conspecific odours. *J. Fish Biol.* 61, 1239–1254.
- Fryer, G., Iles, T.D., 1972. *The Cichlid Fishes of the Great Lakes of Africa—Their Biology and Evolution*. Oliver and Boyd, Edinburgh.
- Gerlach, G., Hodgins-Davis, A., Avolio, C., Schunter, C., 2008. Kin recognition in zebrafish: a 24-hour window for olfactory imprinting. *Proc. Biol. Sci.* 275, 2165–2170.
- Gilchrist, B.J., Tipping, D.R., Hake, L., Levy, A., Baker, B.I., 2000. The effects of acute and chronic stresses on vasotocin gene transcripts in the brain of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Neuroendocrinol.* 12, 795–801.
- Goodson, J.L., 2008. Nonapeptides and the evolutionary patterning of sociality. *Prog. Brain Res.* 170, 3–15.
- Goodson, J.L., Bass, A.H., 2000a. Forebrain peptides modulate sexually polymorphic vocal circuitry. *Nature* 403, 769–772.
- Goodson, J.L., Bass, A.H., 2000b. Vasotocin innervation and modulation of vocal-acoustic circuitry in the teleost *Porichthys notatus*. *J. Comp. Neurol.* 422, 363–379.
- Goodson, J.L., Bass, A.H., 2001. Social behavior functions and related anatomical characteristics of vasotocin/ vasopressin systems in vertebrates. *Brain Res. Rev.* 35, 246–265.
- Goodson, J.L., Thompson, R.R., 2010. Nonapeptide mechanisms of social cognition, behavior and species-specific social systems. *Curr. Opin. Neurobiol.* 20, 784–794.
- Goodson, J.L., Evans, A.K., Bass, A.H., 2003. Putative isotocin distributions in sonic fish: relation to vasotocin and vocal-acoustic circuitry. *J. Comp. Neurol.* 462, 1–14.
- Gozdowska, M., Kulczykowska, E., 2004. Determination of arginine–vasotocin and isotocin in fish plasma with solid-phase extraction and fluorescence derivatization followed by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B* 807, 229–233.
- Gozdowska, M., Kleszczyńska, A., Sokołowska, E., Kulczykowska, E., 2006. Arginine vasotocin (AVT) and isotocin (IT) in fish brain: diurnal and seasonal variations. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 143, 330–334.

Greenwood, A.K., Wark, A.R., Fernald, R.D., Hofmann, H.A., 2008. Expression of arginine vasotocin in distinct preoptic regions is associated with dominant and subordinate behaviour in an African cichlid fish. *Proc. Biol. Sci.* 275, 2393–2402.

Hausmann, H., Meyerhof, W., Zwiers, H., Lederis, K., Richter, D., 1995. Teleost isotocin receptor: structure, functional expression, mRNA distribution and phylogeny. *FEBS Lett.* 370, 227–230.

Holmqvist, B.I., Ekstrom, P., 1995. Hypophysiotrophic systems in the brain of the Atlantic salmon. Neuronal innervation of the pituitary and the origin of pituitary dopamine and nonapeptides identified by means of combined carbocyanine tract tracing and immunocytochemistry. *J. Chem. Neuroanat.* 8, 125–145.

Kleszczyńska, A., Vargas-Chacoff, L., Gozdowska, M., Kalamarz, H., Martínez-Rodríguez, G., Mancera, J.M., Kulczykowska, E., 2006. Arginine vasotocin, isotocin and melatonin responses following acclimation of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) to different environmental salinities. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 145, 268–273.

Kleszczyńska, A., Dumont, E., Cornelis, R., Gozdowska, M., Kulczykowska, E., Sandra, P., 2007. Determination of the neuropeptides arginine vasotocin and isotocin in brains of three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*) by off-line solid phase extraction-liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1150, 290–294.

Kline, R.J., O'Connell, L.A., Hofmann, H.A., Holt, G.J., Khan, I.A., 2011. The distribution of an AVT V1a receptor in the brain of a sex changing fish, *Epinephelus adscensionis*. *J. Chem. Neuroanat.* 42, 72–88.

Konno, N., Hyodo, S., Yamaguchi, Y., Matsuda, K., Uchiyama, M., 2010. Vasotocin/V2-type receptor/aquaporin axis exists in African lungfish kidney but is functional only in terrestrial condition. *Endocrinology* 151, 1089–1096.

Kulczykowska, E., 2007. Arginine vasotocin and isotocin: towards their role in fish osmoregulation. In: Baldisserotto, B., Mancero Romero, J.M., Kapoor, B.G. (Eds.), *Fish Osmoregulation*. Science Publisher, Enfield, N.H, pp. 151–176.

Larson, E.T., O'Malley, D.M., Melloni Jr., R.H., 2006. Aggression and vasotocin are associated with dominant–subordinate relationships in zebrafish. *Behav. Brain Res.* 167, 94–102.

Lema, S.C., 2010. Identification of multiple vasotocin receptor cDNAs in teleost fish: sequences, phylogenetic analysis, sites of expression, and regulation in the hypothalamus and gill in response to hyperosmotic challenge. *Mol. Cell. Endocrinol.* 321, 215–230.

Lema, S.C., Nevitt, G.A., 2004. Exogenous vasotocin alters aggression during agonistic exchanges in male Amargosa River pupfish (*Cyprinodon nevadensis amargosae*). *Horm. Behav.* 46, 628–637.

Lema, S.C., Wagstaff, L.J., Gardner, N.M., 2010. Diurnal rhythms of behavior and brain mRNA expression for arginine vasotocin, isotocin, and their receptors in wild Amargosa pupfish (*Cyprinodon nevadensis amargosae*). *Mar. Freshwater Behav. Physiol.* 43, 257–281.

Ludwig, M., Leng, G., 2006. Dendritic peptide release and peptide-dependent behaviours. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 126–136.

- McEwen, B.B., 2004. The roles of vasopressin and oxytocin in memory processing. *Adv.Pharmacol.* 50, 1–740.
- Neil, E.H., 1964. An analysis of colour changes and social behaviour of *Tilapia mossambica*. *Univ. Calif. Publ. Zool.* 75, 1–58.
- Oliveira, R.F. 1995. Etologia social e endocrinologia comportamental da tilapia *Oreochromis mossambicus* (Teleostei, Cichlidae). Ph.D. Thesis, University of Lisbon, Lisbon.
- Oliveira, R.F. 2006. Neuroendocrine mechanisms of alternative reproductive tactics in fish. In: K.A. Sloman, R.W.Wilson, S. Balshine (Guest Editors; W.S. Hoar, D.J. Randall, A.P. Farrell, Series editors), *Fish Physiology*, vol. 24: Behaviour: Interactions with Physiology. Elsevier, New York.
- Oliveira, R.F., Almada, V.C., 1996a. Dominance hierarchies and social structure in captive groups of the Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus* (Teleostei: Cichlidae). *Ethol. Ecol. Evol.* 8, 39–55.
- Oliveira, R.F., Almada, V.C., 1996b. On the (In)stability of dominance hierarchies in the cichlid fish *Oreochromis mossambicus*. *Aggress. Behav.* 22, 37–45.
- Oliveira, R.F., Almada, V.C., 1998. Mating tactics and male–male courtship in the lek-breeding cichlid *Oreochromis mossambicus*. *J. Fish Biol.* 52, 1115–1129.
- Oliveira, R.F., Almada, V.C., Canario, A.V.M., 1996. Social modulation of sex steroid concentrations in the urine of male cichlid fish *Oreochromis mossambicus*. *Horm. Behav.* 30, 2–12.
- Pickford, G.E., Strecker, E.L., 1977. The spawning reflex response of the killifish, *Fundulus heteroclitus*: isotocin is relatively inactive in comparison with arginine vasotocin. *Gen. Comp. Endocrinol.* 32, 132–137.
- Saito, D., Urano, A., 2001. Synchronized periodic Ca²⁺ pulses define neurosecretory activities in magnocellular vasotocin and isotocin neurons. *J. Neurosci.* 21, 178.
- Saito, D., Komatsuda, M., Urano, A., 2004. Functional organization of preoptic vasotocin and isotocin neurons in the brain of rainbow trout: central and neurohypophysial projections of single neurons. *Neuroscience* 124, 973–984.
- Salek, S.J., Sullivan, C.V., Godwin, J., 2002. Arginine vasotocin effects on courtship behaviour in male white perch (*Morone americana*). *Behav. Brain Res.* 133, 177–183.
- Santangelo, N., Bass, A.H., 2006. New insights into neuropeptidomodulation of aggression: field studies of arginine vasotocin in a territorial tropical damselfish. *Proc. R. Soc. Lond.* 273, 3085–3092.
- Semsar, K., Kandel, F.L., Godwin, J., 2001. Manipulations of the AVT system shift social status and related courtship and aggressive behavior in the bluehead wrasse. *Horm. Behav.* 40, 21–31.
- Stacey, N.E., Sorensen, P.W., 2002. Hormonal sex pheromones in fish. In: Pfaff, D.W., Arnold, A.P., Etgen, A.M., Fahrbach, S.E., Rubin, R.T. (Eds.), *Hormones, Brain, and Behavior*. Editors Academic Press, New York, pp. 375–434.
- StatSoft, Inc., 2011. STATISTICA (data analysis software system), version 10. [www](http://www.statsoft.com).

statsoft.com2011.

Taborsky, M., 1997. Bourgeois and parasitic tactics: do we need collective, functional terms for alternative reproductive behaviours? *Behav. Ecol. Sociobiol.* 41, 361–362.

Thompson, R.R., Walton, J.C., 2004. Peptide effects on social behavior: effects of vasotocin and isotocin on social approach behavior in male goldfish (*Carassius auratus*). *Behav. Neurosci.* 118, 620–626.

Thompson, R.R., Walton, J.C., 2009. Vasotocin immunoreactivity in goldfish brains: characterizing primitive circuits associated with social regulation. *Brain Behav. Evol.* 73, 153–164.

Thompson, R.R., Walton, J.C., Bhalla, R., George, K.C., Beth, E.H., 2008. A primitive social circuit: vasotocin–substance P interactions modulate social behavior through a peripheral feedback mechanism in goldfish. *Eur. J. Neurosci.* 27 (9), 2285–2293.

Tobin, V.A., Hashimoto, H., Wacker, D.W., Takayanagi, Y., Langnaese, K., Caquineau, C., Noack, J., Landgraf, R., Onaka, T., Leng, G., Meddle, S.L., Engelmann, M., Ludwig, M., 2010. An intrinsic vasopressin system in the olfactory bulb is involved in social recognition. *Nature* 464, 413–417.

Wacker, D.W., Tobin, V.A., Noack, J., Bishop, V.R., Duszkiwicz, A.J., Engelmann, M., Meddle, S.L., Ludwig, M., 2010. Expression of early growth response protein 1 in vasopressin neurones of the rat anterior olfactory nucleus following social odour exposure. *J. Physiol.* 588, 4705–4717.

Wacker, D.W., Engelmann, M., Tobin, V.A., Meddle, S.L., Ludwig, M., 2011. Vasopressin and social odor processing in the olfactory bulb and anterior olfactory nucleus. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1220, 106–116.

Warne, J.M., Harding, K.E., Balment, R.J., 2002. Neurohypophysial hormones and renal function in fish and mammals. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 132, 231–237.

Wullimann, M.F., Mueller, T., 2004. Teleostean and mammalian forebrains contrasted: evidence from genes to behavior. *J. Comp. Neurol.* 475, 143–162.

3- Fenótipos neurais da arginina vasotocina em função do estatuto social

Artigo submetido para publicação na revista *Brain Behavior and Evolution*.

Artigo 4:

SOCIAL STATUS AND ARGININE VASOTOCIN NEURAL PHENOTYPES IN A CICHLID FISH

Olinda Almeida¹ & Rui F. Oliveira^{1,2}

¹ Unidade de Investigação em Eco-Etologia, ISPA – Instituto Universitário, Rua Jardim do Tabaco, 34, 1149-041 Lisboa, Portugal.

² Champalimaud Neuroscience Programme, Instituto Gulbenkian de Ciência, Rua da Quinta Grande, 6, 2780-156 Oeiras, Portugal.

ABSTRACT

The nonapeptide arginine vasotocin (AVT) and its mammalian homologue arginine vasotocin (AVP) play a key role in the regulation of social behaviour across vertebrates. In teleost fish three AVT neuronal populations have been described in the preoptic area (POA): the parvocellular (pPOA), the magnocellular (mPOA) and the gigantocellular (gPOA). Subsets of neurons from each of these areas project both to the pituitary and to other brain regions, where AVT is supposed to regulate neural circuits underlying social behaviour. However, in the fish species studied so far there is a considerable variation in which AVT neuronal populations are involved in behavioural modulation and in the direction of the effect. In this study the association between AVT neuronal phenotypes and social dominance was investigated in a cichlid fish, the Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). A sex difference was observed, with females having a larger number of AVT neurons in pPOA and mPOA. Within males AVT appeared associated with social subordination, as indicated by the larger soma sizes of AVT neurons in all three POA nuclei of non-territorial (NT) males, and by the positive correlations between submissive behaviour and soma size of AVT cells in all three nuclei and AVT cell number in mPOA. Soma size of AVT cells in the mPOA is also negatively correlated with kidney (mesonephros) weight, suggesting that the antidiuretic

effect of AVT may be involved in the known differences in urine production and storage between territorial and NT males of this species, which is used to convey chemical signals. In summary, the results confirm an involvement of AVT in the modulation of social behaviour in tilapia, but it was not possible to identify specific roles for specific AVT neuronal populations.

Keywords: nonapeptides; arginine vasotocin; Tilapia; social behaviour; territoriality; social dominance.

INTRODUCTION

The nonapeptides arginine vasotocin (AVT) and its mammalian homologue arginine vasopressin (AVP) play a major role as central neuromodulators involved in the expression of social behaviour in a wide range of vertebrates [Goodson, 2008; Goodson and Thompson, 2010]. However, both considerable conservation and diversity have been documented in the mechanisms through which these nonapeptides mediate social behaviour. Two ancestral AVT/AVP-ir cell groups (a magnocellular and a parvocellular, corresponding to the supraoptic and paraventricular nuclei respectively in amniotes) have been consistently observed in the preoptic area and hypothalamus of all vertebrates [Goodson and Bass, 2001]. Cells from these nuclei project to the pituitary, where AVT/AVP stimulates adrenocorticotropin release (in the anterior lobe) or is itself released into the blood stream (at the level of the posterior lobe) becoming a neurohormone that will act in peripheral target tissues to regulate body states; and to the midbrain tegmentum and hindbrain where AVT/AVP regulates autonomic functions and stereotypical species-specific action patterns (e.g. social withdrawal in goldfish, [Thompson and Walton, 2009; Thompson et al., 2008]; for general reviews see [Goodson and Bass, 2001; Goodson and Thompson, 2010]. A third AVT/AVP-ir cell group located in the bed nucleus of the stria terminalis (BNST) and projecting to the lateral septum (LS) and to basal forebrain regions has evolved in tetrapods [Goodson and Bass, 2001; Goodson and Thompson, 2010]. This BNST/LS nucleus has been implicated in the regulation of more complex and flexible social behaviours, such as social recognition, aggression and affiliative behaviours, in mammals and birds [Donaldson and Young, 2008; Goodson et al., 2012].

In teleost fish extra-preoptic/hypothalamic AVT cell groups are absent and therefore the question arises of how the primitive parvocellular (pPOA) and magnocellular AVT nuclei regulate complex social behaviours that are also present in this taxa. Interestingly, in many teleost species the preoptic magnocellular nucleus appears further subdivided into a more anterior and ventral group of smaller cells in larger numbers, named the magnocellular

preoptic nucleus (mPOA), and a more posterior and dorsal group of larger and fewer cells, termed the gigantocellular preoptic nucleus (gPOA). Despite the increasing evidence for a role of AVT on fish social behaviour, coming both from descriptive studies that correlate AVT neuronal phenotypes with behaviour and from experiments that study the impact of AVT manipulations on behaviour, it is yet not clear which neuronal population(s) is(are) involved in the regulation of social behaviours [Godwin and Thompson, 2012]. For example, the association between AVT neuronal phenotypes and the expression of status-dependent social behaviour in fish does not appear to be conserved. In some species AVT levels are lower in territorial/ social dominant males in one (e.g. pPOA in peacock blenny, *Salaria pavo*, [Grober et al., 2002] or all POA AVT nuclei (e.g. rock-pool blenny, *Parablennius sanguinolentus*, [Miranda et al., 2003]; Plainfin midshipman, *Porichthys notatus*, [Foran and Bass, 1998]. However, in other species, the expression of territorial behaviour and/or social dominance is associated with higher AVT levels in mPOA or gPOA and reduced AVT levels in the pPOA (e.g. zebrafish, *Danio rerio*, [Larson et al., 2006]; African cichlid, *Astatotilapia burtoni*, [Greenwood et al., 2008]. An explanatory hypothesis for this diversity in the patterns of association between AVT and social dominance in fish is still missing.

Here we studied the association between AVT neuronal phenotypes and the expression of territorial behaviour in an African cichlid species (Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus*) that exhibits a high level of behavioural flexibility with the expression of social status-dependent behaviour within males [Oliveira and Almada, 1998a]. In this species males form dense breeding aggregations during the reproductive period in which two male types can be recognized: (1) territorial males establish and defend a territory centred on a spawning pit that they dig with their mouth; they exhibit a typical dark nuptial coloration and actively court females trying to lead them to their spawning pit; and (2) non-territorial males that hover around inside the breeding aggregation but lack a territory and adopt a pale silver colouration similar to that of females; non-territorial males are frequently courted by territorial males and respond with typical female-like behaviour, which enables them to stay inside the breeding aggregations and to seek sneaking fertilizations [Oliveira and Almada, 1998a]. Non-territorial males are subordinate but if an opportunity to establish a territory arises they can rapidly establish a territory and adopt a dominant behaviour [Oliveira and Almada, 1998b, 1996]. The high behavioral flexibility present in this species makes it an excellent model to investigate the association between different AVT neuronal phenotypes and social behaviour.

The specific goal of this study is to investigate if there is a specific AVT neuronal population associated with the expression of status-dependent behaviour (i.e. aggressive vs.

submissive behaviour). For this purpose individual behaviour of males from different social status [territorial (T) vs. non-territorial (NT)] was recorded and the AVT neuronal populations were characterized in the same individuals. The neuronal AVT phenotypes of females were also characterized to be used as an outgroup reference in the comparison between the two male types. Steroid hormones (androgens and cortisol), which may modulate eventual feedbacks of social status on AVT neuronal phenotypes were also studied.

