

CARACTERIZAÇÃO MORFO-FUNCIONAL DA ADENO-HIPÓFISE DE *Oncorhynchus mykiss*,
ESTERILIZADA OU MASCULINIZADA PELA 17 α -METILTESTOSTERONA

[Morphological and functional characterization of the sterilized or masculinized *Oncorhynchus mykiss* adenohypophysis, by 17 α -methyltestosterone]

Maria Paula MELLITO DA SILVEIRA¹
Yara Aiko TABATA^{2,3}
Marcos Guilherme RIGOLINO²

RESUMO

Trutas arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*, nas primeiras fases do desenvolvimento, foram submetidas a 6 diferentes tratamentos com 17 α -metiltestosterona em banhos de imersão e/ou adicionada à ração alimentar. Aos dois anos de idade, na estação reprodutiva (inverno), todos os exemplares foram coletados, e através da análise macroscópica das gônadas foram classificados em animais normais, esterilizados e sexualmente revertidos. Nessa ocasião, foram fixadas as hipófises para análise histoquímica e contagens das células produtoras de gonadotropinas (GtH I e GtH II), bem como, das produtoras de somatotropina (StH). As hipófises de animais esterilizados apresentaram na *pars distalis proximalis* grande número de células cromófobas, que se presume produtoras de GtH I, enquanto nos animais normais e revertidos, por estarem em estádios avançados de maturação, as células basófilas, que se presume produtoras de GtH II, foram as mais abundantes. As células acidófilas, que se admite como sendo as produtoras de StH, também presentes na *pars distalis proximalis*, ocorreram em maior número nas hipófises de peixes esterilizados quando comparadas às dos outros dois grupos (animais normais e revertidos).

PALAVRAS-CHAVE: truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*, hipófise, esterilização, reversão sexual

ABSTRACT

Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, were submitted to 6 different treatments with 17 α -methyltestosterone, either by diluted in immersion baths and/or added to the diet during the early stages of development. During the reproductive season (winter), two years old animals were collected and their gonadal stage macroscopically analized in order to obtain the rates of occurrence of normal, sterilized and sex reverted specimens. In this occasion the pituitary gland was fixed for histochemical analysis and somatotropic (StH) and gonadotropic cells (GtH I and GtH II) counting were carried out. The *pars distalis proximalis* in the pituitaries of the sterile fishes, showed chromophobes cells (presumably GtH I producer), while normal and sex reverted fishes, due to their being in final maturational stages, showed basophilic cells (presumably GtH II producer) in larger quantities. The acidophilic cells (presumably StH producer), also present in the *pars distalis proximalis*, occurred in greater numbers in the pituitaries of the sterile fishes when compared to their numbers in the other two groups (normal and sterile fishes).

KEY WORDS: rainbow-trout, *Oncorhynchus mykiss*, pituitary, sterilization, sex reversal

1. INTRODUÇÃO

A hipófise encontra-se envolvida nos processos de desenvolvimento gonadal em todos os vertebrados. A gametogênese e a diferenciação das características sexuais secundárias são bloqueadas pela hipofisectomia em peixes juvenis, como por exemplo em *Poe-*

cilia reticulata (PANDEY, 1969); como também é conhecido que a proliferação de células endócrinas gonadais durante a reversão sexual em *Monopterus* sp está relacionada a uma maior atividade das células hipofisárias produtoras de gonadotropinas (CHAN & YEUNG,

(1) Pós Graduanda - Departamento de Fisiologia Geral - Instituto de Biociências - USP - São Paulo - SP

(2) Pesquisador Científico - Estação Experimental de Salmonicultura "Dr. Ascânia de Faria" - Instituto de Pesca - CPA/SAA

(3) Endereço/Address: Caixa Postal 361 - Campos do Jordão - SP - CEP 12460-000 - FONE/FAX (0122) 63-1021

1983). Deve-se citar ainda os resultados obtidos por FOUCHER; LE BAIL; LE GAC (1992), que trabalhando com machos de trutas arco-fris, observaram drástica diminuição tanto nos hormônios hipofisários quanto nos esteroídis, logo após a hipofisectionia.

Embora a estrutura e a fisiologia da hipófise da truta e de salmonídeos em geral sejam amplamente conhecidas (OLIVEREAU, 1954; McBRIDE & van OVERBEEK, 1969; HOL-

MES & BALL, 1974; GIELEN et alii, 1982; LEUNISSEN et alii, 1982; OLIVEREAU & NAGAHAMA, 1983; van OORDT & PEUTE, 1983;), não foram observados estudos correlacionando a estrutura hipofisária aos tratamentos hormonais aplicados no controle da sexualidade.

