

ANÁLISES MACRO E MICROSCÓPICA DE GÔNADAS DE *Oncorhynchus mykiss*, ESTERILIZADAS OU MASCULINIZADAS PELA 17 α -METILTETOSTERONA

[Macroscopical and microscopical analysis of the sterilized or masculinized *Oncorhynchus mykiss* gonads, by 17 α -methyltestosterone]

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

RESUMO

Exemplares de truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*, nos estágios iniciais do desenvolvimento, foram submetidos a 6 diferentes tratamentos com 17 α -metiltestosterona (MT) diluída em banhos de imersão e/ou adicionada na ração visando a indução da esterilidade reprodutiva. Aos 2 anos de idade, na estação reprodutiva (inverno) todos os animais foram coletados, pesados e as suas gônadas analisadas para obtenção das porcentagens de indivíduos normais, esterilizados e sexualmente revertidos. Os tratamentos com banhos de imersão contendo MT em solução foram mais eficazes que os constituídos de apenas hormônio adicionado à ração, sendo ainda os tratamentos somados (banho de imersão e ração suplementada), mais eficientes do que os que receberam apenas banho de imersão. Os efeitos da MT, embora em proporções menores que os relatados na literatura, são semelhantes quanto aos aspectos macroscópicos e histológicos das gônadas. Não foi observada relação entre a mortalidade e as doses de hormônio durante o tratamento.

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

ABSTRACT

Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, specimens, were submitted to 6 different treatments with 17 α -methyltestosterone (MT), either by diluted in immersion bath and/or added to the diet during the early stages of development in order to induce the reproductive sterility. During the reproductive season (winter) two years old animals were collected, their weights and size measured and their gonadal stage analyzed in order to obtain the rates of occurrence of normal, sterilized and sex reverted specimens. The treatments with MT diluted in immersion baths were more efficacious than those with hormone added in diet only, and the mixed treatments (immersion baths and diet) were more efficient than immersion baths only. The effects of the MT, even thought at a lower rate than found in other papers, were similar in the macroscopical and histological aspects of the gonads. No dose-related mortality during the treatments was observed.

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

I. INTRODUÇÃO

Os hormônios esteróidicos são indutores da diferenciação gonadal (YAMAMOTO, 1969; van den HURK & SLOF, 1981; van den HURK & van OORDT, 1985; MAGRI et alii, 1985), estando ainda, relacionados a maturação sexual (GOOS et alii, 1986 e SCOTT & SUMPTER, 1989).

Deve-se lembrar, porém, que como para outras espécies, a maturação sexual na truta causa prejuízos ao crescimento, à sobrevivên-

cia e à comercialização do peixe (JOHNSTONE; SIMPSON; YOUNGSON, 1978; OKADA; MATSUMOTO; YAMAZAKI, 1979; FOOTE; CLARKE; BLACKBURN, 1991). Tal fenômeno é mais evidente nos machos, pois nestes a primeira maturação gonadal é mais precoce que nas fêmeas (BYE & LINCOLN, 1979, 1981; DELLEFORS & FARENO, 1988).

Esses problemas podem ser minimizados

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

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

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

ou eliminados pela produção de populações estéreis ou totalmente femininas. Com essa finalidade, várias tentativas experimentais têm sido feitas, entre elas as técnicas de manipulação cromossômica (ginogênese, indução da poliploidia), e as técnicas hormonais.

Quanto às técnicas hormonais, sabe-se que vários esteróides são capazes de promover a reversão sexual e a esterilização, sendo o efeito desejado dependente do hormônio utilizado, da dose, do tempo de duração do tratamento, do método de administração e da espécie empregada (ASHBY, 1957; YAMAZAKI, 1976, 1983; DONALDSON & HUNTER, 1982 a., 1983; SOLAR & DONALDSON, 1985a.; DONAL-

DON, 1988; HERMAN, 1991). Dentre os hormônios pesquisados, o andrógeno sintético 17α -metiltestosterona (MT) tem sido bastante empregado, diretamente, na esterilização como, indiretamente na produção de lotes femininos. Sendo a fêmea da truta homogamética (THORGAARD, 1977), o sêmen obtido de fêmeas masculinizadas pela MT produzirá uma prole totalmente feminina quando da fertilização de ovócitos normais.