MATERIALS AND METHODS

Animals and housing

Fish used in this study came from the Mozambique tilapia stock held at ISPA - Instituto Universitário (Lisboa, Portugal), which is maintained in stable social groups of 4 males and 5 females per tank, in glass tanks (120 x 40 x 50 cm, 240 L), Tanks were supplied with a double filtering system (sand and external biofilter, Eheim) and constant aeration. The presence of substrate in the tanks allows for the nest construction by territorial males. Water quality was monitored on a weekly basis for nitrite (0.2-0.5 ppm), ammonia (<0.5 ppm) (Pallintest kit®) and pH (6.0-6.2). Fish were kept at a temperature of 26 ± 2 °C and a 12L:12D photoperiod, and fed with commercial cichlid floating and sinking sticks. The social status of the males in each stock tank was monitored, based on the body coloration and on the possession of a spawning pit on the substrate, both indicators of territorial status [Oliveira and Almada, 1996a]. To avoid a potential confound of variation in previous social status, only territorial males were selected from the stock tanks for this experiment.

Experimental procedure

Six males (which were territorial in the home stock tank) and 4 females were removed from their stock tanks and introduced simultaneously in the experimental aquaria (120 x 40 x 50 cm, 240 L; same housing conditions as those of stock tanks). These new experimental groups remain undisturbed for 7-8 weeks in order to allow for new social status to be established and for dominance hierarchies to stabilize. Thirteen males that maintained their social status (either territorial or non-territorial) for at least 5 consecutive weeks (maximum 8 weeks) were removed from the tanks and sampled [Mean \pm standard deviation (SD); T: body weight (BW) = 56.61 ± 15.78 g, standard length (SL) = 11.99 ± 0.99 cm, N=7; NT: BW = 42.09 ± 9.98 g, SL = 10.77 ± 0.95 cm, N=6]. Four females [Mean \pm SD; weight: 32.37 ± 6.03 g; length: 10.10 ± 0.63 ,) were also sampled in order to provide a reference for the males. Immediately after removal from the experimental tanks fish were anaesthetised, a blood

sample was collected, and fish were then killed and brain tissue collected. These procedures are described in detail below.

Behaviour sampling

Male social status, based on the dark nuptial coloration and the defence of a nest in the substrate, was monitored in the experimental tanks on a daily basis. After social status became stable (on first or second week), 2 min focal observations was performed (once a week), using a behavioural sampling with continuous recording method [Martin and Bateson, 2007]. The ethogram provided by [Baerends and Baerends-van Roon, 1950] was used to identify the relevant behavioural patterns and male-male behavioural interactions were noted in order to measure male aggressive (bite and chasing) and submissive behaviour (escape). Female behaviour was not recorded, since this study was focused on the differences between territorial/ dominant and non-territorial/ subordinate males. However, ad libitum behavioural observations confirm previous descriptions of female behaviour in this species [Oliveira and Almada, 1998c], in that they stay in the water column and only come to the substrate when courted by territorial males.

Blood sampling and steroids radioimmunoassay

Blood sample was collected from the caudal vein (using 1 ml syringes with 25G/16 mm needles) under anaesthesia (MS-222, Pharmaq; 300-400 ppm) Blood sampling always took less than 4 min since the induction of anaesthesia, which prevents possible confounds of handling stress on cortisol levels (Foo and Lam, 1993). Blood was centrifuged (10 min; 600 G) and the plasma was stored at - 20°C until further processing. Plasma samples were disnaturated in a dilution of 1:10 in gelatine buffer (used in radioimmunoassay) at 80°C during 60 min in a dry bath. Steroid concentrations were measured by radioimmunoassay, using commercially available antibodies and marked hormones for cortisol (Rabbit anti-cortisol cortisol-32, ref. 20-CR50, Interchim, Fitzgerald; 1,2,6,7-3H Cortisol, Amersham Biosciences, ref. TRK407-250uCi) and T (Rabbit anti-testosterone, Research Diagnostics Inc, ref. WLI-T3003; 1,2,6,7-3H Testosterone, Amersham Biosciences, ref. TRK402-250mCi), and a custom made antibody for KT kindly donated by D. E. Kime (specificity table for this antibody has been published in Kime and Manning, 1982) and tritiated KT produced in-house from marked cortisol (see ref. above). All samples were run in a single assay and intra-assay variability was 6.3% for cortisol; 5.6% for T; and 5.2% for KT.

Tissue Preparation

After collection of the blood sample fish returned to the anaesthetic solution until opercular movements ceased. They were then perfused transcardiacally with 0.9% heparinised 0.1 M phosphate buffer saline solution (PBS, pH 7.4) followed by 4% paraformaldehyde (PFA) in 0.1 M PBS for 30 min. Brains were then removed, post-fixed in 4% PFA for 1 to 2 hours and transferred to 30% sucrose in 0.1 M PBS and kept at 4 °C overnight.

Immunocytochemistry

Cryoprotected brains were embedded in Tissue-Tek® (optimal cutting temperature compound), frozen at -80 °C and sectioned with the cryostat at 20 µm in the coronal plane. Two series of Silane-prep glass slides (Sigma) alternate brain sections were collected and stored at -80°C until further processing. One of the alternate series was immunoreacted following a protocol adapted from [Grober et al., 1991]. At day 1, slides were brought at room temperature and the tissue sections were surrounded with a hydrophobic barrier (PAP pen, Sigma), covered with 0.1 M phosphate buffer solution (PB, pH 7.4) for 7 min, and blocked with 0.4% Triton® X-100 (Sigma) in PB with 2.8% goat serum (Sigma) for 20 minutes followed by 3% H₂O₂ in 0.1PB, for endogenous peroxidase blockage. After two additional washes (7 minutes each) with 0.1M PB, the primary AVT antibody was applied to the mounted section on a final dilution of 1: 10000 and incubated overnight (20-24h) in a sealed humidified chamber at 4°C. This AVT antibody (kindly donated by Dr. Matthew Grober, Georgia State University, USA) has already been used successfully in similar studies with different teleost species (e.g. butterflyfishes, *Chaetodon* spp., (Dewan et al., 2008); halfspotted goby, *Asterropteryx semipunctata*, (Maruska et al., 2007); cleaner wrasse, *Labroides dimidiatus*, (Mendonça et al., 2013). At day 2, after two 0.1M PB washes (7 minutes each), mounted sections were incubated with the biotinylated goat anti-rabbit secondary antibody (KPL) for 30 min, two additional washes (7 minutes each) were made and incubation with peroxidase labelled streptavidin (KPL) was realized for another 30 min. After two additional 0.1 M PB washes of 7 min the slides were reacted with diaminobenzidine (DAB) chromogen peroxidase substrate kit (Vector Laboratories, Inc.) for 3-6 min or until golden brown coloration was achieved (according to the manufacturer's instructions). The reaction was then stopped by immersing the slides in distilled water, followed by dehydration in an ethanol series (70%, 85%, 95%, 3 x 100%; 1 min each bath, with the exception of the last bath of 2 min), and clearance in xylol (Sigma) (two baths: 1 and

5 min, in order). Finally, slides were coverslipped with Cytoseal 60 mounting media (Richard Allen Scientific). The specificity of this antibody for AVT has been assessed by investigation of non-specific labelling of the neurons in a second alternate series. The tissue was immunoreacted after pre-adsorbing the antibody with 8 μ M AVT peptide (catalogue No. V0130; Sigma) overnight at 4 °C. All of the other steps were maintained. No stained neurons were observed, thus confirming the specificity of the antibody used. Other studies had already also shown this antibody specificity for different species, including another cichlid species [Dewan et al., 2008; Maruska et al., 2007; Maruska, 2009; Mendonça et al 2013].

Quantification

Cell counting and measurements were done following a blind protocol so that neither sex nor social status of the specimen were known during the quantification process. AVT-ir cell bodies were only detected in the pre-optic area, and therefore all quantifications were done in this region. Each AVT-ir cell was assigned to either the parvocellular (pPOA), magnocellular (mPOA) or gigantocellular (gPOA) cell group based on neuroanatomical location, cell size and cell morphology (following [Bradford and Northcutt, 1983]). This nomenclature has been widely used in similar studies [Lema, 2006; Maruska, 2009; Mendonça et al., 2013; Semsar and Godwin, 2003]. Digital images were captured at a magnification of 400X with a digital camera (Olympus C-2020 Z) attached to a microscope (Olympus BX50). After calibration for magnification the cell profile was traced and the area was automatically calculate using the Image J software [Rasband, 2002]. Cell number was determined by visually counting the cells belonging to each cell group with the microscope. The criteria for counting a cell was the presence of a neurite attached to a discernible perimeter from the background, except for pPOA cells where the neurite was not visible in a few cells.

Data analysis

Behavioural data did not conform to parametric assumptions, and therefore the comparisons of aggressive and submissive behaviour between territorial and non-territorial males were performed using the non-parametric Mann-Whitney U test.

Since T males were significantly larger than both NT males and females (T males vs. females: $t=3.39$; $p<0.01$; T males vs NT males: $t=2.25$; $p<0.05$; NT males vs. females: $t=1.22$; $p=0.25$) we investigated the occurrence of allometric relationships between body size

and cell number and/or cell size. Significant positive correlations were observed between number and size of gPOA cells and SL for territorial males. Therefore, and since we wanted to compare cell measurements across phenotypes that differ in body size, all data were corrected for body size by dividing cell size or cell number by SL. A repeated-measures ANOVA followed by post-hoc LSD tests were used to test the effect of socio-sexual phenotype (independent categorical variable: territorial male vs. non-territorial male vs. female) on cell measurements (i.e. cell number and cell profile area) of different cell groups (repeated factor: pPOA, mPOA and gPOA). Planned comparisons were used to compare cell measurements between different socio-sexual phenotypes within each cell group, and to compare between different cell groups within the same socio-sexual phenotype. Planned comparisons were also used to test for sex differences (T males + NT males vs. females).

A one-way ANOVA was used to test the effect of socio-sexual phenotype on hormone (testosterone, 11KT and cortisol) circulating levels. Differences between each socio-sexual phenotypes were subsequently investigated using planned comparisons.

Putative relationships between behavioural, hormonal and AVT-ir cell variables were assessed using Pearson correlations for the whole male data set (i.e. territorial males and non-territorial males together, N=13). All tests are two-tailed at a significance level of $p < 0.05$. All statistical analyses were run on the STATISTICA v. 10.0 Software package [Statsoft, 2011].

RESULTS

Behavior of territorial and non-territorial males

Territorial males exhibited the nuptial dark colouration typical of breeding males of this species and mouthdug and defended a nest in the substrate for at least 5 consecutive weeks during the 8-week period of the study. Behavioural observations showed that only territorial males exhibited aggressive behaviour (Mann-Whitney U test: $Z = 2.93$, $p < 0.01$), and that escape behaviour was mainly exhibited by non-territorial males (Mann-Whitney U test: $Z = 2.928$, $p < 0.01$, Fig. 1). Thus, territorial males exhibited a dominant behavioural phenotype and non-territorials a subordinate one.

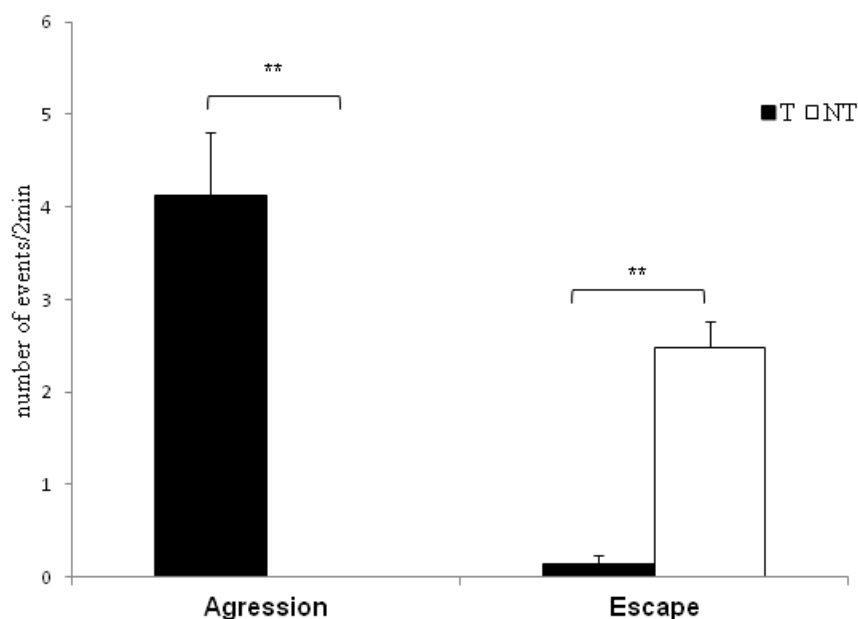


Fig. 1- Effects of territorial status (territorial, T vs. non-territorial, NT) on the aggressive and submissive behaviour of *Oreochromis mossambicus* males. Asterisks indicate significant differences between species (** = $p < 0.01$, Mann-Whitney U test).

Brain distribution of AVT-ir Neurons

AVT-ir cells were exclusively found in the POA. Three cellular populations of AVT-ir cells could be recognized based on cell size, cytoarchitecture and localization within the POA. Parvocellular cells are the smallest ones (T males = $38.1 \pm 10.3 \mu\text{m}^2$; NT males = $48.6 \pm 9.4 \mu\text{m}^2$; females $41.4 \pm 14.6 \mu\text{m}^2$) and are mainly monopolar with some occurrences without an obvious neurite. They start to appear at the more rostral part of the POA apposed to the third ventricle, and thus are the most rostral and ventral AVT-ir cell group (Fig 2B, C and D), and extend dorso-caudally until magnocellular cells start to appear. Magnocellular cells have a soma that is approximately twice the size of that of parvocellular cells (T males = $64.1 \pm 6.8 \mu\text{m}^2$; NT males = $91.3 \pm 11.7 \mu\text{m}^2$; females $79.5 \pm 18.9 \mu\text{m}^2$), occupy a medial location in the POA (Fig 2, E) that extends caudally lying against the third ventricle, and have one prominent axon projecting towards the pituitary (preopticohypophyseal tract, PHT). Finally, the gigantocellular cells have the largest cell bodies, which have an area that is more than the double of that of magnocellular cells (T males = $191.6 \pm 28.7 \mu\text{m}^2$; NT males = $222.5 \pm 30.1 \mu\text{m}^2$; females = $173.1 \pm 17.1 \mu\text{m}^2$), and are usually multipolar, having many surrounding fibres extending in/from different directions. However, it is clear that most fibres of this cell group project towards the pituitary (Fig. 2C,F). The magnocellular cell group is located in a more dorsal position and was less numerous than either pPOA or mPOA AVT-ir cell groups.

Fibers of the three neuronal AVT-ir groups seem to project in different directions (Fig. 2A-F).

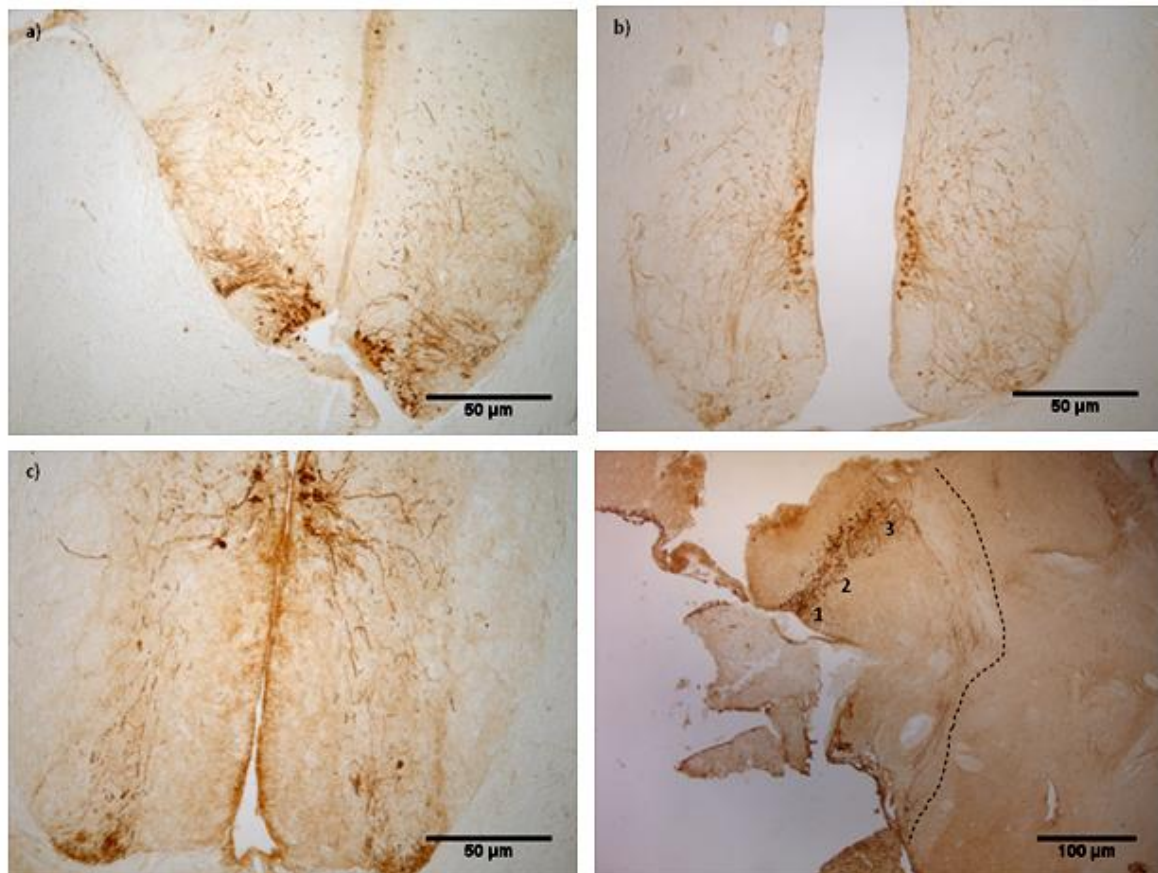


Fig. 2. AVT-ir neurons in the brain of *Oreochromis mossambicus*: (a,b,c) Coronal view (magnification 100X) of parvocellular (a), magnocellular (b) and gigantocellular (c) AVT cell nuclei in the POA. Sagittal section (magnification 40X): (d) cell bodies of parvocellular (1), magnocellular (2) and gigantocellular (3). The area of interrupt lines indicates the presence of AVT-ir fibers.