Assim sendo, o presente trabalho teve por objetivo caracterizar morfo-funcionalmente a adeno-hipófise de truta arco-fris esterilizada ou masculinizada pela 17 α -metiltestosterona.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os exemplares de truta arco-fris utilizados neste estudo foram provenientes da Estação Experimental de Salmonicultura do Instituto de Pesca, localizada no município de Campos do Jordão-SP (22°45' S e 45°30' W). Para a indução da esterilidade reprodutiva e da masculinização de fêmeas genotípicas foi usado o hormônio 17 α -metiltestosterona (MT) da SIGMA, nos estágios iniciais do desenvolvimento, administrado de duas maneiras: dissolvido na água do aquário (em dois banhos de imersão) e/ou na ração, isto é, um grupo recebeu o tratamento hormonal através de banho e posteriormente na ração, enquanto que o outro grupo recebeu o hormônio apenas na ração.

Os banhos de imersão, com duração de 2 horas cada, foram conduzidos em um recipiente contendo uma solução de 100 μ g de MT por litro de água, tendo sido aplicados no 3º e no 10º dia após a eclosão. A administração pela via oral foi feita na dose de 0 mg, 25 mg e 50 mg de MT por quilo de ração, fornecida durante 60 dias, a partir do 35º dia decorridos da eclosão, conforme esquema abaixo.

Tratamentos	A	B	C	D	E	F
Banhos de imersão	+	+	+	-	-	-
MT (mg) / kg ração	-	25	50	-	25	50

Ao completarem 2 anos de idade, isto é, na estação reprodutiva de 1989, ocasião em

que estariam maduros sexualmente, os animais dos diferentes tratamentos foram sacrificados em solução de benzocaina (1:10 000), pesados e através da observação das gônadas foram classificados em 3 grupos: animais normais (machos e fêmeas com testículos e ovários normais, respectivamente), fêmeas genotípicas masculinizadas ou revertidas (ovotestis ou testículo globoso) e animais esterilizados (gônadas indiferenciadas). Em seguida, após a exposição do encéfalo, foram coletadas as hipófises (ligadas ou não ao encéfalo), fixadas em líquido de BOUIN, onde permaneceram por 24 horas, quando foram transferidas para álcool 70%.

O procedimento rotineiro de técnicas histológicas foi utilizado e além das colorações pela Hematoxilina-Eosina (HE) e pelo tricrômico de Mallory, foram ainda empregadas reações histoquímicas para polissacarídeos, a saber: Ácido Periódico-Schiff (APS) (McMANNUS, 1946); APS após acetilação para bloqueio dos grupos vic-glicóis e afins e posterior saponificação (McMANNUS & CASON, 1950); APS após tratamento pela alfa amilase, ou então pela amilase salivar (LISON, 1960) para glicogênio. Azul de Alcâni (AA) pH 0,5, para polissacarídeos ácidos sulfatados (LEV & SPICER, 1964); AA pH 2,5, para polissacarídeos ácidos sulfatados e carboxilados (STEEDMAN, 1950); AA pH 2,5 após metilação e posterior saponificação

(SPICER & LILLIE, 1959); AA pH 2,5 e posterior reação ao APS (VIALLI, 1955) para evidenciação simultânea de polissacarídeos ácidos e neutros.

Na avaliação do número de células da *pars distalis proximalis* (PDP), da adeno-hipófise, utilizou-se ocular integradora Kpl (8%) de Carl Zeiss, de 100 pontos, num aumento final de 760 X. Analisaram-se 15 cortes histológicos sendo 5 de animais esterilizados, 5 de fêmeas genotípicas revertidas para machos funcionais e 5 de animais normais. Em cada corte registraram-se, em cada campo microscópico, o número total de células basófilas (coradas em azul pela coloração do

tricrômico de Mallory), de acidófilas (coradas em vermelho) e de cromófobas em toda a extensão da região em estudo.

Tendo havido variação no número de campos microscópicos analisados, nos diferentes grupos, padronizaram-se os dados para apresentação sempre em relação a um campo (área de $14400 \mu\text{m}^2$).