O presente trabalho teve por objetivo estudar os efeitos da administração de diferentes doses de MT dissolvida na água e/ou administrada na ração sobre a expressão sexual, a sobrevivência e o desenvolvimento das gônadas de trutas arco-fris, *Oncorhynchus mykiss*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Este experimento foi conduzido na Estação Experimental de Salmonicultura do Instituto de Pesca, localizada no município de Campos do Jordão-SP (22° 45' S e 45° 30' W), durante o período compreendido entre agosto de 1987 e agosto de 1989.

A temperatura da água foi registrada diariamente em termômetro de máxima e mínima, sendo utilizada a média diária para calcular a duração das fases experimentais em unidades térmicas acumuladas em graus centígrados dias ($^{\circ}\text{Cd}$), somadas a partir do dia de fertilização.

Foi utilizado um "pool" de aproximadamente 3500 ovos embrionados, obtidos através de fecundação artificial de trutas de 2 anos de idade, o qual foi dividido em 2 grupos homogêneos e mantidos sob as mesmas condições de incubação.

Um dos grupos foi submetido a dois banhos de imersão, com duração de 2 horas cada um, em um recipiente contendo uma solução 100 μg de 17α -metiltestosterona (MT), da SIGMA, por litro de água, sendo um deles no terceiro e o outro no décimo dia após a

eclosão (336 $^{\circ}\text{Cd}$ e 432,5 $^{\circ}\text{Cd}$, respectivamente).

A solução estoque de MT foi preparada com álcool etílico absoluto P.A. e alíquotas dessa solução foram adicionadas à água de imersão para se obter a concentração final desejada (100 $\mu\text{g}/\text{l}$). A concentração total de álcool na água era de 0,04% (método proposto por GOETZ et alii, 1979).

Os alevinos foram mantidos nas incubadoras em bandejas de madeira com fundo de tela de nylon e no trigésimo quinto dia após a eclosão (789 $^{\circ}\text{Cd}$), isto é, decorridas aproximadamente duas semanas (250 $^{\circ}\text{Cd}$) do início da alimentação, cada um dos dois grupos foi subdividido em três, constituindo seis lotes, contendo 500 alevinos cada. Em seguida, os lotes foram transferidos, separadamente, para seis caixas d'água de cimento amianto, mantidas com volume de 750 l de água com renovação do volume total a cada hora, sob condições normais de fotoperíodo. Nessa ocasião, iniciou-se o tratamento oral de MT, sendo os diferentes tratamentos (lotes) assim estabelecidos: A, B e C compostos por animais que receberam os banhos de imersão

e submetidos posteriormente a uma dieta contendo 0 mg, 25 mg e 50 mg de MT por quilo de ração, respectivamente, e, D, E e F, compostos por animais que não sofreram banho de imersão e que passaram a receber ração suplementada com 0 mg, 25 mg e 50 mg de MT por quilo de ração, respectivamente, conforme esquema abaixo:

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

A administração da ração contendo MT transcorreu por 60 dias (846 °Cd), sendo a taxa de arraçoamento, neste período, de 10% do peso vivo ao dia, e a quantidade de ração reajustada a intervalos de 14 dias.

Terminada a fase de tratamento hormonal os animais foram contados e transferidos para tanques de alvenaria com 5 m³ de água e renovação mínima do volume total a cada hora, e mantidos sob condições idênticas de manejo (densidade e arraçoamento).

Ao completarem 2 anos de idade, na estação reprodutiva (inverno) de 1989, 100% dos animais de cada lote foram abatidos em solução de benzocaina (1:10000) e pesados

individualmente.