Quantitative Differences of Preoptic AVT-ir Cells

There was a main effect of cell group ($F_{2,28}=143.08$, $p<0.0001$; LSD post-hoc test: pPOA > mPOA > gPOA, $p<0.0001$), socio-sexual phenotype ($F_{2,14}=9.83$, $p<0.01$; LSD post-hoc test: female > T male = NT male, $p<0.05$) and the interaction between phenotype and cell group ($F_{4,28}=3.43$, $p<0.05$) on the number of AVT-ir neurons (Fig. 3A). Planned comparisons showed that within each socio-sexual phenotype (i.e. for T males, NT males and females independently) the number of AVT-ir cells is higher in pPOA, followed by mPOA, and then by gPOA (Fig. 3A). Regarding the variation in the number of AVT-ir cells between socio-sexual phenotypes, planned comparisons showed that dominant males have significantly less, and that subordinate males have marginally non-significant less, pPOA and mPOA AVT-ir neurons than females (Fig. 3A).

There was a main effect of cell group (pPOA < mPOA < gPOA; $F_{2,28}=503.269$, $p < 0.000001$; LSD post-hoc test: $p < 0.0001$), socio-sexual phenotype ($F_{2,14}=13.431$, $p < 0.001$; LSD post-hoc test: NT male > female > T male, $p < 0.05$) and the interaction between these two main factors ($F_{4,28}=4.046$, $p < 0.05$) on the cell body size of AVT-ir neurons (Fig. 3B). Planned comparisons demonstrate that NT males have AVT-ir neurons with a larger soma size than dominants for all cell groups, and larger than females only in gPOA (Fig. 3B). Females also have larger AVT-ir neuron soma size than T males in the mPOA (Fig. 3B).

Finally, sex differences [planned comparisons for (T males + NT males) vs. females] were only found in the number of pPOA and mPOA AVT-ir cells, with females having more cells in both cases.

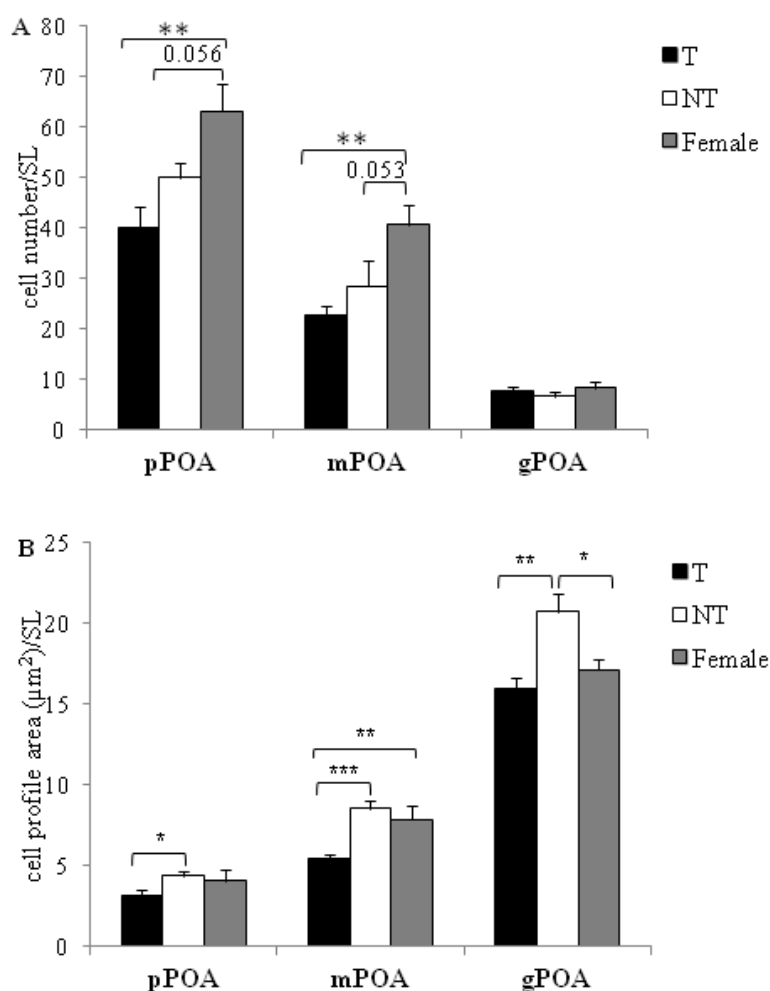


Fig. 3. Mean cell number (A) and cell body size (B) corrected for body size (SL in cm) for the three AVT-ir neuronal populations in the pre-optic area [parvocellular (pPOA), magnocellular (mPOA) and gigantocellular (gPOA)] of territorial males, non-territorial males and females. Data are presented as mean \pm SEM. Asterisks indicate significant differences between socio-sexual phenotypes (planned comparisons; * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$). Different letters indicate significant differences between different neuronal populations within the same socio-sexual phenotype (planned comparisons, $p < 0.05$).

Hormone circulating levels

There was a main effect of socio-sexual phenotype on testosterone ($F_{2,14}=10.137$, $p<0.01$) and KT ($F_{2,14}=11.151$, $p<0.01$) circulating levels. Planned comparisons showed that both male phenotypes have significantly higher androgens levels than females (Fig 4A,B). Testosterone, but not KT, plasma levels are higher in T males than in NT males (Fig. 4A,B). No main effect was found on cortisol plasma levels across different socio-sexual phenotypes ($F_{1,14}=1.088$, $p=0.364$).

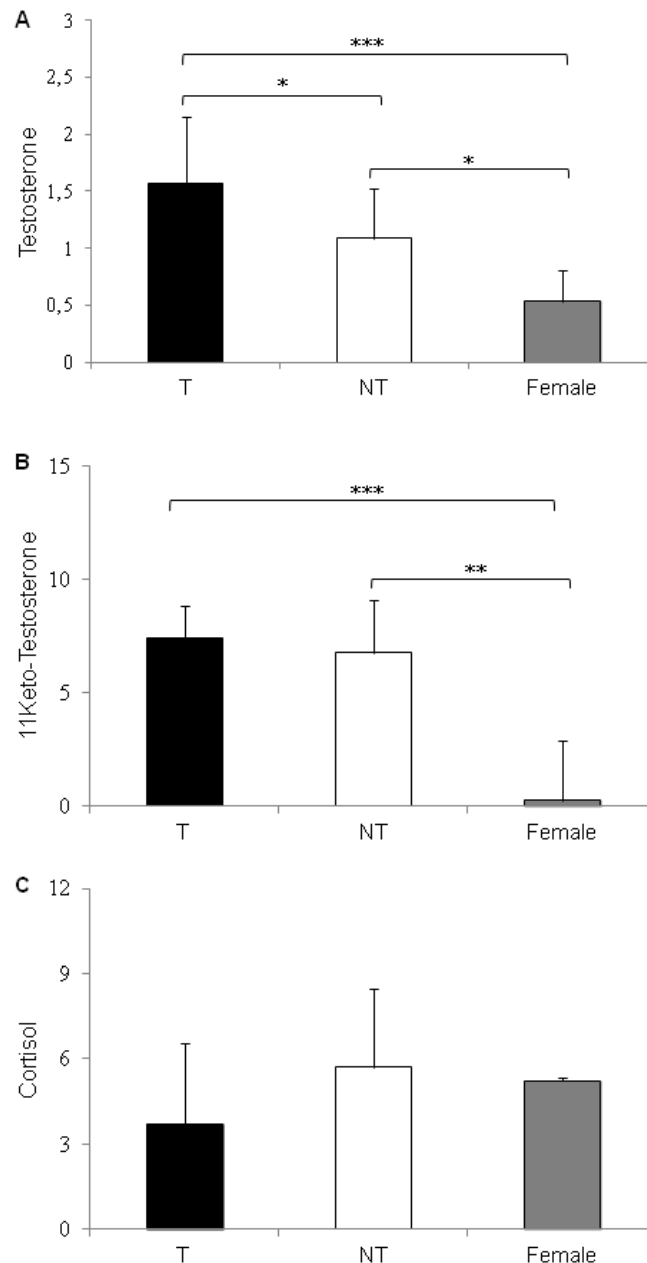


Fig 4- Mean testosterone (A), Ketotestosterone (KT) (B) and cortisol (C) plasma levels (ng/ml) of T males, NT males and females. Data are presented as means \pm SEM. Asterisks indicate significant

differences between socio-sexual phenotypes (planned comparisons; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Association Between Male Social Dominance, Hormone Levels and AVT Neuronal Phenotypes

The number of AVT-ir cells is negatively correlated with aggression in the pPOA and positively correlated with escape behaviour (submission) in the mPOA (Table II). The cell body size of AVT-ir cells is negatively correlated with aggression in pPOA and mPOA (also with a marginally non-significant negative correlation in the gPOA) and positively correlated with escape behaviour in all cell groups of the POA (Table II).

Although there were no significant correlations between any measurement of AVT cells and sex steroids, there were two marginally non-significant negative correlations: (1) between the number of gPOA AVT-ir cells and cortisol levels; and (2) between the number of mPOA AVT-ir cells and circulating T levels (table II). Finally, the cell body size of mPOA AVT-ir cells is negatively correlated with kidney (mesonephros) weight (Table II).

Table II. Pearson correlations between characteristics (cell and cell body size) of AVT-ir neurons, dominance behaviour (aggression and escape), hormone level (testosterone, KT and cortisol) and kidney (mesonephros) weight for T and NT males (N=13). Statistical significance is indicated by asterisks: * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = 0.001; § indicates a marginally non-significant correlation ($p < 0.10$)

	Cell number /SL			Cell body size /SL		
	pPOA	mPOA	gPOA	pPOA	mPOA	gPOA
Aggression	-0.600 *	-0.296	0.340	-0.606 *	-0.639 *	-0.513§
Escape	0.369	0.555 *	-0.115	0.635 *	0.867 ***	0.844 ***
Testosterone	-0.015	-0.115	0.008	-0.103	-0.495§	-0.451
KT	-0.100	-0.204	0.043	-0.017	-0.093	-0.071
Cortisol	-0.421	-0.094	-0.502§	-0.125	0.361	-0.019
Kidney weight	-0.234	-0.283	0.427	-0.416	-0.783 **	-0.497

DISCUSSION

The vasotocin system of the Mozambique tilapia is restricted to the POA where parvocellular, magnocellular and gigantocellular AVT-ir cells can be recognized forming three distinct populations (pPOA, mPOA and gPOA) that follow a distribution previously described for other teleost [e.g. Dewan et al., 2008; Goodson and Bass, 2000; Lema and Nevitt, 2004; Maruska, 2009; Maruska et al., 2007; Mendonça et al., 2013; Miranda et al., 2003]. It was

also shown here that AVT neurons from all three cell populations project to the pituitary via the preoptic-hypophysial tract, but also to other brain regions. This pattern of multiple projections have also been described in other fish species and seems to be a characteristic of teleost vasotocin systems [Godwin and Thompson, 2012], with described cases of both hypophysary and extra-hypophysary projections by the same AVT neuron [Saito et al., 2004].

Here a sex difference was observed in the number of pPOA and mPOA cells but neither in the number of gPOA cells nor in the soma size of any of the three cell populations. The pattern of sexual dimorphism in the vasotocin system is diverse among teleost fish, with known cases of sex differences being present or absent in all POA regions (e.g. halfspotted goby, [Maruska et al., 2007]; and goldfish, *Carassius auratus*, [Parhar et al., 2001]; respectively). However, negative results in sex differences should be taken with caution since there are marked seasonal effects as well, and reproduction is known to regulate the AVT system differently in the two sexes, and any of these two factors may mask the effect (e.g. [Ota et al., 1999, 1996]). In this study both sexes were kept in reproductive conditions and were actively breeding.

Differences were also observed in this study between T males and NT males in the soma size of AVT-ir neurons. In all three POA regions NT males had larger AVT neurons than T males, suggesting an association between subordinate social status with an overall increased AVT activity. This hypothesis is further supported by the pattern of correlations between AVT-ir cell measures and male social behaviour, which shows a positive association between overall increased activity of the vasotocin system (as indicated by the positive correlations between: escape behaviour and number of cells in the mPOA; and escape behaviour and size of cell body in all three AVT neuronal populations) and the expression of submissive behaviour. Moreover, a reverse relationship was observed, with the expression of aggressive behaviour appearing associated with a lower activity of the vasotocin system (as indicated by negative correlations between aggressive behaviour and size of cell body of pPOA and mPOA AVT cell populations, and between aggressive behaviour and the number of AVT-ir pPOA cells). Finally, this association of subordinate social status with increased vasotocin activity is also in accordance with recent published data on nonapeptide levels for this species, indicating higher concentrations of AVT in the pituitary of NT males than in T males [Almeida et al., 2012]. Considering that AVT neurons from all three POA regions project to the pituitary in this species, the immunocytochemical evidence presented in this paper matches nicely the results of peptide quantification published previously [Almeida et al., 2012]. In the scope of this comparison between immunocytochemical and quantitative peptide evidence, it is also worth mentioning that the

presence of extra-hypophysary projections in all AVT POA nuclei matches the occurrence of detectable levels of AVT peptide in all brain regions where it was measured (by HPLC; [Almeida et al., 2012]), and together these two sets of data confirm the role of AVT as a widespread neuromodulator in the central nervous system. Finally, it should be noted that despite the very high levels of AVT peptide previously measured in the olfactory bulbs suggestive of local production, we have not identified any AVT-ir cells in the olfactory bulbs in this study. An intrinsic vasopressin (AVP) system made of a large population of interneurons has been recently described in the rat olfactory bulbs, which is involved in social recognition [Tobin et al., 2010]. Interestingly previous studies using traditional immunocytochemical techniques had missed to localize these interneurons that only became visible in a transgenic rat line enhanced with green fluorescent protein targeted at AVP secretory vesicles [Ueta et al., 2005]. Similarly, it is possible that our current technique is missing a similar system in the fish olfactory bulb. As the above comparisons between HPLC AVT peptide quantification and immunocytochemistry characterization of AVT-ir cells in tilapia illustrate, the use of multiple and complementary techniques will help to clarify the relationship between the vasotocin system and social behaviour.

The occurrence of within-species covariation in the activity of the vasotocin system and the expression of social dominance has already been described for another African cichlid species [*Astatotilapia burtoni*, Greenwood et al., 2008]. Despite the fact that Mozambique tilapia and *A. burtoni* are phylogenetically close to each other and share a similar mating system (i.e. polygamy, exclusive female parental care, and male breeding territoriality), the data presented here contrasts profoundly with that available for *A. burtoni* [Greenwood et al., 2008]. While in the Mozambique tilapia NT males have overall higher AVT levels and these are correlated with the expression of submissive behaviour, in *A. burtoni* T males have higher gPOA AVT levels and these are correlated with aggressive displays, whereas NT males have higher pPOA levels and these are correlated with submissive behaviour [Greenwood et al., 2008]. Thus, the proposed specialization of AVT populations on different aspects of social behaviour for *A. burtoni*, such as an involvement of gPOA in reproductive behaviours including territoriality and pPOA in social stress [Greenwood et al., 2008], does not seem to apply to *O. mossambicus*. Therefore, despite the association between AVT neuronal phenotypes and the expression of social behaviour found in both species, the AVT-behaviour relationship in cichlids seems to be species-specific. However, the pattern of overall decreased AVT activity associated with male social dominance has already been reported for other non-cichlid fish [e.g. rock-pool blenny, [Miranda et al., 2003]; Plainfin midshipman, [Foran and Bass, 1998]]. Therefore, the patterns of AVT-social dominance

observed among teleost fish do not seem to be evolutionary conserved, but an explanatory hypothesis for the diversity in these patterns of association is still missing.

No significant correlations were found between any of the AVT cell measures and the circulating levels of any of the steroid hormones measured (testosterone, KT and cortisol). However, marginally non-significant negative correlations ($p < 0.10$) were identified between testosterone levels and soma size of mPOA AVT-ir neurons and between cortisol and the number of AVT-ir cells in the gPOA nuclei, which might suggest a differential association between different hormonal axis and different AVT neuronal populations in the POA (e.g. stress axis and gPOA and reproductive axis and mPOA). Therefore, given the small sample size used in this study the lack of significant correlations between sex steroids and AVT nuclei should be taken with caution and further research should try to address these possible relationships.

Interestingly, the soma size of AVT-ir neurons in the mPOA nucleus was inversely correlated with kidney (mesonephros) weight. in tilapia males. This result might be related to the known antidiuretic effects of AVT in fish [Amer and Brown, 1995; Balment et al., 1993; Warne et al., 2002], which in this case would indicate a reduced volume of urine and a lower urination rate in NT males. This is in accordance with previously published data in this species showing that dominant males store more urine and urinate at higher rates than subordinates during social interactions, in which urine is used as a vehicle for chemical communication [Barata et al., 2007]. Thus, this antidiuretic effect of AVT might play an important role on social status specific profiles of urine production and use. Therefore, by having both central effects on the expression of territorial behaviour and peripheral effects on urine production AVT may be coupling brain and body status-dependent traits that need to be co-expressed, hence playing a key role as a phenotypic integrator.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Ana Felix for running the radioimmunoassays in the lab. This study was funded by the research grants PTDC/PSI/71811/2006 and PTDC/MAR/72117/2006 from Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT, Portugal; grant holder: R. Oliveira), the European Commission FEDER Program, and the FCT Pluriannual Program (R&D unit MAR-LVT-Lisboa-331; grant holder: R. Oliveira). During this project O. Almeida was being supported by a PhD fellowship from FCT (SFRH/BD/37187/2007).