Para análise quantitativa das células da PDP fez-se a Análise de Variância (SNEDECOR & COCHRAN, 1980) e para comparação entre as médias o Teste de Tukey (PIMENTEL GOMES, 1982), sendo os limites de significância fixados em $P < 0,05$.

3. RESULTADOS

Na truta arco-fris, a hipófise é classificada, quanto ao tipo morfológico, como "leptobasic", ou seja, está presa ao hipotálamo por um pedúnculo nervoso. A adeno-hipófise é globular ou ovalada apresentando três regiões distintas: a *pars distalis rostral* (PDR), a *pars distalis proximalis* (PDP) e a *pars intermedia* (PI), embora não haja limites nítidos entre elas. Essas três regiões estão situadas em orientação aproximadamente dorso-ventral. A neuro-hipófise forma um eixo alongado mais ou menos vertical, tendo em torno as três regiões de adeno-hipófise arranjadas em camadas. A PI é mais ventral, com a PDP imediatamente acima e a PDR formando um anel incompleto envolvendo anteriormente a neuro-hipófise (FIGURA 1a).

A PDR é composta por folículos. Nesta região estão presentes células acidófilas alongadas não positivas ao APS e ao AA. Um segundo tipo de células está presente na região da PDR que limita com a PDP; estas são basófilas, apresentam-se mais positivas ao AA que ao APS, tais células possuem forma triangular ou fusiforme. Nessa região limítrofe ainda estão presentes folículos com

células acidófilas. Em animais maduros estão presentes algumas células basófilas, globosas, positivas ao APS e AA, semelhante àquelas encontradas na PDP.

Na PDP observaram-se alguns folículos, mas ela é, na sua maioria, formada por corações celulares. Nessa região observam-se células acidófilas, negativas ao APS e ao AA, sendo um segundo tipo formado por células globosas, apresentando núcleos grandes, citoplasma granular sem vacúolo. Estas células são intensamente basófilas na coloração tricrônica de Mallory e positivas ao APS e AA porém, mais positivas ao APS que ao AA.

Ocorre ainda, um outro tipo celular basófilo fusiforme, em pequeno número, que estão situadas entre as células globosas (também basófilas) na porção rostro-dorsal da PDP, dispostas em camadas, na maioria das vezes ao redor do ramo nervoso. Finalmente, estão presentes algumas células que não apresentam afinidade aos corantes utilizados (cromófobas). (FIGURA 1b)

A terceira região, a PI, juntamente com os ramos neuro-hipofisários, ocupa cerca de dois terços do volume total hipofisário e apre-

senta células pouco coradas, levemente basófilas, negativas ao APS e ao AA, dispos- tas em grupos de arranjo cordonal, separados por ramos da neuro-hipófise.

Para animais revertidos e esterilizados observaram-se as mesmas características ci- tadas acima para os tipos celulares das três regiões adeno-hipofisárias; as diferenças ocorreram no número de células acidófilas, basófilas e cromófobas da PDP (FIGURA 1c e

1d), como será visto a seguir.

Os resultados obtidos nas contagens das células basófilas, acidófilas e cromófobas es- tão mostrados na TABELA 1.

Para o tipo celular acidófilo, o maior nú- mero de células foi encontrado em animais esterilizados, apresentando diferença signifi- cativa em relação aos demais grupos (nor- mais e revertidos). Entre os animais normais e revertidos não se observou diferença signifi-