Após a exposição da cavidade celomática, os animais foram identificados de acordo com o sexo gonádico, sendo: normais (machos e fêmeas, respectivamente, com testículos e ovários normais), estéreis (presença de gônadas indiferenciadas) e fêmeas genotípicas masculinizadas ou fêmeas revertidas (presença de testículo de conformação globosa, quase sempre sem ducto espermático e às vezes com a presença de ovotestis).

Após a dissecação das gônadas, estas foram pesadas para o cálculo do índice gônado-somático (IGS = peso da gônada/ peso do animal x 100).

Foram coletadas amostras dos diferentes tipos de gônadas e fixadas em líquido de BOUIN, onde permaneceram por 24 horas e em seguida transferidas para álcool 70%. Após técnicas rotineiras para inclusão em parafina foram obtidos cortes de 7 μ m de espessura e corados pela Hematoxilina-Eosina.

Para análise das frequências obtidas de diferentes grupos sexuais foi utilizado o teste do χ^2 (PIMENTEL GOMES, 1982).

3. RESULTADOS

Na truta arco-íris, as gônadas de machos normais apresentam-se como órgãos pares de forma alongada, ligados à parede dorsal do corpo como ocorre na maioria dos teleósteos. Os testículos são formados por numerosos lóbulos de forma irregular, separados por uma camada delgada de tecido conjuntivo. No interior dos lóbulos, as células germinativas aparecem, encerradas ou não, nos chamados cistos intralobulares.

Os machos analisados apresentavam-se em estágio maduro, com valor médio do índice gônado-somático (IGS) de 4,65 e desvio padrão de 0,28. O estágio maduro é caracterizado pelo predomínio de esper-

matozóides no lúmen lobular. Alguns cistos, próximos à camada de tecido conjuntivo, contendo espermátides, também foram observados. No espaço interlobular, detectou-se a presença de células de formas irregulares, dispostas isoladamente ou em pequenos grupos, especialmente onde o tecido intersticial exibe uma conformação triangular, ao separar mais que dois lóbulos. Foram observadas, ainda, células apresentando no citoplasma gotículas de lipídeos, dispostas nas paredes dos cistos testiculares. Ocorre sincronia nos lóbulos, ou seja, as células germinativas, na maioria dos cistos intralobulares, encontram-se no mesmo estágio da espermatogênese.

Nas fêmeas normais, os ovários em forma de saco são recobertos por uma parede ovariana, constituída por mesotélio e logo abaixo deste, a túnica albugínea que emite projeções para o interior do órgão, denominadas de lamelas ovulíferas, onde ocorre a ovogênese. A truta possui gônadas do tipo semicistovário, em que a estrutura é semelhante a uma bolsa que se abre para o lúmen do corpo. No lugar de oviducto está presente um sulco em forma de funil que transporta os ovos até o poro genital. De acordo com o desenvolvimento ovocitário a truta possui sincronismo por grupos de ovócitos, o que é característico de peixes que reproduzem uma vez por ano, em estação reprodutiva curta. Quanto ao estágio de maturação gonadal, apresentaram-se na sua maioria em estágio maduro, em que os óvulos estavam soltos na cavidade abdominal, sendo facilmente expulsos quando submetidos a pequena pressão antero-posterior no abdômen. O IGS médio para esses animais foi de 8,94 com desvio padrão de 1,62.

Em animais esterilizados as gônadas mostraram-se como delgados filamentos indiferenciados. O IGS médio encontrado foi de 0,04 e desvio padrão de 0,02. Através da análise histológica, as gônadas eram destituídas de células germinativas, sendo constituídas de tecido conjuntivo. Outras apresentaram células foliculares delimitando espaços vazios (FIGURA 1).