REFERENCES

- Almeida, O., Gozdowska, M., Kulczykowska, E., Oliveira, R.F., 2012. Brain levels of arginine-vasotocin and isotocin in dominant and subordinate males of a cichlid fish. *Horm. Behav.* 61, 212–217.
- Amer, S., Brown, J.A., 1995. Glomerular actions of arginine vasotocin in the in situ perfused trout kidney. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* 269, R775–R780.
- Baerends, G.P., Baerends-van Roon, J.M., 1950. An introduction to the study of the ethology of the cichlid fishes. *Behav. Suppl.* III–243.
- Balment, R.J., Warne, J.M., Tierney, M., Hazon, N., 1993. Arginine vasotocin and fish osmoregulation. *Fish Physiol. Biochem.* 11, 189–194.
- Barata, E.N., Hubbard, P.C., Almeida, O.G., Miranda, A., Canário, A.V.M., 2007. Male urine signals social rank in the Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *BMC Biol.* 5, 54.
- Bradford, M.R.J., Northcutt, R.G., 1983. Organization of the diencephalon and pretectum of the ray-finned fishes, in: Davis, R.E., Northcutt, R.G. (Eds.), *Fish Neurobiology*, Vol. 2. University of Michigan Press, Ann Arbor, pp. 117–164.
- Dewan, a K., Maruska, K.P., Tricas, T.C., 2008. Arginine vasotocin neuronal phenotypes among congeneric territorial and shoaling reef butterflyfishes: species, sex and reproductive season comparisons. *J. Neuroendocrinol.* 20, 1382–94.
- Donaldson, Z.R., Young, L.J., 2008. Oxytocin, vasopressin, and the neurogenetics of sociality. *Science (80-)*. 322, 900–904.
- Foran, C.M., Bass, a H., 1998. Preoptic AVT immunoreactive neurons of a teleost fish with alternative reproductive tactics. *Gen. Comp. Endocrinol.* 111, 271–82.
- Godwin, J., Thompson, R., 2012. Nonapeptides and social behavior in fishes. *Horm Behav* 61, 230–238.
- Goodson, J., 2008. Nonapeptides and the evolutionary patterning of sociality 170, 3–15.
- Goodson, J.L., Bass, a H., 2001. Social behavior functions and related anatomical characteristics of vasotocin/vasopressin systems in vertebrates. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 35, 246–65.
- Goodson, J.L., Bass, A.H., 2000. Vasotocin innervation and modulation of vocal-acoustic circuitry in the teleost *Porichthys notatus*. *J. Comp. Neurol.* 422, 363–379.
- Goodson, J.L., Kelly, A.M., Kingsbury, M. a, 2012. Evolving nonapeptide mechanisms of gregariousness and social diversity in birds. *Horm. Behav.* 61, 239–50.
- Goodson, J.L., Thompson, R.R., 2010. Nonapeptide mechanisms of social cognition, behavior and species-specific social systems. *Curr Opin Neurobiol* 20, 784–794.

- Greenwood, A.K., Wark, A.R., Fernald, R.D., Hofmann, H.A., 2008. Expression of arginine vasotocin in distinct preoptic regions is associated with dominant and subordinate behaviour in an African cichlid fish. *Proc Biol Sci* 275, 2393–2402.
- Grober, M.S., George, A.A., Watkins, K.K., Carneiro, L.A., Oliveira, R.F., 2002. Forebrain AVT and courtship in a fish with male alternative reproductive tactics. *Brain Res Bull* 57, 423–425.
- Grober, M.S., Jackson, I.M., Bass, A.H., 1991. Gonadal steroids affect LHRH preoptic cell number in a sex/role changing fish. *J Neurobiol* 22, 734–741.
- Larson, E.T., O'Malley, D.M., Melloni, R.H., 2006. Aggression and vasotocin are associated with dominant-subordinate relationships in zebrafish. *Behav. Brain Res.* 167, 94–102.
- Lema, S.C., 2006. Population divergence in plasticity of the AVT system and its association with aggressive behaviors in a Death Valley pupfish. *Horm. Behav.* 50, 183–93.
- Lema, S.C., Nevitt, G. a., 2004. Variation in vasotocin immunoreactivity in the brain of recently isolated populations of a death valley pupfish, *Cyprinodon nevadensis*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 135, 300–309.
- Martin, P., Bateson, P., 2007. *Measuring behaviour: an introductory guide*: Cambridge Univ Pr.
- Maruska, K.P., 2009. Sex and temporal variations of the vasotocin neuronal system in the damselfish brain. *Gen. Comp. Endocrinol.* 160, 194–204.
- Maruska, K.P., Mizobe, M.H., Tricas, T.C., 2007. Sex and seasonal co-variation of arginine vasotocin (AVT) and gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons in the brain of the halfspotted goby. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 147, 129–44.
- Mendonça, R., Soares, M.C., Bshary, R., Oliveira, R.F., 2013. Arginine vasotocin neuronal phenotype and interspecific cooperative behaviour. *Brain. Behav. Evol.* 82, 166–76.
- Miranda, J.A., Oliveira, R.F., Carneiro, L.A., Santos, R.S., Grober, M.S., 2003. Neurochemical correlates of male polymorphism and alternative reproductive tactics in the Azorean rock-pool blenny, *Parablennius parvicornis*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 132, 183–189.
- Oliveira, R.F., Almada, V.C., 1996. On the (in)stability of dominance hierarchies in the cichlid fish *Oreochromis mossambicus*. *Aggress. Behav.* 22, 37–45.
- Oliveira, R.F., Almada, V.C., 1998a. Mating tactics and male-male courtship in the lek-breeding cichlid *Oreochromis mossambicus*. *J. Fish Biol.* 52, 1115–1129.
- Oliveira, R.F., Almada, V.C., 1998b. Dynamics of social interactions during group formation in males of the cichlid fish *Oreochromis mossambicus*. *Acta Ethol.* 1, 57–70.
- Oliveira, R.F., Almada, V.C., 1998c. Maternal aggression during the mouthbrooding cycle in the cichlid fish, *Oreochromis mossambicus*. *Aggress. Behav.* 24, 187–196.
- Ota, Y., Ando, H., Ban, M., Ueda, H., Urano, A., 1996. Sexually different expression of neurohypophysial hormone genes in the preoptic nucleus of pre-spawning chum salmon. *Zoolog. Sci.* 13, 593–601.

Ota, Y., Ando, H., Ueda, H., Urano, A., 1999. Seasonal changes in expression of neurohypophysial hormone genes in the preoptic nucleus of immature female masu salmon. *Gen. Comp. Endocrinol.* 116, 31–39.

Parhar, I.S., Tosaki, H., Sakuma, Y., Kobayashi, M., 2001. Sex differences in the brain of goldfish: gonadotropin-releasing hormone and vasotocinergic neurons. *Neuroscience* 104, 1099–1110.

Rasband, W.S., 2002. ImageJ.

Saito, D., Komatsuda, M., Urano, a, 2004. Functional organization of preoptic vasotocin and isotocin neurons in the brain of rainbow trout: central and neurohypophysial projections of single neurons. *Neuroscience* 124, 973–84.

Semsar, K., Godwin, J., 2003. Social influences on the arginine vasotocin system are independent of gonads in a sex-changing fish. *J. Neurosci.* 23, 4386–93.

Statsoft, I., 2011. STATISTICA (data analysis software system), version 10.

Thompson, R.R., Walton, J.C., 2009. Vasotocin immunoreactivity in goldfish brains: characterizing primitive circuits associated with social regulation. *Brain. Behav. Evol.* 73, 153–64.

Thompson, R.R., Walton, J.C., Bhalla, R., George, K.C., Beth, E.H., 2008. A primitive social circuit: vasotocin-substance P interactions modulate social behavior through a peripheral feedback mechanism in goldfish. *Eur. J. Neurosci.* 27, 2285–93.

Tobin, V.A., Hashimoto, H., Wacker, D.W., Takayanagi, Y., Langnaese, K., Caquineau, C., Noack, J., Landgraf, R., Onaka, T., Leng, G., Meddle, S.L., Engelmann, M., Ludwig, M., 2010. An intrinsic vasopressin system in the olfactory bulb is involved in social recognition. *Nature* 464, 413–417.

Ueta, Y., Fujihara, H., Serino, R., Dayanithi, G., Ozawa, H., Matsuda, K., Kawata, M., Yamada, J., Ueno, S., Fukuda, A., Murphy, D., 2005. Transgenic expression of enhanced green fluorescent protein enables direct visualization for physiological studies of vasopressin neurons and isolated nerve terminals of the rat. *Endocrinology* 146, 406–13.

Warne, J.M., Harding, K.E., Balment, R.J., 2002. Neurohypophysial hormones and renal function in fish and mammals. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* 132, 231–237.

IV- Discussão Geral

A discussão desta tese está dividida em três partes, em primeiro lugar irá ser abordado o papel da modulação social na reprodução, usando como suporte os resultados obtidos no artigo 1 (inserido no capítulo II- Modulação social da reprodução). Neste trabalho verificou-se que a alteração do ambiente social tem implicações na exibição do comportamento agonístico. Apesar de, esta alteração comportamental não ter sido acompanhada por uma alteração dos níveis fisiológicos de androgénios, estes esteroides podem ter tido uma função integradora fortalecendo a criação de padrões comportamentais em ambiente social instável.

A segunda secção será dedicada à discussão da temática do capítulo III (mecanismos neuroendócrinos reguladores do comportamento social) onde será discutido lado o papel dos androgénios e da AVT/IT como mecanismos reguladores do comportamento social. Os resultados obtidos no artigo 2 desta tese mostraram que a castração provocou uma descida dramática dos androgénios circulantes, no entanto, este procedimento não provocou alterações no comportamento agonístico, apesar de ter abolido completamente os comportamentos reprodutores (construção do ninho, corte e coloração nupcial). O papel da AVT/IT como mecanismos reguladores do comportamento social foram considerados tendo em conta os resultados obtidos no artigo 3 e 4 (inseridos no capítulo III). No artigo 3 os níveis de AVT e IT foram medidos em várias macro-áreas cerebrais e glândula pituitária, em machos dominantes e subordinados. Verificou-se que a AVT/IT está presente ao longo do cérebro, embora os bolbos olfativos se tenham destacado com valores mais altos de AVT. A pituitária apresentou valores superiores destes neuropéptidos comparativamente com as áreas cerebrais, tendo os machos subordinados contabilizado níveis superiores de AVT relativamente aos machos dominantes. O artigo 4 seguiu um paradigma experimental semelhante ao anterior, tendo sido medido neste caso o número e tamanho das células imunorreativas à AVT na área pré-ótica. Machos dominantes e subordinados apresentaram diferenças na arquitetura das células, com machos subordinados a aumentarem o tamanho das células.

1- Modulação social da reprodução

A reprodução é essencial para a sobrevivência das espécies. Em organismos em que a combinação sexual é fundamental para a produção de uma nova geração, os indivíduos têm que otimizar as suas estratégias para encontrar um parceiro sexual. Além dos benefícios inerentes ao investimento na reprodução, este processo tem custos associados tais como a criação de estruturas para a atração de um parceiro e o envolvimento em conflitos sociais para assegurar a dominância.

Em espécies sociais os indivíduos tem que ajustar a expressão do seu comportamento social de acordo com o ambiente social em que estão inseridos. Desta forma, alterações no ambiente social desencadeiam respostas comportamentais, de modo a adaptar os organismos à nova realidade.

A instabilidade social vs agressividade e resposta hormonal

Os resultados apresentados no artigo 1 mostram que o procedimento executado para gerar instabilidade social (troca dos machos dominantes entre aquários) provocou um aumento do comportamento agonístico. Por esta razão, pode ser assumido que os animais reconheceram a existência de ambientes sociais diferentes e responderam em consonância, com persistência da agressão (visível 24h após as manipulações) em ambiente social instável. Esta alteração no ambiente social simulou os períodos de maior desafio (e.g. luta por territórios, época de reprodução) normalmente enfrentados por espécies territoriais despoletando um aumento da agressão. A hipótese do desafio sugere que esta agressividade é modulada pela ação dos androgénios (Wingfield et al. 1990).

Na presença de um desafio relacionado com aquisição (ou manutenção) do estatuto social, os machos (com gónadas maduras e caracteres sexuais secundários desenvolvidos), aumentam os níveis de androgénios a partir de uma linha base reprodutiva, podendo atingir o máximo fisiológico (Wingfielg et al., 1990, 2000). O intenso desafio social, gerado por exemplo em densidades mais altas, encontra-se associado a níveis de androgénios mais elevados (Hirschenhauser e Oliveira, 2006). No caso da experiência que foi descrita e discutida no artigo 1, a alteração do ambiente social para um cenário de instabilidade não originou um aumento dos níveis de androgénios, apesar de os animais terem reagido com um aumento da agressividade nessa condição. Os machos *bystanders* também não

responderam fisiologicamente à alteração do ambiente social, apesar de estudos anteriores indicarem que a observação de uma luta é suficiente para despoletar uma resposta hormonal (Oliveira et al., 2001).

Seguidamente são discutidas algumas hipóteses que se podem ter em consideração para explicar a ausência de aumento hormonal. Em primeiro lugar, há que ter em consideração, que a amostra de plasma foi recolhida só no fim do período de manipulações, tendo passado 24 h após a última manipulação. Pode ter ocorrido uma resposta hormonal no período logo após as manipulações (ou eventualmente detetável após as primeiras manipulações) o que com este desenho experimental não foi possível observar. Outra razão para não se ter verificado um aumento de androgénios pode estar relacionado com a possibilidade de os indivíduos já terem atingido o seu máximo fisiológico durante a fase de formação dos grupos, já que outros estudos efetuados com esta espécie mostraram que, machos isolados ou na presença de uma fêmea (em que a ovulação foi induzida) aumentam os níveis de androgénios em resposta a uma intrusão territorial (Hirschenhauser et al., 2004). Esta hipótese é reforçada se tivermos em conta os estudos efetuados com esta espécie, em foram medidos níveis plasmáticos de androgénios. O artigo 2 desta dissertação mostra que a média dos valores de androgénios medidos situou-se entre os 3 e 4 ng/ml (os machos estavam apenas em contacto visual com fêmeas) e no artigo 4 os valores médios rondaram os 2 ng/ml para a testosterona e os 7,5 ng/ml para a 11CT (em aquário com livre contacto entre machos e fêmeas). Outros trabalhos efetuados com esta espécie, em contexto de desafio social, referem valores circulantes de androgénios mais ou menos na mesma ordem de grandeza dos trabalhos referidos anteriormente (Hirschenhauser et al., 2004; Oliveira et al., 2009; Keller-Costa et al., 2102). No estudo em discussão os valores médios medidos em machos dominantes (na fase de formação de grupos e após as manipulações) variaram entre os 4 e os 6 ng/ml para a testosterona e entre os 6 e os 7 ng/ml para a 11CT. Estes valores podem eventualmente corresponder ao máximo fisiológico para esta espécie e a resposta hormonal em contexto de instabilidade social não ter sido observada por esse motivo. Esta hipótese é também apoiada no facto de após o período de manipulações se ter verificado uma resposta hormonal por parte dos machos subordinados (aumento da testosterona em contexto social estável e aumento da 11CT em contexto social instável), indicadora de eventual oportunidade social. Uma vez que os machos subordinados diminuíram os níveis circulantes de androgénios durante a fase de formação de grupos, apresentavam condições fisiológicas para exibir esta resposta. Uma outra razão para a ausência de resposta hormonal, pode estar relacionada com os custos associados, considerando para este ponto que os machos podem eventualmente não ter atingido o máximo fisiológico. A manutenção de elevados níveis de androgénios apresenta custos

energéticos, relacionados com a taxa metabólica (Buchanan et al., 2001; Ros et al., 2004), tal como a escalada de uma interação agonística (Castro et al., 2006; Ros et al., 2006), além dos demais danos físicos e fisiológicos recorrentes de uma interação com altos níveis de agressividade (Bradbury and Vehrencamp, 1998; Neat et al., 1998). Estes custos têm sido vistos como um fator que pode explicar a variação individual nos níveis de androgénios. De facto, por exemplo no pardal (*Passer domesticus*), Lindström e colaboradores (2005), verificaram que uma mudança no ambiente social (manipulação do estatuto social) implicou um ajustamento dos custos às necessidades inerentes a essa mudança. Os autores mostraram que o custo de manter a posição social difere entre indivíduos, e está relacionada com o tamanho corporal, tendo-se notado que animais com menor tamanho aumentaram os custos (aumento da resposta ao estresse e redução de células mediadoras da resposta imunitária) quando foram mantidos experimentalmente como dominantes, enquanto animais maiores aumentaram os custos quando mantidos como subordinados. Foi também descrito, que indivíduos que aumentaram os custos enquanto dominantes, obtiveram uma posição baixa no grupo, enquanto os indivíduos que aumentam os custos como subordinados, conquistaram uma posição elevada (Lindström et al., 2005). Assim, em certos casos em que a hierarquia está bem estabelecida, a manutenção do estatuto social é uma vantagem, evitando o risco de incorrer em custos desnecessários. No trabalho experimental em discussão (artigo 1), nunca foi observada a mudança do estatuto social adquirido na fase de grupos, o que poderá ser entendido como uma opção dos indivíduos para minimizar eventuais custos associados, incluindo o aumento dos níveis de androgénios. Sabe-se que a manutenção de níveis elevados de testosterona por períodos prolongados tem custos (Ketterson et al., 2008; Wingfield et al., 1997), no entanto os indivíduos podem ativar mecanismos que diminuam estes custos. Wingfield e colaboradores, (2001) propuseram seis hipóteses (e.g. resistência, modulação social, intensidade ajustada a períodos curtos, hipersensibilidade, circulação de percursores e produção de neuroesteroides) relacionadas com possíveis adaptações dos mecanismos hormonais e comportamentais, explicando como é que os custos associados a altos níveis de testosterona no sangue podem ser evitados. Um dos mecanismos que pode ser ativado é a regulação da concentração plasmática através de proteínas de ligação (Wingfield et al., 2001). Recentemente foi descrita a existência de uma proteína de ligação com alta afinidade para estradiol e testosterona em fêmeas de Tilápia de Moçambique (Huertas et al., 2014). Em machos desta mesma espécie, também foram detetadas proteínas de ligação com sensibilidade para os androgénios, sendo a afinidade para a testosterona alta e a afinidade para a 11 CT muito baixa (Mar Huertas, comunicação pessoal). Apesar da amostragem de plasma só ter sido efetuada no final do período de manipulações (5 dias), a hipótese da não deteção de resposta hormonal poderá ter-se devido à ação de proteínas de ligação, como

um possível mecanismo de reduzir os custos de manutenção dos níveis de testosterona. No entanto, esta hipótese apenas se poderá aplicar à testosterona devido à falta de afinidade das proteínas no plasma para a 11 CT.

Um trabalho recente em *Kryptolebias marmoratus* mostrou que a propensão para ajustar uma decisão, após uma vitória ou derrota, depende do estado hormonal, ou seja, indivíduos com baixos níveis de cortisol, T e 11CT mostraram-se mais recetivos à influência das experiências de conflitos recentes, retendo a influência durante mais tempo do que indivíduos com altos níveis hormonais (Earley et al., 2013). Assim a “não resposta” hormonal (considerando a hipótese que o máximo fisiológico não foi atingido) por parte dos animais em contexto social instável (mais suscetíveis a situações imprevistas), pode ser considerada uma estratégia para, por um lado, não correr riscos relacionados com custos associados à manutenção de altos níveis de androgénios e, por outro, a manutenção da recetividade a novas experiências de forma a ajustar da melhor forma o seu comportamento.