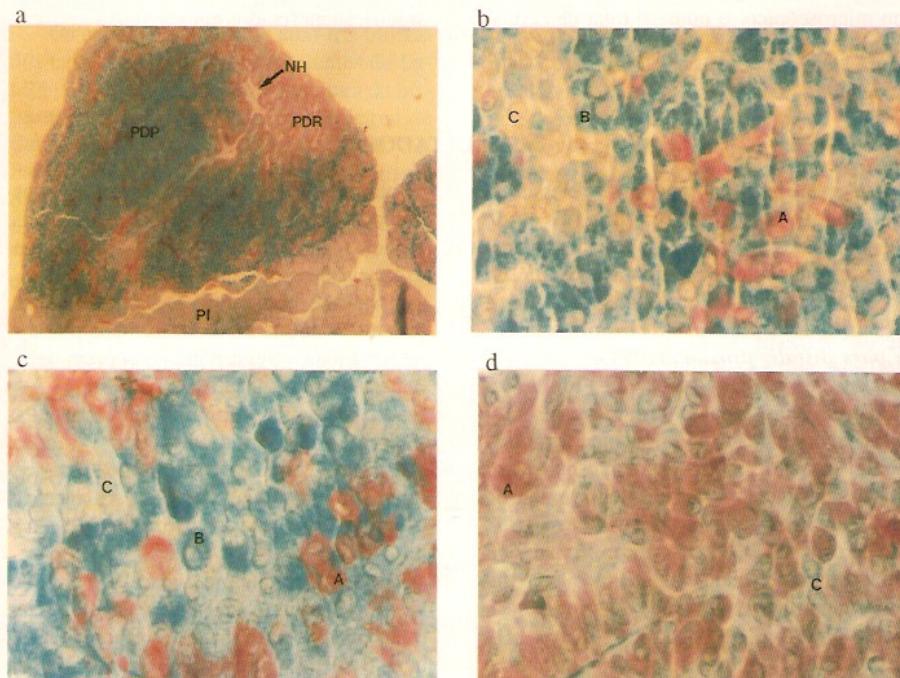


FIGURA 1 - Cortes histológicos de hipófises de truta arco-bris, *Oncorhynchus mykiss*. Trieromíco de Mallory
a - Localização da neuro-hipófise de (NH) e das regiões da adeno-hipófise: *pars distalis proximalis* (PDP); *pars distalis rostral* (PDR); *pars intermedia* (PI). $\pm 25X$
b - Região da PDP de animais normais. Células acidófilas (A), células basófilas (B), células cromófobas (C). $\pm 515X$
c - Região da PDP de animais revertidos. Células acidófilas (A), células basófilas (B), células cromófobas (C). $\pm 530X$
d - Região da PDP de animais esterilizados. Células acidófilas (A) e células cromófobas (C). $\pm 515X$

MELLITO DA SILVEIRA, M.P.; TABATA, Y.A.; RIGOLINO, M.G. 1995 Caracterização morfo-funcional da adeno-hipófise de *Oncorhynchus mykiss*, esterilizadas ou masculinizadas pela 17α - metiltestosterona. *B. Inst. Pesca*, São Paulo, 22(1): 85 - 92, jan./jun.

TABELA 1

Número médio e desvios padrões de células basófilas, acidófilas e cromófobas, obtidas na *pars distalis proximalis* da adeno-hipófise (em $14400 \mu\text{m}^2$) de truta arco-fris, *Oncorhynchus mykiss* normais, revertidos e esterilizados, aos dois anos de idade

Células	Animais Normais (n=5)	Animais Revertidos (n=5)	Animais Esterilizados (n=5)
Basófilas	$86,26 \pm 4,82$	$104,95 \pm 4,78$	$4,56 \pm 1,36$
Acidófilas	$77,10 \pm 3,06$	$84,94 \pm 4,26$	$114,54 \pm 2,48$
Cromófobas	$24,60 \pm 4,48$	$12,91 \pm 1,94$	$103,72 \pm 6,34$

cativa.

A análise das células basófilas, globosas com positividade ao APS e AA, mostrou haver diferença significativa entre os três grupos sexuais, sendo que nos animais revertidos estavam presentes um maior número de células, enquanto nos esterilizados esse número foi bastante reduzido.

Finalmente para as células cromófobas,

há diferença significativa entre animais normais e esterilizados, bem como, entre animais esterilizados e revertidos, não havendo diferença significativa entre animais normais e revertidos. Nota-se que nos animais esterilizados o número de células cromófobas é muito maior que o de células basófilas, inverso do que ocorre nos animais normais e revertidos.

4. DISCUSSÃO

Quanto à estrutura da glândula, nos teleósteos, embora haja variações na forma e na localização de alguns tipos celulares, de acordo com as várias espécies, as similaridades são mais evidentes (HOLMES & BALL, 1974; van OORDT & PEUTE, 1983).

O arranjo folicular da PDR, assim como é visto nos salmonídeos, é característico dos teleósteos primitivos e parece estar relacionado à filogenia. As células acidófilas, não positivas aos APS e AA, presentes nessa região, são descritas na literatura como células prolactíneas (VAL-SELLA, 1973, van OORDT & PEUTE, 1983). Ainda, na região limfótrofe entre a PDR e PDP, as células fusiformes, basófilas, apresentando maior positividade ao AA que ao APS, têm sido identificadas como tireotrópicas (OLIVEREAU, 1976).