Alguns animais apresentaram-se parcialmente "esterilizados", com porções de suas gônadas diferenciadas em testículo, em início de maturação (presença de espermatogônias primárias e secundárias) ou em ovário (presença de ovócitos em fase pré-vitelogênica). Nos animais que apresentavam apenas parte de uma das gônadas diferenciada, tal diferenciação ocorria na sua porção cranial (FIGURA 2). Nas regiões "esterilizadas" foram observadas as mesmas características citadas acima para peixes totalmente

esterilizados.

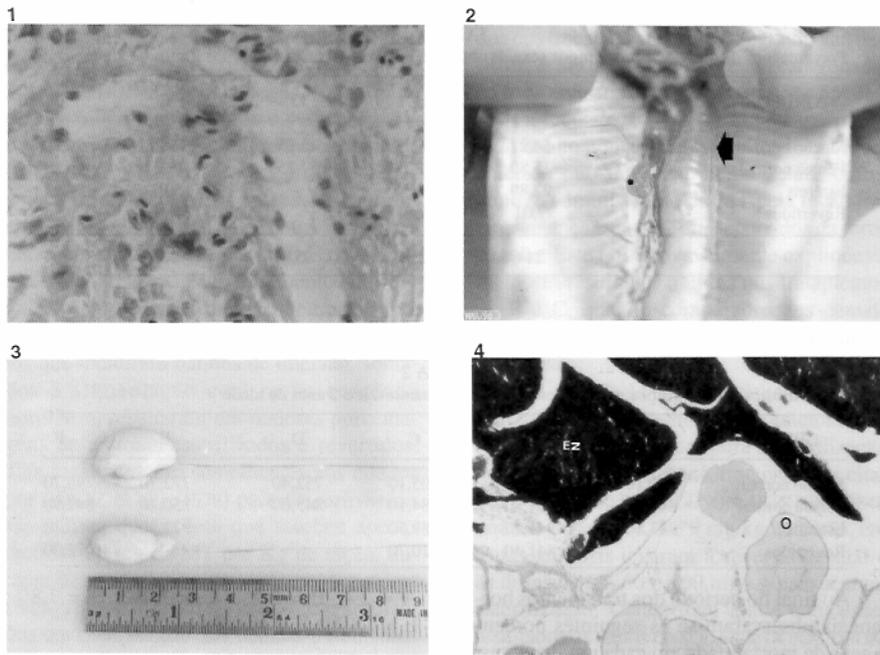
Nos animais revertidos, os testículos apresentaram-se de forma globular (FIGURA 3), em estágio maduro e com IGS médio de 3,62 e desvio padrão de 1,15. Histologicamente, a estrutura é semelhante à descrita para testículos de animais normais. Em alguns animais observaram-se testículos nas mesmas condições citadas acima, porém, apresentando ainda porções com ovócitos em maturação (FIGURA 4). Na porção ovário da gônada podem ser observados ovócitos com núcleo grande, nucléolos múltiplos localizados na periferia nuclear e uma massa justaglomerular basófila denominada corpos de Balbiani. Observam-se ainda células da camada tecal.

Foram ainda encontrados animais apresentando uma das gônadas na forma de testículo globoso maduro e a outra diferenciada na sua porção cranial com ovócitos em fase pré-vitelogênica, bem como, animais apresentando dois testículos maduros, demonstrando serem revertidos apenas pela forma globular dos órgãos.

Após a análise das gônadas de todos os animais dos diferentes tratamentos (lotes A, B, C, D, E e F), as porcentagens obtidas de machos normais, fêmeas normais, animais estéreis e fêmeas genotípicas masculinizadas (ou revertidas sexualmente) podem ser vistas na TABELA 1.

O teste do χ^2 , aplicado tanto para o número de animais esterilizados separadamente, quanto para o número de animais agrupados (esterilizados e masculinizados) mostrou que os tratamentos B e C apresentaram diferenças significativas entre si e com os demais tratamentos, enquanto que os tratamentos A, E e F não diferiram significativamente entre si ($P < 0,05$).