As hormonas como agentes de integração fenotípica

De acordo com Schlichting e Smith, (2002), plasticidade fenotípica é “qualquer mudança nas características do organismo como resposta a um sinal ambiental”. Os sinais ambientais capazes que provocar uma resposta podem incluir fatores físicos (e.g. intensidade da luz, Schlichting, 2002) e sociais (e.g. coocorrência com espécies diferentes, Rodd et al., 1997). O ambiente heterogéneo pode também promover a flexibilidade das correlações entre determinadas estruturas/padrões na expressão de um determinado traço fenotípico (i.e. plasticidade da integração; e.g. correlação entre o peso das raízes/folhas e a produção de flores em ambientes diferentes, Schlichting, 1989; correlação entre o tempo de recuperação de ataque prévio e agressividade, apenas em machos secundários e não em animais hermafroditas Ednbrow and Croft, 2012; ver mais exemplos em Earley et al., 2012). No artigo 1, foi colocada como hipótese a alteração da estabilidade social como estímulo para aumentar a integração fenotípica (expressa pela correlação entre traços comportamentais) sendo as hormonas o agente integrador. Os resultados confirmaram a hipótese, uma vez que verificamos uma elevada integração fenotípica dada pela correlação entre a agressividade e os vários comportamentos reprodutores em ambiente social instável. As hormonas (especialmente os androgénios) podem ter agido como agente fisiológico integrador neste processo. Um estudo recente de Chang et al., (2012) também relaciona as hormonas como agentes responsáveis pela associação entre alguns comportamentos. Os

autores verificaram que a agressividade, *boldness* e a atividade exploratória apresentaram-se correlacionados, estando cada um deles correlacionado com a testosterona, incluindo a agressividade e *boldness* correlacionadas com o cortisol (Chang et al., 2012). A capacidade de aprendizagem (comportamento medido) não apresentou nenhum padrão de associação com os comportamentos referidos anteriormente, tal como não houve a associação com a testosterona e cortisol (Chang et al., 2012), mostrando assim que estas hormonas têm um papel importante como mediadores de padrões de associação específicos.

A criação de padrões de associação entre comportamentos, estimulada pela heterogeneidade do ambiente, como por exemplo em períodos de instabilidade social, onde a probabilidade de enfrentar desafios/oportunidades sociais aumenta, constitui uma ferramenta importante para maximizar o sucesso reprodutor, uma vez que promove a sincronização de comportamentos relevantes (e.g. agressão vs. comportamentos reprodutores) e entre esses comportamentos e as hormonas (integrador fenotípico). Em contraste, em períodos de estabilidade estes mecanismos são desativados conduzindo a uma dissociação entre comportamentos e hormonas, tal como se verificou neste trabalho e também recentemente no ciclídeo *Astatotilapia burtoni*, onde em situação de oportunidade social, os machos aumentam rapidamente a exibição de comportamentos específicos (agonístico e reprodutor) e os níveis de 11 CT, no entanto após a estabilidade, a exibição dos comportamentos e os níveis hormonais desassociaram-se. Outro estudo no mesmo ciclídeo, revelou que apenas os machos que enfrentam uma oportunidade social ativam de forma diferencial todas as áreas cerebrais relacionadas com os núdulos da SBN em comparação com dominantes e subordinados estáveis (Maruska et al., 2013) Os resultados do artigo 1 mostra-nos que apesar não haver diferença na variação dos níveis de androgénios entre ambiente social estável e instável (tendo em atenção que este resultado pode ter-se devido ao máximo fisiológico ter sido alcançado na fase de formação de grupos), os níveis hormonais circulantes são suficientes para criar associações entre comportamentos, estimuladas pela instabilidade social gerada.

Um estudo realizado recentemente em tilápia moçambicana (Olinda Almeida, dados não publicados) mostrou que após um período de interação agonista com a sua própria imagem no espelho (interação não resolvida, 15min), e posterior alteração do contexto social (interação com um macho vencedor/derrotado em aquário adjacente durante apenas 2 min), haver uma ativação diferencial em alguns núdulos da SBN (medidos pela expressão dos genes *c-fos* e *egr1*), indicando que os animais perceberam rapidamente as variações no contexto, respondendo com ativação neural específica. Estes dados sugerem que em

ambientes sociais instáveis os indivíduos alteram de uma forma dinâmica a ativação da SBN promovendo assim a variação no grau e padrão de associação dos traços comportamentais.

2- Os androgénios como mecanismos reguladores do comportamento social

Os androgénios são vistos como substâncias que modulam o comportamento social devido ao facto de machos dominantes/territoriais (mais agressivos e com condições para a exibição de comportamentos reprodutivos) apresentarem níveis superiores de androgénios (Hirschenhauser e Oliveira, 2006) e pelas experiências efetuadas com gonadectomia e administração exógena de androgénios (ver revisões, Gonçalves e Oliveira, 2010, Oliveira e Gonçalves, 2008), uma vez que a gónadas são a principal fonte destes esteroides.

Os androgénios/gónadas na mediação do comportamento reprodutor

Como já foi referido nesta dissertação, a relação entre os androgénios e o comportamento não é linear, com a resposta à castração a variar entre um decréscimo ou ausência de efeito e a administração exógena de androgénios a aumentar a exibição de construção do ninho, coloração nupcial e corte (Oliveira e Gonçalves, 2008). Na tilápia moçambicana, a castração implicou a abolição completa dos comportamentos reprodutores (coloração nupcial, construção do ninho e corte, artigo 2), que confirma o papel dos androgénios produzidos nas gónadas como mediadores do comportamento reprodutor, para além do seu efeito clássico na maturação das gónadas. Este resultado vai ao encontro da hipótese do desafio (Wingfield et al., 1990), confirmando que para a entrada na época de reprodução são necessários níveis basais de androgénios. Um estudo recente de Huertas e colaboradores (2011), conduzido nesta espécie, mostrou que a destruição e remoção do epitélio olfativo afetou diretamente a gónada: com redução do tecido gonadal (verificado pela diferença entre nos índices gonadossomáticos de machos anósmicos e sham); alteração na morfologia (tecidos cinzentos e rígidos em comparação com tecidos brancos e flexíveis em machos sham); diminuição dos níveis de androgénios; diminuição da espermatogénese e a abolição do comportamento reprodutor. Este efeito no comportamento associado a uma gónada disfuncional, reforça a importância das gónadas na exibição do comportamento reprodutor. No entanto, os autores discutem estes resultados sob o ponto de vista da falta de deteção de pistas químicas (devido à anosmia) como fator responsável pela eliminação do comportamento reprodutor, e de facto, na experiência do artigo 2, no dia da

gonadectomia a água do aquário experimental foi renovada (tal como nos grupos controlo) e desta forma os machos experimentais não tiveram acessos às pistas químicas anteriores à cirurgia. Todos os animais desta experiência se encontravam em aquários adjacentes ao estímulo visual: fêmeas (dia-2 a 9) e macho (dia 9), estando desta forma impossibilitados de ter acesso a outros estímulos químicos, para além dos seus próprios, tal como os machos dos grupos controlo, onde essa restrição não se mostrou limitadora. Além disso, um estudo conduzido por Miranda e colaboradores (2005) mostrou que a anosmia (nesta mesma espécie) apenas afetou o ajustamento da libertação de pulsos de urina ao contexto relevante, não tendo qualquer efeito no comportamento de corte. Desta forma, podemos concluir que inequivocamente o efeito da abolição dos comportamentos de corte é mediado pela gónada.

Efeito dos androgénios no comportamento agonístico:

“O contexto é quem mais ordena”- Parte I

Tal como no comportamento reprodutor, o efeito dos androgénios na exibição do comportamento agonístico não é consensual. A castração não produz um efeito claro em teleósteos, com casos que geralmente indicam uma diminuição ou ausência de efeito e apenas um caso em que se verificou um aumento (Gonçalves e Oliveira, 2010, Oliveira e Gonçalves, 2008). No entanto a administração exógena de androgénios está relacionada com um aumento do comportamento agonístico (Hirschenhauser e Oliveira, 2006).

A experiência descrita no artigo 2 foi concebida de forma a eliminar os androgénios da circulação sanguínea e para esse efeito foram adotadas duas medidas: após o período de adaptação ao paradigma experimental, durante a cirurgia toda a água do aquário experimental foi renovada de forma a reduzir ao máximo o contacto com os androgénios libertados para a água anteriormente; durante a cirurgia foi também adotada uma ação conservadora para a gónada, tendo sido a bexiga urinária danificada, dado ter-se revelado a impossibilidade de a gónada ser retirada na totalidade de outra forma.

Os níveis plasmáticos de androgénios no quarto e oitavo dias após a castração diminuíram cerca de 90% para a testosterona e quase 100% para a 11KT%. Estudos anteriores nesta espécie relacionaram os androgénios com a dominância, associada à exibição de maior agressividade (Oliveira et al. 1996), e com a mediação do efeito vencedor (Oliveira et al. 2009). No entanto, a castração não produziu qualquer efeito na exibição dos

comportamentos agonísticos, não validando assim o papel dos androgénios como mediadores deste comportamento, a menos que a pequena concentração de testosterona que ainda circula no plasma (cerca de 10%, eventualmente disponibilizada pelas globulinas) seja suficiente para mediar estes comportamentos. A meta-análise realizada por Hirschenhauser e Oliveira, (2006) mostrou um efeito da administração exógena de androgénios no comportamento agonístico, no entanto, a magnitude do efeito é variável de acordo com o sistema de acasalamento. Além disso, castrações em *Gasterosteus aculeatus* revelaram efeitos diferentes de acordo com o contexto. Em animais não territoriais (*pre-nesting*) a castração não produziu qualquer efeito em dias curtos, verificando-se um aumento em dias longos (Hoar, 1962) e um decréscimo em machos parentais (Baggerman, 1996, Wootton, 1970). Outros exemplos em aves mostram que a relação entre a agressão e a testosterona varia de acordo com a espécie, o local de nidificação (Wingfield and Hunt, 2002) e o contexto reprodutor (com sincronização na época de reprodução, associada a níveis mais elevados de testosterona, Dittami and Reyer, 1984; Logan and Wingfield, 1990). De acordo com estes exemplos e com os resultados obtidos no artigo 1 (androgénios com função integradora em contexto específico) e artigo 2 (androgénios são mediadores dos comportamentos reprodutores, mas não do comportamento agonístico), um dos cenários mais provável é a possibilidade dos indivíduos serem capazes de otimizar a produção de androgénios como resposta a um determinado contexto social. Por exemplo, em espécies que tem épocas sazonais para a reprodução, segundo a hipótese do desafio (Wingfield et al., 1990), os indivíduos aumentam os níveis de testosterona para o desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários, maturação das gónadas e exibição dos comportamentos reprodutores, nestes casos pode ser vantajoso o uso desse mecanismo para modular a resposta agonística durante esse contexto específico. Como já foi referido, os custos associados a níveis altos de testosterona são elevados pelo que fora desse contexto específico é mais vantajoso o recurso a outros mecanismos de regulação da agressividade. Canoine e Gwinner, (2002) corroboram desta hipótese, ao verificarem que a inibição dos mecanismos dos androgénios e estrogénios em simultâneo reduzem a agressão durante a época de reprodução, mas não fora da época de reprodução, sugerindo que o mecanismo dos androgénios e/ou estrogénios estão a modular a agressão apenas na época de reprodução. Assim, o facto da regulação dos comportamentos reprodutores e agonísticos estarem desacoplados (artigo 2), pode constituir uma vantagem, podendo os indivíduos recorrer a formas alternativas (mais eficazes ou menos custosas), dentro ou fora da época de reprodução. Este desacoplamento foi também verificado recentemente no ciclídeo *Amatitlania nigrofasciata*, onde a administração de um bloqueador de androgénios (flutamida) diminuiu o comportamento de corte não tendo qualquer efeito na exibição do comportamento agonístico (van Breukelen, 2013).

Outros mecanismos são apontados como moduladores da agressividade, entre os quais o cortisol, AVT e IT, hormona de crescimento, somostatina, dopamina, serotonina e GABA (Gonçalves e Oliveira, 2010; Oliveira e Gonçalves, 2008). O estudo dos fatores que influenciam o comportamento agonístico na tilápia, devem continuar a ser explorados, com especial relevância o efeito de cada um dos moduladores separadamente ou em conjunto na SBN

3- A AVT/IT como mecanismos reguladores do comportamento social

A AVT e IT e os seus homólogos AVP e OT têm sido vistos como agentes reguladores de mecanismos periféricos (osmorregulação, resposta cardiovascular e resposta ao stress) e centrais na regulação do comportamento social (Balment et al., 2006; Goodson and Bass, 2001; Kulczykowska, 2007). Estes neuropéptidos encontram-se muitas vezes associados a outros mecanismos, na modulação de determinados comportamentos (e.g. produção de ACTH via eixo HPI, Baker et al., 1996; produção de sinais elétricos pela GnRH via neurónios da AVT, Saito et al., 2003; reconhecimento social dependente de androgénios, Bluthe et al., 1990).

Uma vez que os dois trabalhos desta secção dão mais ênfase ao papel da AVT como mecanismo regulador do comportamento, a discussão também seguirá essa lógica.

“O contexto é quem mais ordena”- Parte II

Estatuto social/territorialidade:

O estatuto social (dominante ou subordinado) ou a territorialidade (territorial ou não territorial) define de forma semelhante dois fenótipos comportamentais distintos. Por um lado machos dominantes/territoriais, donos de um território que defendem de machos rivais, com acesso às fêmeas para acasalamento, por outro lado machos subordinados/não territoriais, não possuem território e não têm acesso aos ovos, a não ser que sigam táticas de fertilização furtiva. Os mecanismos envolvidos na estimulação da territorialidade, e por conseguinte na exibição dos comportamentos agonísticos e reprodutores essenciais para assegurar o estatuto e garantir o sucesso reprodutor, devem atuar diferencialmente uma vez que estes fenótipos apresentam condições externas e internas diferentes (e.g.

Hirschenhauser and Oliveira, 2006; Kroes et al., 2006; Maruska e Fernald, 2010c). Os neuropeptídeos AVT e IT têm sido associados à regulação do comportamento social. Os AVT/IT são produzidos na área pré-ótica e projetam por um lado para a neuro-hipófise onde podem ser libertados diretamente na corrente sanguínea ou para variadas zonas cerebrais extra hipotálamo, nomeadamente para a zona ventral do telencéfalo e mesencéfalo (Goodson and Bass, 2001; Goodson et al., 2003; Holmqvist and Ekström, 1995; Thompson et al., 2008). A funcionalidade destas projeções é reforçada com a presença de recetores (principalmente o recetor AVT V1a em várias regiões cerebrais (e.g. Lema, 2010), tal como pela presença dos neuropeptídeos ao longo do cérebro ilustrada no estudo apresentado no artigo 3. A concentração de AVT/IT ao longo do cérebro diferiu entre áreas cerebrais, estando presente em maiores concentrações na pituitária (considerada área cerebral para efeitos estatísticos), seguida dos bolbos olfativos e finalmente as restantes áreas (telencéfalo, diencéfalo, teto-ótico, cerebelo, e rombencéfalo). Na pituitária, foi doseada uma maior concentração de AVT em machos subordinados. Alguns estudos mostram que a associação entre AVT e o estatuto social depende da população neuronal. Machos subordinados apresentam geralmente uma maior atividade das células parvocelulares (pPOA) enquanto machos dominantes apresentam maior atividade das células gigantocelulares (gPOA). Em peixe zebra a diferença é marcante com machos dominantes (após 5 dias consecutivos de interação agonística) a expressar apenas células na área magnocelular da área pré-ótica (inclui células mPOA e gPOA) e subordinados a expressar apenas células pPOA (Larson et al., 2006). O mesmo padrão é também encontrado em *Astatotilapia burtoni*, onde machos dominantes apresentam uma expressão maior de células gPOA e menor de células pPOA em comparação com machos não territoriais (Greenwood et al., 2008). Em tilápia moçambicana machos dominantes e subordinados não apresentaram o padrão atrás descrito (artigo 4). O estatuto social não apresentou variação no número de células pPOA, mPOA e gPOA (sendo o número de células nos dois fenótipos inferiores ao número de células em fêmeas, com a exceção das células gPOA onde não variação entre fenótipos). Em relação ao tamanho dos corpos celulares, tal como verificado em outros estudos, células pPOA são menores em machos dominantes, no entanto células mPOA e gPOA também seguem este padrão, que especialmente para as células gPOA não vai ao encontro da literatura relacionada. De acordo com a literatura, as células pPOA projetam principalmente para a pituitária (Holmqvist and Ekström, 1995) e estão relacionadas com ações periféricas, como osmorregulação, metabolismo e resposta ao estresse (Balment et al., 2006), as células mPOA projetam para a pituitária e para regiões extra-hipotalâmicas (Saito et al., 2004) com implicações em processos fisiológicos e comportamentais e as células gPOA projetam principalmente para regiões extra-hipotalâmicas (Holmqvist and Ekström, 1995; Saito et al., 2004) com importantes

implicações na modulação do comportamento social (Dewan and Tricas, 2011). No entanto, no estudo descrito no artigo 4 verificou-se que as células mPOA e gPOA (em dominantes, subordinados e fêmeas) com marcadas projeções para o trato hipofisário (projetam também noutros sentidos tal como é documentado na literatura) e em especial fibras na zona onde existem as células gigantocelulares dirigem-se claramente para a pituitária. Estes dois estudos mostram que a elevada concentração de AVT na pituitária em comparação com as restantes áreas cerebrais (artigo 3) deve-se à contribuição dos 3 grupos de células (artigo 4). Nesta espécie, machos subordinados/não territoriais (com estatuto social estável mantido à mais de 5 semanas), apresentaram claramente concentrações de AVT superiores na pituitária, conferindo um papel importante como hormona periférica, tal como um papel a nível central uma vez que se encontra distribuída por todo o cérebro.