Na PI, as células levemente basófilas, negativas aos APS e AA, são responsáveis

pela produção do hormônio melanócito estimulante (FOLLENIUS & DOERR-SCHOTT, 1978; van OORDT & PEUTE, 1983; RAND-WEAVER; BAKER; KAWAUCHI, 1991).

Maior atenção deu-se para as células da PDP por estarem relacionadas, as acidófilas ao crescimento (FOLLENIUS & DOERR-SCHOTT, 1978) e as basófilas e cromófobas à reprodução (OLIVEREAU, 1976; NOZAKI et alii, 1990b).

Como mostrado, anteriormente, há uma diferença significativa no número de células StH entre os animais esterilizados e dos outros dois grupos (revertidos e normais). OLIVEREAU (1967 a), observando este tipo celular em fêmeas de enguias, demonstrou a redução de seu número em animais sexualmente maduros, o que deve estar relacionado à redução do crescimento que acompanha normalmente a maturação sexual em vários teleósteos (HOLMES & BALL, 1974). No pre-

MELLITO DA SILVEIRA, M.P.; TABATA, Y.A.; RIGOLINO, M.G. 1995 Caracterização morfo-funcional da adeno-hipófise de *Oncorhynchus mykiss*, esterilizadas ou masculinizadas pela 17 α - metiltestosterona. *B. Inst. Pesca*, São Paulo, 22(1): 85 - 92, jan./jun.

sente experimento, os animais esterilizados mostraram pesos superiores quando comparados aos animais que apresentaram maturação sexual. Tal resultado parece reforçar a hipótese de que os animais esterilizados crescem mais que os animais normais durante o período reprodutivo.

Considerando-se as células basófilas, globosas, fortemente positivas ao APS e AA, bem como, as cromófobas, ambas parecem estar relacionadas aos processos reprodutivos.

Havia até recentemente, uma controvérsia quanto à presença de um ou dois tipos celulares gonadotrópicos. Alguns autores (HOLMES & BALL, 1974; EKENGREN; PEUTE; FRIDERG, 1978; PEUTE et alii, 1978) defendiam a hipótese de um único tipo celular apresentando variação em relação à atividade e à secreção hormonal. Por outro lado OLIVEREAU (1976) demonstrou dois tipos celulares distintos. Tal controvérsia parece ter sido solucionada recentemente, a partir do isolamento de duas gonadotropinas, GtH I e GtH II (SWANSON; SUZUKI; KAWAUCHI, 1987 b;

SWANSON et alii; 1989; SUZUKI; KAWAUCHI; NAGAHAMA, 1988 a e b; KAWAUCHI, et alii, 1989) o que levou à posterior caracterização por NOZAKI et alii (1990 a e b) de dois tipos celulares gonadotrópicos nas hipófises de trutas e salmões.

O primeiro tipo celular, aqui classificado como células cromófobas (semelhante àquelas descritas por OLIVEREAU, 1976 e correspondentes às células produtoras de GtH I, descritas por NOZAKI et alii, 1990) aparecem em grande número nas primeiras fases do desenvolvimento gonadal semelhante ao que se observa neste trabalho para animais esterilizados.

Considerando-se os animais normais e revertidos, como estes apresentavam-se em estádio maduro, observou-se uma inversão do número de células cromófobas com as basófilas. Tal resultado se assemelha àquele obtido por NOZAKI et alii (1990 b) que mostram um grande número de células GtH II em trutas arco-fris em estádios avançados de maturação.

5. CONCLUSÕES

1) As hipófises de animais esterilizados apresentam, na *pars distalis proximalis* grande número de células cromófobas, APS e AA positivas, que se presume produtoras de GtH I, enquanto nos animais normais e revertidos, por estarem em estádios avançados de maturação, as células basófilas, APS e AA positivas, que se presume produtoras de GtH II,

são as mais abundantes.

2) As células acidófilas, APS e AA negativas, que se admite como sendo as produtoras de StH, também presentes na *pars distalis proximalis*, ocorreram em maior número nas hipófises de peixes esterilizados quando comparadas às dos outros dois grupos (animais normais e revertidos).

AGRADECIMENTOS

Ao Profº. Paulo E. Pereira Leite pelo auxílio na análise quantitativa das células hipofisárias, e no tratamento estatístico dos dados, e ainda, na documentação fotográfica juntamente com a colaboração da Profª. Ma-

ria Inês Borella, ambos do ICB-USP. À Rosana Aparecida da Silva, Técnica de Apoio à Pesquisa Científica e Tecnológica pela datilografia.