Quanto aos pesos médios dos machos normais, fêmeas normais, animais esterilizados e revertidos, nos diversos tratamentos obtiveram-se os valores médios com seus respectivos



FIGURAS 1 a 4

- 1 - Corte histológico de gônada de animal esterilizado, H-E, \pm 250 X
- 2 - Gônada característica de animal estéril. * Nota-se pequena diferenciação, semelhante a tecido ovariano, na porção cranial da gônada direita do animal, porém sem função reprodutiva
- 3 - Testículo globoso, gônada característica de fêmea genotípica revertida para macho funcional
- 4 - Corte histológico de gônada de animal revertido (ovotestis), EZ = Espermatozóides; O = ovócitos. H-E, \pm 50 X

desvios padrão, demonstrados na TABELA 2.

Pode-se observar que nos diversos tratamentos os valores médios dos pesos dos animais esterilizados são sempre superiores aos

encontrados para fêmeas normais, que por sua vez, apresentam-se com pesos e comprimentos superiores aos obtidos para os machos normais.

TABELA 1
Porcentagens de indivíduos dos grupos sexuais obtidas nos diversos tratamentos, aos 2 anos de idade

GRUPOS	A	B	C	D	E	F
Macho normal	51,60	54,21	48,13	42,75	47,78	53,20
Fêmea normal	43,20	15,89	31,78	57,25	46,31	40,89
Estéreis	5,20	22,89	13,55	-	5,91	4,93
Revertidos	-	7,01	6,54	-	-	0,98
n	250	214	214	255	203	203

TABELA 2
Pesos médios (g) dos grupos sexuais nos diversos tratamentos, aos 2 anos de idade

GRUPOS	A	B	C	D	E	F
Macho normal	770,10	824,70	805,10	752,40	772,70	796,70
Fêmea normal	847,70	927,80	884,10	845,00	850,10	842,90
Estéreis	943,80	944,10	889,50	-	922,90	960,10
Revertidos	-	841,40	810,70	-	-	1012,00

Ao final do período dos tratamentos hormonais observaram-se as seguintes porcentagens de mortalidade em cada um dos lotes:

A = 2%; B = 5,2%; C = 7,4%; D = 7,8%; E = 4,8% e F = 10,2%.

4. DISCUSSÃO

Na análise histológica das gônadas de animais normais, notou-se que as características aqui observadas são semelhantes às citadas por vários autores (van den HURK; PEUTE; VERMEIJ, 1978; van den HURK et alii, 1978; NAGAHAMA, 1983, 1986; DODD, 1986; ALEXANDRINO et alii, 1987a e b). Nos machos, as células isoladas ou em pequenos grupos no tecido conjuntivo, têm sido descritas como células de Leydig (van den HURK et alii 1978; NAGAHAMA 1983, 1986). Estes autores demonstraram através de análises histoquímicas, o envolvimento dessas células intersticiais na síntese de hormônio esteroídico, na truta arco-íris. Quanto às células presentes nas paredes dos lóbulos testiculares, NAGAHAMA (1983, 1986), se referiu às mesmas como sendo células de Sertoli. Van

den HURK et alii (1978), sugeriram o envolvimento destas células na reabsorção dos espermatozoides não eliminados. Estes autores demonstraram também a presença da atividade da 3β hidroxí-esteróide desidrogenase, o que deve estar relacionado à síntese de esteróides.

Nas gônadas de trutas revertidas, diversos autores também mostraram a presença de tecidos de ambos os sexos, semelhantes aos aqui observados (YAMAZAKI, 1976; JOHNSTONE; SIMPSON; YOUNGSON, 1978; GOETZ et alii, 1979). A presença de gônadas parcialmente "esterilizadas" (regiões com ausência de células germinativas ligadas a áreas de tecido germinativo de fêmeas em início de maturação) ou totalmente esterilizadas (gônadas destituídas de tecido germinativo) foram tam-

bém demonstradas por van den HURK & SLOF (1981), SOLAR; DONALDSON; HUNTER (1984) e SOLAR & DONALDSON (1985 a. e b.). Ainda, células foliculares delimitando espaços vazios, foram também encontradas por van den HURK & SLOF (1981).