Efeito da AVT/IT no comportamento agonístico e reprodutor

Os efeitos da AVT/IT no comportamento agonístico são muito variáveis, aparentemente dependentes da espécie e do contexto (Goodson and Bass, 2001; Goodson et al. 2009, ver também exemplos descritos na introdução). São visíveis efeitos divergentes entre machos territoriais, que geralmente respondem com uma diminuição da agressão, e machos não territoriais associados a um aumento da agressão quando estimulados. Se analisarmos as dosagens usadas em machos territoriais (e.g. injeção peritoneal) podemos verificar que, quando estimulados com concentrações mais altas (e.g. 1 µg/g de massa corporal ou mais, Fibly et al., 2010; Lema e Nevitt., 2004; Semsar et al., 2001) o efeito é inibitório enquanto concentrações mais baixas despoleta ativação (0.5 µg/g de massa corporal, Santa gelo e Bass, 2006), no entanto a estimulação com 0.1 µg/g de massa corporal. Em *Cyprinodon nevadensis amargosae* não se mostrou inibitória (nem excitatória) para um comportamento agressivo de baixa intensidade (toque), tendo doses mais altas um efeito inibitório (Lema e Nevitt, 2004). Um estudo recente em peixe zebra, igualmente com administração exógena, numa lógica de dose-resposta, mostrou que tanto a AVT como a IT aumentaram a preferência social, embora dependente da dosagem (Braidá et al., 2012). Neste trabalho, foi verificado que concentrações de 0.5 µg/g (consideradas altas pelos autores) já se encontravam na “zona de inibição” (curva de dose resposta em “U” invertido) de preferência social. De facto, num estudo anterior, esta dosagem tinha sido utilizada para demonstrar um efeito da AVT na redução da agressão nesta espécie (Fibly et al., 2010). Desta forma, a análise dos efeitos das administrações exógenas de AVT e IT tem que ser analisada com muita cautela tendo em especial atenção o uso de doses altas uma vez que aparentemente os efeitos de preferência social são visíveis com doses mais baixas (Braidá et al., 2012).

As células gigantocelulares e magnocelulares da área pré-ótica têm sido associadas a comportamentos agonísticos/territoriais (Dewan et al., 2008, 2011a, 2011b; Larson et al., 2006), no entanto os resultados obtidos com a tilápia moçambicana (artigo 4) revelaram um sentido oposto, com machos subordinados a exibirem um aumento do tamanho das células dos três grupos (pPOA, mPOA e gPOA). O tamanho das células pPOA e mPOA, tal como o número de células pPOA encontram-se inversamente associadas ao comportamento agonístico, enquanto o tamanho dos três grupos celulares e o número de células mPOA estão positivamente correlacionadas com o comportamento de fuga (indicativo de submissão). Estes dados sugerem que doses altas (considerado assim neste caso, devido ao aumento da área das células), estão associadas à inibição da resposta agonística, indo ao encontro da literatura apresentada em relação à administração exógena. Atendendo ao facto de o estatuto social inicial de todos os machos incluídos no estudo (artigo4) ser dominante/territorial, foi a subordinação que provocou os efeitos nas células de AVT imunorreativas. Esta alteração sugere que os machos podem acionar o aumento de produção de AVT (aumentando o tamanho das células produtoras) para ajustar o seu comportamento em relação ao ambiente (note-se que os machos tinham estatutos estáveis que perduravam à pelo menos 5 semanas), que no caso dos machos subordinados inibiam claramente o acesso a um território (já que os machos que supostamente estariam na linha da frente para recuperar um território seriam os machos intermédios, existentes no grupo) e por conseguinte o acesso a fêmeas. Apesar do efeito da AVT no comportamento reprodutor aparecer relacionado com um efeito ativador (ver Introdução Geral), neste caso a solução mais adequada enquadra-se na exibição de comportamentos que incentivem um afastamento da zona de conflito (inibição da agressão e promoção de fuga). O efeito da AVT (administração intracerebral) na inibição da aproximação está descrito para peixe dourado (Thompson e Walton, 2004), onde foram administradas 2 doses (1 μg e 0.2 μg , ambas com efeitos inibitórios) consideradas pelos autores como dose alta e baixa respetivamente, no entanto um trabalho recente considerou a suposta dose baixa (0.2 μg) como dose alta com um efeito indutor da subordinação em truta (Backström e Winberg, 2009). Em *Gasterosteus aculeatus*, machos subordinados têm em geral níveis cerebrais de AVT (só o cérebro foi analisado, a pituitária não foi considerada) inferiores a machos dominantes, no entanto em situação de possível desafio social (associados a agressividade e coloração nupcial) registaram valores de AVT mais elevados comparativamente a subordinados não agressivos (Kleszczyńska et al., 2012). Este resultado está de acordo com vários exemplos ilustrados na introdução onde a administração da AVT parece ter um efeito na indução da territorialidade. Provavelmente em períodos de desafio social o efeito positivo como eventual mediador da agressividade prevalece sobre o efeito inibitório.

Uma clara evidência da influência das condições ambientais no tipo de resposta é o exemplo de *Thalassoma bifasciatum*, em que após estimulação com AVT respondeu com agressividade, num contexto que apresentava condições que permitiam que se tornasse territorial, enquanto em circunstâncias ambientais desfavoráveis, ou seja, com a presença de machos em fase de desenvolvimento terminal que impossibilitavam a ascensão, não produziu qualquer modificação no comportamento de inspeção, corte ou agressão (Semsar et al., 2004).

Um estudo recente (Olinda Almeida, dados não publicados) centrou-se no efeito da administração exógena de AVT no comportamento agonístico nesta espécie, considerando várias dosagens (1, 0.5, 0.25 e 0.125 µg/g de massa corporal) mostrou que a administração exógena de AVT só provocou um aumento da agressão com a dosagem mais baixa não se verificando inibição na dosagem mais altas. No entanto, este trabalho também incluiu um grupo de machos castrados que responderam com inibição da agressão para dose mais alta. Todos estes factos sugerem que a AVT funciona como neuromodulador do comportamento social, em que a resposta final é o resultado do ajustamento dos vários sistemas envolvidos a uma determinado contexto específico.

Efeito da AVT na antidiurese dos machos subordinados

O papel antidiurético da AVP nos mamíferos é a sua função mais conhecida. Em peixes a literatura apresenta algumas evidências claras do mesmo efeito com o seu homólogo AVT, com um decréscimo das taxas filtração glomerular e aumento da reabsorção de água, e consequentemente uma diminuição do fluxo de urina (Amer and Brown, 1995; Konno et al., 2010). Este efeito é particularmente relevante na tilápia moçambicana em função da utilização da urina como veículo de comunicação química, na comunicação com machos rivais e fêmeas. O armazenamento de urina e a potência olfativa da mesma (medida por eletro-olfatograma), está relacionada com a posição hierárquica, tendo os machos que ocupam posições mais altas, urina com potência olfativa superior (concentração de feromona) e armazenam maiores volumes de urina. A perda do território/estatuto social (cenário do artigo 4, já que todos os machos usados na experiência tinham o estatuto prévio de dominantes/territoriais) impossibilita o macho de ter acesso a fêmeas. Neste caso devem ser ativados mecanismos para inibir temporariamente esse comportamento (produção de urina direcionada para sinalização). Os elevados níveis de AVT na pituitária em machos subordinados (artigo 3) tal como o aumento do tamanho das células produtoras de AVT na área pré-ótica (artigo 4) e a associação entre o tamanho das células mPOA e o peso do rim (artigo 4), sugerem que machos subordinados aumentam a produção AVT (estimada pelo

aumento do tamanho das células) que é libertada na corrente sanguínea (ou armazenada na pituitária para uso futuro) atuando como hormona periférica no rim, diminuindo o fluxo de urina ou aumentando a absorção de água.

Um trabalho recente Keller-Costa et al. (2012) mostra que não há diferenças em relação ao fluxo urinário entre machos dominantes, subordinados e fêmeas em tilápia moçambicana. No entanto, estas medições foram efetuadas em contexto de isolamento social, não descartando assim a possibilidade de este mecanismo ser apenas ativado em contexto social.

Efeito da AVT no mecanismo do olfato

O efeito da AVP e OT no mecanismo do olfato está relacionado com o reconhecimento social, especialmente na memorização de odores em ratos. Em peixes, o olfato também tem um papel importante na comunicação intra-específica (Stacey and Sorensen, 2002), incluindo o reconhecimento social (Gerlach et al., 2008). Um estudo recente em peixe dourado (*Carassius auratus*) mostrou que a exposição à androstenediona (feromona libertada por machos e fêmeas durante a época de reprodução) provocou uma resposta central da AVT (expressão de AVT nas células pPOA), criando mais uma evidência clara de reconhecimento social e ativação da resposta (Mangiamele et al., 2013). Apesar de nunca terem sido identificadas populações neuronais de AVT nos bolbos olfativos em teleósteos, foram identificados recetores V1a nesta área (Kline et al., 2011), o que sugere uma atividade da AVT nesta área cerebral específica. A elevada concentração de AVT (e IT) nos bolbos olfativos verificada no artigo 3, reforçou a ideia de existência de uma função específica da AVT no mecanismo do olfato em peixes. Miranda e colaboradores (2005), mostraram que nesta espécie, o olfato tem um papel importante no reconhecimento do estado reprodutor das fêmeas, uma vez que machos anósmicos não respondem com um aumento do número de pulsos de urina na presença de fêmeas pré-ovuladas (pré-desova) por oposição a machos sham operados. Além deste efeito a nível comportamental, a remoção do epitélio olfativo também provoca um efeito fisiológico reduzindo espermatogénese (Huertas et al., 2011). A AVT/IT no bolbo olfativo pode ter um papel modulador no reconhecimento social, em processos fisiológicos relacionados com a reprodução (e.g. via interação entre o sistema GnRH e AVT, Saito et al., 2003) ou na libertação de neuro moduladores como acetilcolina, noradrenalina e GABA (apenas a OT) envolvidos na memorização de odores (Levy et al., 1995).

A tilápia moçambicana pode ser assim um excelente modelo para o estudo do efeito da AVT e IT como modulador do olfato, no reconhecimento e memória de estímulos sociais.

4- Interação entre mecanismos: AVT e Androgénios

Tanto a AVT como os androgénios são vistos como mediadores/moduladores do comportamento social. Em bodião de cabeça azul, o fenótipo neuronal da AVT é fortemente influenciado pelo estatuto social independentemente das gónadas, o que sugere um desacoplamento entre os dois sistemas. No entanto, em ratos a densidade fibras de neurónios de AVT no septo lateral (relacionado com o reconhecimento social) é reduzida pela castração e restaurada pela administração exógena de androgénios (Vries et al., 1984; ver também outras evidências da relação androgénios-AVT, De Vries and Panzica, 2006; van Leeuwen et al., 1985; De Vries et al., 1986; Zhou et al., 1994). A interação entre estes dois mecanismos é evidenciada na modulação da resposta de recetores olfativos por androgénios no reconhecimento de pistas sociais (Cardwell et al., 1995), onde o mecanismo da AVT no reconhecimento social atua de forma dependente dos androgénios (Bluthe et al., 1990).

O reconhecimento de pistas através do olfato é uma ferramenta essencial para o ajustamento da resposta na tilápia moçambicana. A falta de acesso a pistas químicas específicas apresenta repercussões, na comunicação química (Miranda et al., 2005) e no comportamento agonístico (Keller-Costa et al., 2012).

É provável que estes dois sistemas interajam no reconhecimento de pistas sociais nesta espécie. De acordo com a valência e magnitude do estímulo, a “maquinaria central” poderá ser ativada, modificando por exemplo o tamanho das células produtoras de AVT de forma a responder de acordo com o contexto social (e.g. aumento da produção de AVT associado a inibição comportamental em machos subordinados). A resposta irá variar de acordo com o tipo de ativação central (ativação diferencial dos nódulos da SBN) que por sua vez é influenciada pelo contexto interno e externo em que o animal se encontra.

5- Considerações finais.

Os vários trabalhos analisados e contextualizados sugerem que a exibição do comportamento agonístico em tilápia moçambicana, não está relacionado com os androgénios de forma dependente, no entanto em ambientes específicos (instabilidade social) os androgénios desempenham um papel importante como fatores de integração fortalecendo os padrões de associação entre comportamentos, otimizando assim a resposta comportamental. A exibição do comportamento reprodutor parece ser mediada por androgénios, sugerindo que a regulação do comportamento agonístico e reprodutor funciona de forma independente.

A subordinação (ou passagem a não territorial) provoca alterações na neuroanatomia do sistema produtor de AVT (área pré-ótica), de forma a aumentar a produção deste neuropéptido e ajustar o comportamento (com ações centrais periféricas) ao contexto social. A existência de AVT e IT nos bolbos olfativos sugere que estas hormonas estão envolvidas reconhecimento social (pistas sociais), com um papel importante na modulação do comportamento associado à comunicação química. A modulação da AVT por esta via (olfato) implica possivelmente uma interação com o mecanismo de regulação dos androgénios.

Apesar dos efeitos dos androgénios e neurotransmissores no comportamento, o contexto social assume o papel de destaque, funcionando como permissor ou impedidor dessa modulação.

Em suma, este trabalho permitiu esclarecer que os mecanismos de controlo de comportamentos agonísticos e reprodutores são, pelo menos parcialmente, independentes. Permitiu também explorar os possíveis mecanismos subjacentes ao controlo dos dois tipos de comportamentos sociais.

V - Referências Bibliográficas

- Alexander, R., 1974. The evolution of social behavior. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 5, 325–383.
- Almada, V., 1990. *Etologia da Reprodução e Cuidados Parentais nos Peixes Ósseos—Contributos para uma Análise Filogenética e Ecológica*. Universidade de Lisboa.
- Almada, V., Gonçalves, E., 1995. Courting females: ecological constraints affect sex roles in a natural population of the blennioid fish *Salarias pavo*. *Anim. Behav.* 49, 1125–1127.
- Almeida, O.G., Miranda, A., Frade, P., Hubbard, P.C., Barata, E.N., Canário, A.V.M., 2005. Urine as a social signal in the mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Chem. Senses* 30 Suppl 1, i309–10.
- Amer, S., Brown, J., 1995. Glomerular actions of arginine vasotocin in the in situ perfused trout kidney. *Am. J. Physiol.* ... 269, R775–R780.
- Amorim, M.C.P., Almada, V.C., 2005. The outcome of male–male encounters affects subsequent sound production during courtship in the cichlid fish *Oreochromis mossambicus*. *Anim. Behav.* 69, 595–601.
- Amorim, M.C.P., Fonseca, P.J., Almada, V.C., 2003. Sound production during courtship and spawning of *Oreochromis mossambicus*: male-female and male-male interactions. *J. Fish Biol.* 62, 658–672.
- Antunes, R. a, Oliveira, R.F., 2009. Hormonal anticipation of territorial challenges in cichlid fish. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 15985–9.
- Apfelbeck, B., Goymann, W., 2011. Ignoring the challenge? Male black redstarts (*Phoenicurus ochruros*) do not increase testosterone levels during territorial conflicts but they do so in response to gonadotropin-releasing hormone. *Proc. Biol. Sci.* 278, 3233–42.
- Apfelbeck, B., Mortega, K., Kiefer, S., 2011. Testosterone does not drive territorial aggression, but emphasizes vocal behaviours in the territorial response in breeding black redstarts, *Phoenicurus ochruros*. *Territ. Behav.*
- Backström, T., Schjolden, J., Øverli, Ø., Thörnqvist, P.-O., Winberg, S., 2011. Stress effects on AVT and CRF systems in two strains of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) divergent in stress responsiveness. *Horm. Behav.* 59, 180–6.
- Backström, T., Winberg, S., 2009. Arginine-vasotocin influence on aggressive behavior and dominance in rainbow trout. *Physiol. Behav.* 96, 470–5.
- Baerends, G.P., Baerends-van Roon, J.M., 1950. An introduction to the study of the ethology of the cichlid fishes. *Behav. Suppl.* III–243.

- Baker, B.I., Bird, D.J., Buckingham, J.C., 1996. In the trout, CRH and AVT synergize to stimulate ACTH release. *Regul. Pept.* 67, 207–10.
- Bakker, T.C.M., Bruijn, E.F.-D., Sevenster, P., 2010. Asymmetrical Effects of Prior Winning and Losing on Dominance in Sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*). *Ethology* 82, 224–229.
- Balment, R.J., Lu, W., Weybourne, E., Warne, J.M., 2006. Arginine vasotocin a key hormone in fish physiology and behaviour: a review with insights from mammalian models. *Gen. Comp. Endocrinol.* 147, 9–16.
- Balment, R.J., Warne, J.M., Tierney, M., Hazon, N., 1993. Arginine vasotocin and fish osmoregulation. *Fish Physiol. Biochem.* 11, 189–194.
- Barata, E.N., Fine, J.M., Hubbard, P.C., Almeida, O.G., Frade, P., Sorensen, P.W., Canário, A.V.M., 2008. A sterol-like odorant in the urine of Mozambique tilapia males likely signals social dominance to females. *J. Chem. Ecol.* 34, 438–49.
- Barata, E.N., Hubbard, P.C., Almeida, O.G., Miranda, A., Canário, A.V.M., 2007. Male urine signals social rank in the Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *BMC Biol.* 5, 54.
- Barlow, G.W., 1974. Contrasts in Social Behavior between Central American Cichlid Fishes and Coral-reef Surgeon Fishes. *Integr. Comp. Biol.* 14, 9–34.
- Barlow, G.W., 1991. Mating systems among cichlid fishes, in: Keenleyside, M.H.A. (Ed.), *Cichlid Fishes: Behaviour, Ecology and Evolution*. Chapman & Hall, London, pp. 173–190.
- Bastian, J., Schniederjan, S., Nguyenkim, J., 2001. Arginine Vasotocin Modulates a Sexually Dimorphic Communication Behavior in the Weakly Electric fish *APTERONOTUS LEPTORHYNCHUS*. *J. Exp. Biol.* 204, 1909–1923.
- Bell, A., 2001. Effects of an endocrine disrupter on courtship and aggressive behaviour of male three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. *Anim. Behav.* 62, 775–780.
- Bielsky, I.F., Hu, S.-B., Szegda, K.L., Westphal, H., Young, L.J., 2004. Profound impairment in social recognition and reduction in anxiety-like behavior in vasopressin V1a receptor knockout mice. *Neuropsychopharmacology* 29, 483–93.
- Bluthe, R.M., Schoenen, J., Dantzer, R., 1990. Androgen-dependent vasopressinergic neurons are involved in social recognition in rats. *Brain Res.* 519, 150–7.
- Borg, B., 1994. Androgens in teleost fishes. *Comp. Biochem. Physiol. Part C ...* 109, 219–245.
- Boulcott, P., Braithwaite, V., 2007. Colour perception in three-spined sticklebacks: sexes are not so different after all. *Evol. Ecol.* 21, 601–611.
- Bradbury, J., Gibson, R., 1983. Leks and mate choice, in: *Mate Choice*. Cambridge University press, Cambridge, pp. 109–138.