MELLITO DA SILVEIRA, M.P.; TABATA, Y.A.; RIGOLINO, M.G. 1995 Caracterização morfo-funcional da adeno-hipófise de *Oncorhynchus mykiss*, esterilizadas ou masculinizadas pela 17 α - metiltestosterona. *B. Inst. Pesca*, São Paulo, 22(1): 85 - 92, jan./jun.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHAN, S. T. H. & YEUNG, W. S. B. 1983 Sex control and sex reversal in fish under natural conditions. In: HOAR, W. S. & RANDALL, D. J. *Fish Physiology*. New York, Academic Press. 9B.: 171-222.
- EKENGREN, B.; PEUTE, J.; FRIDBERG, G. 1978 Gonadotropic cells in the Atlantic salmon, *Salmo salar* - An experimental immunocytochemical, electron microscopical study. *Cell Tissue Res.*, Berlin, 191: 187-203.
- FOLLENIUS, E. & DOERR-SCHOTT, J. 1978 Immunocytology of pituitary cells from teleost fishes. *International Review of Cytology*, New York, 54: 193-223.
- FOUCHER, J. L.; LE BAIL, P. Y.; LE GAC, F. 1992 Influence of hypophysectomy, castration, fasting, and spermatiation on SBP concentration in male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, New York, 85: 101-10.
- GIELEN, J. T.; GOOS, H. J. T.; PEUTE, J.; van den BOSCH, R. A.; van den OORDT, P. G. W. J. 1982 The brain - pituitary - gonadal axis in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*: gonadal hormones and the maturation of gonadotropic cells. *Cell Tissue Res.*, Berlin, 225: 45-56.
- HOLMES, R. L. & BALL, J. N. 1974 *The pituitary gland*. A comparative account. New York, Cambridge Univ. Press. p. 171-220.
- KAWAUCHI, H.; SUZUKI, H.; ITOH, H.; SWANSON, P.; NAITO, N.; NAGAHAMA, Y.; NOZAKI, M.; NAKAI, Y.; ITOH, S. 1989 The duality of teleost gonadotropins. *Fish Physiol. Biochem.*, Amsterdam, 7(1-6): 29-38.
- LEUNISSEN, J. L. M.; de LEEUW, A. M.; PEUTE, J.; GOOS, H. J. T. 1982 Immunocytochemistry of gonadotropic cells and identification of cell types in ultrathin cryosections of the pituitary of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Cell Tissue Res.*, Berlin, 226: 177-94.
- LEV, R. & SPICER, S. S. 1964 Specific of sulphate groups with alcian blue and low pH. *J. Histochem. Cytochem.*, Baltimore, 12: 309.
- LISON, L. 1960 *Histochemistry et cytochimie animales*. 3^a ed. Paris, Gauthier-Villars, v.2.
- McBRIDE, J. R. & van OVERBEEK, A. P. 1969 Cytological changes in the pituitary gland of the adult Sockeye Salmon (*Oncorhynchus nerka*) after gonadectomy. *J. Fish. Res. Bd. Canada*. Ottawa, 26: 1147-56.
- McMANNUS, J. F. A. 1946 Histological demonstration of mucin after periodic acid. *Nature*, London, 158: 202.
- ____ & CASON, J. E. 1950 Carbohydrate histochemistry studies by acetylation techniques. I. Periodic acids methods. *J. Exp. Med.*, New York, 91 (6): 651-4.
- NOZAKI, M.; NAITO, N.; SWANSON, P.; MITYATAS, K.; NAKAY, Y.; OOTAS, Y.; SUZUKI, K.; KAWAUCHI, H. 1990 a. Salmon pituitary gonadotrophs. I. Distinct cellular distributions of two gonadotropins, GtH I and GtH II. *Gen. Comp. Endocrinol.*, New York, 77: 348-57.
- ____ ; ____ ; ____ ; DICHOFF, W. W.; ____ ; ____ ; ____ ; ____ ; ____ ; ____ 1990b. Salmonid pituitary gonadotrophs. II. Ontogeny of GtH I and GtH II cells in the rainbow trout (*Salmo gairdneri irideus*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, New York, 77: 358-67.
- OLIVEREAU, M. 1954 Hypophyse et glande thyroïde chez les poissons. Etude histophysiological de quelques corrélations endocrinianes, en particulier chez *Salmo salar* L. *Ann. Biol.*, Paris, 30 (3-4): 63-80.
- ____ 1967 a. Observations sur l'hypophyse de l'Anguille femelle, en particular lors de la maturation sexuelle. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.*, Berlin, 80: 286-306.
- ____ 1976 Le cellules gonadotropes hypophysaires du saumon de l'Atlantique: unicité ou dualité? *Gen. Comp. Endocrinol.*, New York, 28 (1): 82-95.
- ____ & NAGAHAMA, Y. 1983 Immunocytochemistry of gonadotropic cells in the pituitary of some teleost species. *Gen. Comp. Endocrinol.*, New York, 50: 252-60.