- Bradbury, J., Vehrencamp, S., 1998. Principles of animal communication. MA: Sinauer Associates, Inc, Sunderland.
- Braida, D., Donzelli, A., Martucci, R., Capurro, V., Busnelli, M., Chini, B., Sala, M., 2012. Neurohypophyseal hormones manipulation modulate social and anxiety-related behavior in zebrafish. *Psychopharmacology (Berl)*. 220, 319–30.
- Brantley, R.K., Marchaterre, M.A., Bass, A.H., 1993. Androgen effects on vocal muscle structure in a teleost fish with inter- and intra-sexual dimorphism. *J. Morphol.* 216, 305–18.
- Bruton, M.N., Bolt, R.E., 1975. Aspects of the biology of *Tilapia mossambica* Peters (Pisces: Cichlidae) in a natural freshwater lake (Lake Sibaya, South Africa). *J. Fish Biol.* 7, 423–445.
- Buchanan, K.L., Evans, M.R., Goldsmith, A.R., Bryant, D.M., Rowe, L. V, 2001. Testosterone influences basal metabolic rate in male house sparrows: a new cost of dominance signalling? *Proc. Biol. Sci.* 268, 1337–44.
- Burmeister, S.S., Kailasanath, V., Fernald, R.D., 2007. Social dominance regulates androgen and estrogen receptor gene expression. *Horm. Behav.* 51, 164–70.
- Butler, A., Hodos, W., 2005. Comparative vertebrate neuroanatomy: evolution and adaptation. Wiley. com.
- Caldwell, H.K., Lee, H.-J., Macbeth, A.H., Young, W.S., 2008. Vasopressin: Behavioral roles of an “original” neuropeptide. *Prog. Neurobiol.* 84, 1–24.
- Canoine, V., Gwinner, E., 2002. Seasonal Differences in the Hormonal Control of Territorial Aggression in Free-Living European Stonechats. *Horm. Behav.* 41, 1–8.
- Cardwell, J.R., Stacey, N.E., Lang, S.L.C., Tan, E.S.P., McAdam, D.S.O., 1995. Androgen increases olfactory receptor response to a vertebrate sex pheromone. *J. Comp. Physiol. A* 176, 55–61.
- Carneiro, L., Oliveira, R., 2003. The effect of arginine vasotocin on courtship behaviour in a blennioid fish with alternative reproductive tactics. *Fish Physiol. ...* 28, 241–243.
- Carrasco, G., Kar, L. Van de, 2003. Neuroendocrine pharmacology of stress. *Eur. J. Pharmacol.* 463, 235–272.
- Carruth, L.L., Jones, R.E., Norris, D.O., 2002. Cortisol and Pacific Salmon: A New Look at the Role of Stress Hormones in Olfaction and Home-stream Migration. *Integr. Comp. Biol.* 42, 574–81.
- Castro, N., Albert, F.H.R., Becker, K., Oliveira, R.F., 2006. Metabolic Costs of Aggressive Behaviour in the Siamese Fighting Fish , *Betta splendens*. *Aggress. Behav.* 32, 474–480.
- Chang, C., Li, C.-Y., Earley, R.L., Hsu, Y., 2012. Aggression and related behavioral traits: the impact of winning and losing and the role of hormones. *Integr. Comp. Biol.* 52, 801–13.

- Chase, I., Bartolomeo, C., Dugatkin, L., 1994. Aggressive interactions and inter-contest interval: how long do winners keep winning?. *Anim. Behav.* 48, 393–400.
- Clotfelter, E., Rodriguez, A., 2006. Behavioral changes in fish exposed to phytoestrogens. *Environ. Pollut.* 44, 833–839.
- Clotfelter, E.D., Paolino, A.D., 2003. Bystanders to contests between conspecifics are primed for increased aggression in male fighting fish. *Anim. Behav.* 66, 343–347.
- Clutton-Brock, T., Price, O., MacColl, A., 1992. Mate retention, harassment, and the evolution of ungulate leks. *Behav. Ecol.*
- Connaughton, M.A., Taylor, M.H., 1995. Effects of Exogenous Testosterone on Sonic Muscle Mass in the Weakfish, *Cynoscion regalis*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 100, 238–245.
- De Vries, G.J., Panzica, G.C., 2006. Sexual differentiation of central vasopressin and vasotocin systems in vertebrates: different mechanisms, similar endpoints. *Neuroscience* 138, 947–55.
- Deco, G., Rolls, E., 2005. Neurodynamics of biased competition and cooperation for attention: a model with spiking neurons. *J. Neurophysiol.* 94, 295–313.
- Dewan, a K., Maruska, K.P., Tricas, T.C., 2008. Arginine vasotocin neuronal phenotypes among congeneric territorial and shoaling reef butterflyfishes: species, sex and reproductive season comparisons. *J. Neuroendocrinol.* 20, 1382–94.
- Dewan, A.K., Ramey, M.L., Tricas, T.C., 2011a. Arginine vasotocin neuronal phenotypes, telencephalic fiber varicosities, and social behavior in butterflyfishes (Chaetodontidae): potential similarities to birds and mammals. *Horm. Behav.* 59, 56–66.
- Dewan, A.K., Ramey, M.L., Tricas, T.C., 2011b. Arginine vasotocin neuronal phenotypes, telencephalic fiber varicosities, and social behavior in butterflyfishes (Chaetodontidae): potential similarities to birds and mammals. *Horm. Behav.* 59, 56–66.
- Dewan, A.K., Tricas, T.C., 2011. Arginine vasotocin neuronal phenotypes and their relationship to aggressive behavior in the territorial monogamous multiband butterflyfish, *Chaetodon multicinctus*. *Brain Res.* 1401, 74–84.
- Dittami, J.P., Reyer, H.-U., 1984. A Factor Analysis of Seasonal, Behavioral, Hormonal and Body Weight Changes in Adult Male Barheaded Geese, *Anser Indicus*. *Behaviour* 90, 114–123.
- Doutrelant, C., 2001. The effect of an audience on intrasexual communication in male Siamese fighting fish, *Betta splendens*. *Behav. Ecol.* 12, 283–286.
- Dugatkin, L., 1997. Winner and loser effects and the structure of dominance hierarchies. *Behav. Ecol.* 8, 583–587.
- Earley, R.L., Hanninen, A.F., Fuller, A., Garcia, M.J., Lee, E.A., 2012. Phenotypic plasticity and integration in the mangrove rivulus (*Kryptolebias marmoratus*): a prospectus. *Integr. Comp. Biol.* 52, 814–27.

- Earley, R.L., Hsu, Y., 2008. Reciprocity between endocrine state and contest behavior in the killifish, *Kryptolebias marmoratus*. *Horm. Behav.* 53, 442–451.
- Earley, R.L., Lu, C.-K., Lee, I.-H., Wong, S.C., Hsu, Y., 2013. Winner and loser effects are modulated by hormonal states. *Front. Zool.* 10, 6.
- Edenbrow, M., Croft, D., 2012. Sequential hermaphroditism and personality in a clonal vertebrate: the mangrove killifish. *Behav. Processes.*
- Fang, L.-Y., Quan, R.-D., Kaba, H., 2008. Oxytocin facilitates the induction of long-term potentiation in the accessory olfactory bulb. *Neurosci. Lett.* 438, 133–7.
- Filby, A.L., Paull, G.C., Hickmore, T.F., Tyler, C.R., 2010. Unravelling the neurophysiological basis of aggression in a fish model. *BMC Genomics* 11, 498.
- Forlano, P.M., Deitcher, D.L., Bass, A.H., 2005. Distribution of estrogen receptor alpha mRNA in the brain and inner ear of a vocal fish with comparisons to sites of aromatase expression. *J. Comp. Neurol.* 483, 91–113.
- Frade, P., Hubbard, P.C., Barata, E.N., Canario, A.V.M., 2002. Olfactory sensitivity of the Mozambique tilapia to conspecific odours. *J. Fish Biol.* 61, 1239–1254.
- Francis, R.C., Soma, K., Fernald, R.D., 1993. Social regulation of the brain-pituitary-gonadal axis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 7794–7798.
- Fryer, G., Iles, T., 1972. The cichlid fishes of the Great Lakes of Africa: their biology and evolution. Oliver and Boyd, Edinburgh.
- Fryer, J.N., Boudreault-Chateauvert, C., Kirby, R.P., 1985. Pituitary afferents originating in the paraventricular organ (PVO) of the goldfish hypothalamus. *J. Comp. Neurol.* 242, 475–84.
- Galhardo, L., Almeida, O., Oliveira, R.F., 2009. Preference for the presence of substrate in male cichlid fish: Effects of social dominance and context. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 120, 224–230.
- Galhardo, L., Almeida, O., Oliveira, R.F., 2011a. Measuring motivation in a cichlid fish: An adaptation of the push-door paradigm. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 130, 60–70.
- Galhardo, L., Correia, J., Oliveira, R.F., 2008. The effect of substrate availability on behavioural and physiological indicators of welfare in the African cichlid (*Oreochromis mossambicus*). *Anim. Welf.* 17, 1–16.
- Galhardo, L., Vital, J., Oliveira, R.F., 2011b. The role of predictability in the stress response of a cichlid fish. *Physiol. Behav.* 102, 367–72.
- Galhardo, L., Vitorino, A., Oliveira, R.F., 2012. Social familiarity modulates personality trait in a cichlid fish. *Biol. Lett.* 8, 936–8.
- Gilchrist, B.J., Tipping, D.R., Hake, L., Levy, a, Baker, B.I., 2000. The effects of acute and chronic stresses on vasotocin gene transcripts in the brain of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Neuroendocrinol.* 12, 795–801.

- Gillies, G.E., Linton, E.A., Lowry, P.J., 1982. Corticotropin releasing activity of the new CRF is potentiated several times by vasopressin. *Nature* 299, 355–357.
- Godwin, J., Thompson, R., 2012. Nonapeptides and social behavior in fishes. *Horm. Behav.* 61, 230–8.
- Gonçalves, D., Alpedrinha, J., Teles, M., Oliveira, R., 2007. Endocrine control of sexual behavior in sneaker males of the peacock blenny *Salaria pavo*: Effects of castration, aromatase inhibition, testosterone and. *Horm. Behav.* 51, 534–541.
- Gonçalves, D., Oliveira, R., 2010. Hormones and sexual behavior of teleost fishes, in: Norris, D., Lopez, K. (Eds.), *Hormones and Reproduction of Vertebrates*. Academic Press, pp. 119–147.
- Goodson, J., 2005. The vertebrate social behavior network: evolutionary themes and variations. *Horm. Behav.* 48, 11–22.
- Goodson, J.L., Bass, a H., 2000. Vasotocin innervation and modulation of vocal-acoustic circuitry in the teleost *Porichthys notatus*. *J. Comp. Neurol.* 422, 363–79.
- Goodson, J.L., Bass, a H., 2001. Social behavior functions and related anatomical characteristics of vasotocin/vasopressin systems in vertebrates. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 35, 246–65.
- Goodson, J.L., Evans, A.K., Bass, A.H., 2003. Putative isotocin distributions in sonic fish: relation to vasotocin and vocal-acoustic circuitry. *J. Comp. Neurol.* 462, 1–14.
- Goodson, J.L., Kabelik, D., Schrock, S.E., 2009. Dynamic neuromodulation of aggression by vasotocin: influence of social context and social phenotype in territorial songbirds. *Biol. Lett.* 5, 554–6.
- Greenwood, A.K., Wark, A.R., Fernald, R.D., Hofmann, H. a, 2008. Expression of arginine vasotocin in distinct preoptic regions is associated with dominant and subordinate behaviour in an African cichlid fish. *Proc. Biol. Sci.* 275, 2393–402.
- Grens, K.E., Greenwood, A.K., Fernald, R.D., 2005. Two visual processing pathways are targeted by gonadotropin-releasing hormone in the retina. *Brain. Behav. Evol.* 66, 1–9.
- Grober, M.S., George, A. a, Watkins, K.K., Carneiro, L. a, Oliveira, R.F., 2002. Forebrain AVT and courtship in a fish with male alternative reproductive tactics. *Brain Res. Bull.* 57, 423–5.
- Hausmann, H., Meyerhof, W., Zwieters, H., Lederis, K., Richter, D., 1995. Teleost isotocin receptor: structure, functional expression, mRNA distribution and phylogeny. *FEBS Lett.* 370, 227–30.
- Hirschenhauser, K., Oliveira, R.F., 2006. Social modulation of androgens in male vertebrates: meta-analyses of the challenge hypothesis. *Anim. Behav.* 71, 265–277.
- Hirschenhauser, K., Ros, A., Taborsky, M., Oliveira, R., Canário, A., 2008. Social context may affect urinary excretion of 11-ketotestosterone in African cichlids. *Behaviour* 145, 1367–1388.

- Hirschenhauser, K., Taborsky, M., Oliveira, T., Canário, A. V.M., Oliveira, R.F., 2004. A test of the “challenge hypothesis” in cichlid fish: simulated partner and territory intruder experiments. *Anim. Behav.* 68, 741–750.
- Holmes, C.L., Landry, D.W., Granton, J.T., 2003. Science review: Vasopressin and the cardiovascular system part 1--receptor physiology. *Crit. Care* 7, 427–34.
- Holmgvist, B., Ekström, P., 1995. Hypophysiotrophic systems in the brain of the Atlantic salmon. Neuronal innervation of the pituitary and the origin of pituitary dopamine and nonapeptides identified by. *J. Chem. Neuroanat.* 8, 125–145.
- Holmqvist, B.I., Ekström, P., 1995. Hypophysiotrophic systems in the brain of the Atlantic salmon. Neuronal innervation of the pituitary and the origin of pituitary dopamine and nonapeptides identified by means of combined carbocyanine tract tracing and immunocytochemistry. *J. Chem. Neuroanat.* 8, 125–45.
- Hsu, Y., Wolf, L.L., 1999. The winner and loser effect: integrating multiple experiences. *Anim. Behav.* 57, 903–910.
- Huertas, M., Almeida, O.G., Canário, Adelino V.M. Hubbard, P.C., n.d. Tilapia male urinary pheromone stimulates female reproduction. *J. Comp. Endocrinol.*
- Huertas, M., Pereira, D., Silva, S., Canário, A.V.M., Hubbard, P.C., 2011. Anosmia impairs reproduction in mozambique tilapia. *Indian J. Sci. Technol.*, 9th ISRP Issue 4, 151–152.
- Insel, T.R., Young, L.J., 2000. Neuropeptides and the evolution of social behavior. *Curr. Opin. Neurobiol.* 10, 784–9.
- Keller-Costa, T., Lopes, O.S., Lima, M., Hubbard, P.C., Acovella, A., Canário, A.V.M., Almeida, O., Barata, E.N., 2012. Muscular hypertrophy of urinary bladders in dominant tilapia facilitates the control of aggression through urinary signals. *Behaviour* 149, 953–975.
- Kendrick, K., Levy, F., Keverne, E., 1992. Changes in the sensory processing of olfactory signals induced by birth in sleep. *Science* (80-.). 256, 833–836.
- Ketterson, E.D., Nolan, V., Cawthorn, M.J., Parker, P.G., Ziegenfus, C., 2008. Phenotypic engineering: using hormones to explore the mechanistic and functional bases of phenotypic variation in nature. *Ibis* (Lond. 1859). 138, 70–86.
- Kleszczyńska, A., Sokołowska, E., Kulczykowska, E., 2012. Variation in brain arginine vasotocin (AVT) and isotocin (IT) levels with reproductive stage and social status in males of three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 175, 290–6.
- Kleszczyńska, A., Vargas-Chacoff, L., Gozdowska, M., Kalamarz, H., Martínez-Rodríguez, G., Mancera, J.M., Kulczykowska, E., 2006. Arginine vasotocin, isotocin and melatonin responses following acclimation of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) to different environmental salinities. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 145, 268–73.

- Konno, N., Hyodo, S., Yamaguchi, Y., Kaiya, H., Miyazato, M., Matsuda, K., Uchiyama, M., 2009. African lungfish, *Protopterus annectens*, possess an arginine vasotocin receptor homologous to the tetrapod V2-type receptor. *J. Exp. Biol.* 212, 2183–93.
- Konno, N., Hyodo, S., Yamaguchi, Y., Matsuda, K., Uchiyama, M., 2010. Vasotocin/V2-type receptor/aquaporin axis exists in African lungfish kidney but is functional only in terrestrial condition. *Endocrinology* 151, 1089–96.
- Kroes, R., Panksepp, J., Burgdorf, J., Otto, N., Moskal, J., 2006. Modeling depression: social dominance–submission gene expression patterns in rat neocortex. *Neuroscience* 137, 37–39.
- Kulczykowska, E., 1997a. Response of circulating arginine vasotocin and isotocin to rapid osmotic challenge in rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol. Part A ...* 118, 773–778.
- Kulczykowska, E., 1997b. Response of Circulating Arginine vasotocin and Isotocin to Rapid Osmotic Challenge in Rainbow Trout. *Comp. Biochem. Physiol.* 118A, 773–778.
- Kulczykowska, E., 2001. Responses of circulating arginine vasotocin , isotocin , and melatonin to osmotic and disturbance stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiol. Biochem.* 24, 201–206.
- Kulczykowska, E., 2007. Arginine vasotocin and isotocin: towards their role in fish osmoregulation, in: *Osmoregulation*. Science Publisher, Enfield (NH).
- Lan, Y., Hsu, Y., 2011. Prior contest experience exerts a long-term influence on subsequent winner and loser effects. *Front Zool* 8.
- Larson, E.T., O'Malley, D.M., Melloni, R.H., 2006. Aggression and vasotocin are associated with dominant-subordinate relationships in zebrafish. *Behav. Brain Res.* 167, 94–102.
- Leitz, T., 1987. Social control of testicular steroidogenic capacities in the Siamese fighting fish *Betta splendens* Regan. *J. Exp. Zool.* 244, 473–478.
- Lema, S.C., 2010. Identification of multiple vasotocin receptor cDNAs in teleost fish: sequences, phylogenetic analysis, sites of expression, and regulation in the hypothalamus and gill in response to hyperosmotic challenge. *Mol. Cell. Endocrinol.* 321, 215–30.
- Lema, S.C., Nevitt, G. a, 2004. Exogenous vasotocin alters aggression during agonistic exchanges in male Amargosa River pupfish (*Cyprinodon nevadensis amargosae*). *Horm. Behav.* 46, 628–37.
- Levavi-Sivan, B., Biran, J., Fireman, E., 2006. Sex steroids are involved in the regulation of gonadotropin-releasing hormone and dopamine D2 receptors in female tilapia pituitary. *Biol. Reprod.* 75, 642–650.
- Lévy, F., Gervais, R., Kindermann, U., Orgeur, P., 1990. Importance of B-noradrenergic receptors in the olfactory bulb of sheep for recognition of lambs. *Behav. Neurosci.* 104, 464–469.

- Levy, F., Kendrick, K., Goode, J., 1995. Oxytocin and vasopressin release in the olfactory bulb of parturient ewes: changes with maternal experience and effects on acetylcholine, γ -aminobutyric acid. *Brain Res.* 669, 197–206.
- Liley, N., Stacey, N., 1983. Hormones, pheromones, and reproductive behavior in fish, in: *Fish Physiology*.
- Lim, M.M., Young, L.J., 2006. Neuropeptidergic regulation of affiliative behavior and social bonding in animals. *Horm. Behav.* 50, 506–17.
- Lindström, K., Hasselquist, D., Wikelski, M., 2005. House sparrows (*Passer domesticus*) adjust their social status position to their physiological costs. *Horm. Behav.* 48, 311–320.
- Logan, C.A., Wingfield, J.C., 1990. Autumnal territorial aggression is independent of plasma testosterone in mockingbirds. *Horm. Behav.* 24, 568–581.
- Mahlmann, S., Meyerhof, W., Hausmann, H., Heierhorst, J., Schönrock, C., Zwiars, H., Lederis, K., Richter, D., 1994. Structure, function, and phylogeny of [Arg8]vasotocin receptors from teleost fish and toad. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 1342–5.
- Mahometa, M., Domjan, M., 2005. Classical conditioning increases reproductive success in Japanese quail, *Coturnix japonica*. *Anim. Behav.* 69, 983–9.
- Mancera, J., Vargas-Chacoff, L., 2008. High density and food deprivation affect arginine vasotocin, isotocin and melatonin in gilthead sea bream (*Sparus auratus*). ... *Physiol. A* ... 149, 92–97.
- Mangiamele, L.A., Keeney, A.D.T., D'Agostino, E.N., Thompson, R.R., 2013. Pheromone exposure influences preoptic arginine vasotocin gene expression and inhibits social approach behavior in response to rivals but not potential mates. *Brain. Behav. Evol.* 81, 194–202.
- Martos-Sitcha, J.A., Gregório, S.F., Carvalho, E.S.M., Canario, A.V.M., Power, D.M., Mancera, J.M., Martínez-Rodríguez, G., Fuentes, J., 2013. AVT is involved in the regulation of ion transport in the intestine of the sea bream (*Sparus aurata*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 193, 221–228.
- Maruska, K.P., Fernald, R.D., 2010a. Reproductive status regulates expression of sex steroid and GnRH receptors in the olfactory bulb. *Behav. Brain Res.* 213, 208–17.
- Maruska, K.P., Fernald, R.D., 2010b. Behavioral and physiological plasticity: rapid changes during social ascent in an African cichlid fish. *Horm. Behav.* 58, 230–40.
- Maruska, K.P., Fernald, R.D., 2010c. Steroid receptor expression in the fish inner ear varies with sex, social status, and reproductive state. *BMC Neurosci.* 11, 58.
- Maruska, K.P., Zhang, a, Neboori, a, Fernald, R.D., 2013. Social opportunity causes rapid transcriptional changes in the social behaviour network of the brain in an African cichlid fish. *J. Neuroendocrinol.* 25, 145–57.

- Matos, R., McGregor, P., 2002. The effect of the sex of an audience on male-male displays of Siamese fighting fish (*Betta splendens*). *Behaviour* 139, 1211–1222.
- Miranda, A., Almeida, O.G., Hubbard, P.C., Barata, E.N., Canário, a V.M., 2005. Olfactory discrimination of female reproductive status by male tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *J. Exp. Biol.* 208, 2037–43.
- Moreira, P., Pulman, K., Pottinger, T., 2004. Extinction of a conditioned response in rainbow trout selected for high or low responsiveness to stress. *Horm. Behav.* 46, 460–467.
- Neat, F., Taylor, A., Huntingford, F., 1998. Proximate costs of fighting in male cichlid fish: the role of injuries and energy metabolism. *Anim. Behav.* 55, 875–882.
- Neil, E., 1966. Observations on the behavior of *Tilapia mossambica* (Pisces, Cichlidae) in Hawaiian ponds. *Copeia*. 50–56.
- Newman, S., 1999. The medial extended amygdala in male reproductive behavior a node in the mammalian social behavior network. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 877, 242–257.
- O’Connell, L. a, Hofmann, H. a, 2011. The vertebrate mesolimbic reward system and social behavior network: a comparative synthesis. *J. Comp. Neurol.* 519, 3599–639.
- O’Connell, L.A., Hofmann, H.A., 2012. Social status predicts how sex steroid receptors regulate complex behavior across levels of biological organization. *Endocrinology* 153, 1341–51.
- Oliveira, R., Canário, A., 2000. Hormones and social behavior of cichlid fishes: a case study in the Mozambique tilapia, in: Coleman, R.M., Leibel, W. (Eds.), *Cichlid Research: State of the Art. Journal of Aquaculture and Aquatic Sciences*. pp. 109–129.
- Oliveira, R.F., 2009. Social behavior in context: Hormonal modulation of behavioral plasticity and social competence. *Integr. Comp. Biol.* 49, 423–40.
- Oliveira, R.F., 2012. Social plasticity in fish: integrating mechanisms and function. *J. Fish Biol.* 81, 2127–50.
- Oliveira, R.F., Almada, V.C., 1998a. Androgenization of dominant males in a cichlid fish: androgens mediate the social modulation of sexually dimorphic traits. *Ethology* 104, 841–858.
- Oliveira, R.F., Almada, V.C., 1998b. Mating tactics and male – male courtship in the lek-breeding cichlid *Oreochromis mossambicus*. *J. Fish Biol.* 52, 1115–1129.
- Oliveira, R.F., Almada, V.C., Canario, A.V.M., 1996. Social modulation of sex steroid concentrations in the urine of male cichlid fish *Oreochromis mossambicus*. *Horm. Behav.* 30, 2–12.
- Oliveira, R.F., Gonçalves, D.M., 2008. Hormones and Social Behaviour of Teleost Fish, in: C. Magnhagen, V.A. Braithwaite, E.F.& B.G.K. (Ed.), *Fish Behaviour*. Science Publishers Inc., Enfield, pp. 61–150.

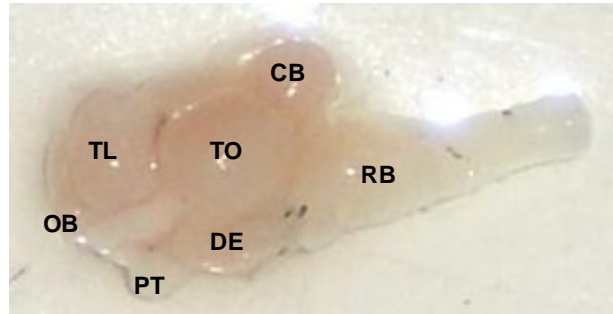
- Oliveira, R.F., Lopes, M., Carneiro, L.A., Canário, A.V.M., 2001. Watching fights raises fish hormone levels. *Nature* 409.
- Oliveira, R.F., McGregor, P.K., Latruffe, C., 1998. Know thine enemy: fighting fish gather information from observing conspecific interactions. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 265, 1045–1049.
- Oliveira, R.F., Silva, A., Canário, A.V.M., 2009. Why do winners keep winning? Androgen mediation of winner but not loser effects in cichlid fish. *Proc. Biol. Sci.* 276, 2249–56.
- Oliveira, R.F., Silva, J.F., Simões, J.M., 2011. Fighting zebrafish: characterization of aggressive behavior and winner-loser effects. *Zebrafish* 8, 73–81.
- Oyegbile, T., Marler, C., 2005. Winning fights elevates testosterone levels in California mice and enhances future ability to win fights. *Horm. Behav.* 48, 259–267.
- Parhar, I.S., Tosaki, H., Sakuma, Y., Kobayashi, M., 2001. Sex differences in the brain of goldfish: gonadotropin-releasing hormone and vasotocinergic neurons. *Neuroscience* 104, 1099–110.
- Parikh, V.N., Clement, T.S., Fernald, R.D., 2006. Androgen level and male social status in the African cichlid, *Astatotilapia burtoni*. *Behav. Brain Res.* 166, 291–5.
- Pavlidis, M., Sundvik, M., Chen, Y., Panula, P., 2011. Adaptive changes in zebrafish brain in dominant–subordinate behavioral context. *Behav. Brain Res.* 225, 529–537.
- Peter, R.E., Yu, K.-L., Marchant, T.A., Rosenblum, P.M., 1990. Direct neural regulation of the teleost adenohypophysis. *J. Exp. Zool.* 256, 84–89.
- Pissonnier, D., Thiery, J.C., Fabre-Nys, C., Poindron, P., Keverne, E.B., 1985. The importance of olfactory bulb noradrenalin for maternal recognition in sheep. *Physiol. Behav.* 35, 361–363.
- Planas, J., Athos, J., 2000. Regulation of ovarian steroidogenesis in vitro by follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone during sexual maturation in salmonid fish. *Biol. Reprod.* 62, 1262–1269.
- Rodd, F., Reznick, D., Sokolowski, M., 1997. Phenotypic plasticity in the life history traits of guppies: responses to social environment. *Ecology* 78, 419–433.
- Ros, A., Becker, K., Canario, A., Oliveira, R., 2004. Androgen levels and energy metabolism in *Oreochromis mossambicus*. *J. Fish Biol.* 65, 895–905.
- Ros, A.F.H., Becker, K., Oliveira, R.F., 2006. Aggressive behaviour and energy metabolism in a cichlid fish, *Oreochromis mossambicus*. *Physiol. Behav.* 89, 164–70.
- Rose, J.D., Moore, F.L., 2002. Behavioral neuroendocrinology of vasotocin and vasopressin and the sensorimotor processing hypothesis. *Front. Neuroendocrinol.* 23, 317–41.
- Rutte, C., Taborsky, M., Brinkhof, M.W.G., 2006. What sets the odds of winning and losing? *Trends Ecol. Evol.* 21, 16–21.

- Saito, D., Hasegawa, Y., Urano, A., 2003. Gonadotropin-releasing hormones modulate electrical activity of vasotocin and isotocin neurons in the brain of rainbow trout. *Neurosci. Lett.* 351, 107–110.
- Santangelo, N., Bass, A.H., 2006. New insights into neuropeptide modulation of aggression: field studies of arginine vasotocin in a territorial tropical damselfish. *Proc. Biol. Sci.* 273, 3085–92.
- Santangelo, N., Bass, A.H., 2010. Individual behavioral and neuronal phenotypes for arginine vasotocin mediated courtship and aggression in a territorial teleost. *Brain. Behav. Evol.* 75, 282–91.
- Satake, H., Takuwa, K., Minakata, H., Matsushima, O., 1999. Evidence for Conservation of the Vasopressin/Oxytocin Superfamily in Annelida. *J. Biol. Chem.* 274, 5605–5611.
- Schlichting, C., Smith, H., 2002. Phenotypic plasticity: linking molecular mechanisms with evolutionary outcomes. *Evol. Ecol.* 16, 189–211.
- Schlichting, C.D., 1989. Phenotypic plasticity in Phlox. *Oecologia* 78, 496–501.
- Schlichting, C.D., 2002. Editorial: Phenotypic plasticity in plants. *Plant Species Biol.* 17, 85–88.
- Schreibman, M., 1986. Pituitary gland, in: Pang, P., Schreibman, M. (Eds.), *Vertebrate Endocrinology: Fundamentals and Biomedical Implications*. Academic Press, San Diego, pp. 11–55.
- Schulz, R., Miura, T., 2002. Spermatogenesis and its endocrine regulation. *Fish Physiol. Biochem.* 26, 43–56.
- Schulz, R., Vischer, H., Cavaco, J., 2001. Gonadotropins, their receptors, and the regulation of testicular functions in fish. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* 129, 407–417.
- Semsar, K., Godwin, J., 2003. Social influences on the arginine vasotocin system are independent of gonads in a sex-changing fish. *J. Neurosci.* 23, 4386–93.
- Semsar, K., Kandel, F.L., Godwin, J., 2001. Manipulations of the AVT system shift social status and related courtship and aggressive behavior in the bluehead wrasse. *Horm. Behav.* 40, 21–31.
- Semsar, K., Perreault, H. a N., Godwin, J., 2004. Fluoxetine-treated male wrasses exhibit low AVT expression. *Brain Res.* 1029, 141–7.
- Sokołowska, E., Kleszczyńska, A., Kalamarz-Kubiak, H., Arciszewski, B., Kulczykowska, E., 2013. Changes in brain arginine vasotocin, isotocin, plasma 11-ketotestosterone and cortisol in round goby, *Neogobius melanostomus*, males subjected to overcrowding stress during the breeding season. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 165, 237–242.

- Strüssmann, C., Nakamura, M., 2002. Morphology, endocrinology, and environmental modulation of gonadal sex differentiation in teleost fishes. *Fish Physiol. Biochem.* 26, 13–29.
- Taborsky, B., Oliveira, R.F., 2012. Social competence: an evolutionary approach. *Trends Ecol. Evol.* 27, 679–88.
- Temeles, E.J., 1994. The role of neighbours in territorial systems: when are they “dear enemies”? *Anim. Behav.* 47, 339–350.
- Thompson, R.R., Walton, J.C., 2004. Peptide effects on social behavior: effects of vasotocin and isotocin on social approach behavior in male goldfish (*Carassius auratus*). *Behav. Neurosci.* 118, 620–6.
- Thompson, R.R., Walton, J.C., Bhalla, R., George, K.C., Beth, E.H., 2008. A primitive social circuit: vasotocin-substance P interactions modulate social behavior through a peripheral feedback mechanism in goldfish. *Eur. J. Neurosci.* 27, 2285–93.
- Tyler, C., Pottinger, T., Coward, K., 1997. Salmonid follicle-stimulating hormone (GtH I) mediates vitellogenic development of oocytes in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Biol. Reprod.* 57, 1238–1244.
- Van Breukelen, N.A., 2013. Androgen receptor antagonist impairs courtship but not aggressive behavior in the monogamous cichlid, *Amatitlania nigrofasciata*. *Horm. Behav.* 63, 527–532.
- Van Kesteren, R.E., Smit, a B., De Lange, R.P., Kits, K.S., Van Golen, F. a, Van Der Schors, R.C., De With, N.D., Burke, J.F., Geraerts, W.P., 1995. Structural and functional evolution of the vasopressin/oxytocin superfamily: vasopressin-related conopressin is the only member present in *Lymnaea*, and is involved in the control of sexual behavior. *J. Neurosci.* 15, 5989–98.
- Van Leeuwen, F.W., Caffé, A.R., Vries, G.J. de, 1985. Vasopressin cells in the bed nucleus of the stria terminalis of the rat: sex differences and the influence of androgens. *Brain Res.*
- Vries, G. De, Buijs, R., Sluiter, A., 1984. Gonadal hormone actions on the morphology of the vasopressinergic innervation of the adult rat brain. *Brain Res.* 298, 141–145.
- Vries, G. De, Duetz, W., Buijs, R., 1986. Effects of androgens and estrogens on the vasopressin and oxytocin innervation of the adult rat brain. *Brain Res.* 399, 296–302.
- Warne, J., 2001. Cloning and Characterization of an Arginine Vasotocin Receptor from the Euryhaline Flounder *Platichthys flesus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 122, 312–319.
- Wells, A., Anderson, W.G., Hazon, N., 2002. Development of an in situ perfused kidney preparation for elasmobranch fish: action of arginine vasotocin. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 282, R1636–42.
- Wendelaar-Bonga, S., 1997. The stress response in fish. *Physiol. Rev.* 77, 591–625.

- Weybourne, E., Warne, J.M., Hentschel, H., Elger, M., Balment, R.J., 2005. Renal morphology of the euryhaline flounder (*Platichthys flesus*): distribution of arginine vasotocin receptor. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1040, 521–3.
- White, S.A., Nguyen, T., Fernald, R.D., 2002. Social regulation of gonadotropin-releasing hormone. *J. Exp. Biol.* 205, 2567–2581.
- Wickens, J.R., Budd, C.S., Hyland, B.I., Arbuthnott, G.W., 2007. Striatal contributions to reward and decision making: making sense of regional variations in a reiterated processing matrix. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1104, 192–212.
- Wigger, A., Sánchez, M.M., Mathys, K.C., Ebner, K., Frank, E., Liu, D., Kresse, A., Neumann, I.D., Holsboer, F., Plotsky, P.M., Landgraf, R., 2004. Alterations in central neuropeptide expression, release, and receptor binding in rats bred for high anxiety: critical role of vasopressin. *Neuropsychopharmacology* 29, 1–14.
- Wingfield, J.C., 2005. A continuing saga: the role of testosterone in aggression. *Horm. Behav.* 48, 253–255.
- Wingfield, J.C., Hegner, R.E., Dufty, A.M.J., Ball, G.F., 1990. The “Challenge Hypothesis”: Theoretical Implications for Patterns of Testosterone Secretion, Mating Systems, and Breeding Strategies. *Am. Nat.* 136., 829–846.
- Wingfield, J.C., Hunt, K.E., 2002. Arctic spring: hormone–behavior interactions in a severe environment. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* 132, 275–286.
- Wingfield, J.C., Jacobs, J., Hillgarth, N., 1997. Ecological Constraints and the Evolution of Hormone-Behavior Interrelationships. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 807, 22–41.
- Wingfield, J.C., Lynn, S.E., Soma, K.K., 2001. Avoiding the “Costs” of Testosterone: Ecological Bases of Hormone-Behavior Interactions. *Brain. Behav. Evol.* 57, 239–251.
- Ydenberg, R.C., Giraldeau, L.A., Falls, J.B., 1988. Neighbours, strangers, and the asymmetric war of attrition. *Anim. Behav.* 36, 343–347.
- Zhou, L., Blaustein, J., Vries, G. De, 1994. Distribution of androgen receptor immunoreactivity in vasopressin-and oxytocin-immunoreactive neurons in the male rat brain. *Endocrinology*.

Anexo 1- Fotografia: A divisão do cérebro em macro-áreas.



Representação da localização das macro-áreas cerebrais. No artigo 3 o cérebro foi dissecado em macro áreas que foram posteriormente processadas e a AVT e IT doseadas recorrendo a cromatografia líquida de alta precisão (HPLC).

Abreviatura- nomenclatura

OB- bolbos olfativos (olfactory bulbs)

TL- telencéfalo (telencephalon)

DE- diencéfalo (diencephalon)

OT- teto ótico (optic tectum)

CB- cerebelo (cerebellum)

RB- rombócéfalo / HB- hindbrain

PT- pituitária (pituitary)