MELLITO DA SILVEIRA, M.P.; TABATA, Y.A.; RIGOLINO, M.G. 1995 Caracterização morfo-funcional da adeno-hipófise de *Oncorhynchus mykiss*, esterilizadas ou masculinizadas pela 17 α - metiltestosterona. *B. Inst. Pesca*, São Paulo, 22(1): 85 - 92, jan./jun.

- PANDEY, S. 1969 The role of pituitary and gonadal hormones in the differentiation of testis and secondary sex characters of the juvenile guppy, *Poecilia reticulata*. *Biol. Reprod.*, Champaign, I: 272-81.
- PEUTE, J.; GOOS, H. J. T.; BRUYN, M. B. A. de; van OORDT, P. G. W. J. 1978 Gonadotropic cells of the rainbow trout pituitary during the annual cycle: Ultrastructure and hormone content. *Ann. Biol. Anim. Biophys.*, Paris, 18: 793-8.
- PIMENTEL GOMES, F. 1982 *Curso de Estatística Experimental*, Livraria Nobel S.A., São Paulo 430p.
- RAND-WEAVER, M.; BAKER, B. J.; KAWAUCHI, H. 1991 Cellular localization of somatolactin in the pars intermedia of some teleost fishes. *Cell. Tissue Res.*, Berlin, 262: 207-15.
- SNEDECOR, G. W. & COCHRAN, W. G. 1980 *Statistical Methods* Ames., Iowa, Iowa State University Press. 507 p.
- SPICER, S. S. & LILLIE, R. D. 1959 Saponification as a means of selectively reversing to methylation blockade of tissue basophilis. *J. Histochem. Cytochem.*, Baltimore, 7: 123-5.
- STEEDMAN, H. F. 1950 Alcian blue 8 GS: a new stain for mucin. *Q. J. Micr. Sci.*, London, 91: 477-9.
- SUZUKI, K.; KAWAUCHI, H.; NAGAHAMA, Y. 1988a. Isolation and characterization of two distinct gonadotropins from chum salmon pituitary glands. *Gen. Comp. Endocrinol.*, New York, 71: 292-301.
- SUZUKI, K.; KAWAUCHI, H.; NAGAHAMA, Y. 1988b. Isolation and characterization of subunits from two distinct salmon gonadotropins. *Gen. Comp. Endocrinol.*, New York, 71: 302-6.
- SWANSON, P.; SUZUKI, K.; KAWAUCHI, H. 1987 b. Isolation and biochemical characterization of two distinct pituitary gonadotropins from coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Amer. Zool.*, Lawrence, 27: 79.
- _____ ; BERNARD, M.; NOZAKI, M.; SUZUKI, K.; KAWAUCHI, H; DICKHOFF, W. W. 1989 Gonadotropins I and II in juvenile coho salmon. *Fish Physiol. Biochem.*, Amsterdam, 7 (1-6): 169-76.
- VAL-SELLA, M. V. 1973 *Hipófise da carpa escama - Cyprinus carpio L. (Peixe - Teleósteo, Ciprinídeo) - estudo histológico e fisiológico da adeno-hipófise*. São Paulo. 78p. (Dissertação de Mestrado. Departamento de Fisiologia. Instituto de Biociências, USP).
- van OORDT, P. G. W. J. & PEUTE, J. 1983 The cellular origin of pituitary gonadotropins in teleosts. In: HOAR, W. S.; HANDALL, D. J.; DONALDSON, E. M. ed. *Fish Physiology*. New York, Academic Press. 9A: 137-86.
- VIALLI, M. 1955 Tecnica per l'uso contemporaneo in histochimica dell'Alcian blue e della reazione di Hatchkiss. *Arch. Zool. Ital.*, Napoli, 40: 399-407.