Considerando-se os resultados obtidos em termos dos efeitos da MT nos vários tratamentos pode-se verificar através da análise estatística, que todos os tratamentos hormonais foram eficazes quando comparados à condição controle. E, ainda, que os tratamentos que incluíram banhos de imersão, somados à alimentação com ração contendo hormônio, resultaram em maiores porcentagens de animais esterilizados e revertidos. Tais resultados são semelhantes aos citados por GOETZ et alii (1979) para *Oncorhynchus kisutch*, na qual o lote que recebeu apenas dieta de 20 mg de MT por Kg de ração, durante dez semanas houve uma pequena porcentagem de animais revertidos e esterilizados em comparação aos demais tratamentos que incluíam banhos de imersão. Porém, deve-se ressaltar que as porcentagens aqui obtidas são inferiores, não só em relação às dos trabalhos de GOETZ et alii (1979), como também às de vários outros pesquisadores, como SOLAR & DONALDSON (1985 a. e b.) que trabalharam com trutas arco-fris, *Salmo gairdneri*. GOETZ et alii (1979) obtiveram porcentagens iguais a 77 e 87% de estérteis para os tratamentos com 25 e 50 mg de hormônio por quilo de ração (durante 60 dias) respectivamente; SOLAR & DONALDSON (1985a. e b.) obtiveram 100% de trutas estérteis no tratamento por 60 dias com ração suplementada com 25 mg de MT em combinação com banhos de imersão de duas horas de duração, nos 3º e 10º dias após 100% de eclosão (metodologia semelhante à utilizada neste trabalho).

Acredita-se que os baixos valores de esterilização e reversão aqui encontrados estejam ligados ao fato do início dos tratamentos ter sido um pouco tardio em relação aos cita-

dos nos trabalhos anteriores. Segundo van den HURK & SLOF (1981) a diferenciação gonadal na truta arco-fris ocorre entre os 45º e 55º dias após a fecundação. No presente experimento, o banho de imersão foi aplicado em fases anteriores ao intervalo citado acima, entretanto, a administração de MT pela ração iniciou-se apenas no 59º dia decorridos da fertilização. Este fato provavelmente explique os melhores resultados obtidos nos tratamentos A, B e C, quando comparados aos demais lotes que não foram submetidos aos banhos de imersão.

Em relação às doses hormonais, as aqui utilizadas na fase de hormônio adicionado à ração são mais indicadas para a esterilização que para a reversão, conforme os dados citados por SOLAR; DONALDSON; HUNTER (1984), onde as doses de 1, 3 e 9 mg/kg de ração, em trutas arco-fris levaram à reversão sexual e as doses de 25, 50 e 100 mg/kg provocaram esterilização. Concordam ainda com esses resultados os dados de SOLAR & DONALDSON, 1985 a. e b.; YAMAZAKI, 1976, 1983; GOETZ et alii, 1979.

Quanto ao número de banhos de imersão, podemos citar GOETZ et alii (1979) obtiveram 100% de estérteis com altas frequências de banho na fase de ovo olhado (2 a 6 banhos), na fase de alevino (2 a 7 banhos), ou seja, as duas fases combinadas resultam em 4 e 13 banhos respectivamente, conjugadas ainda com hormônio adicionado à ração.

Quanto à mortalidade observada nos lotes que receberam hormônio, a variação ficou entre 2 a 10,2% e para o grupo controle, de 7,8%. Tais valores são inferiores aos citados por JOHNSTONE; SIMPSON; YOUNGSON (1978), que para os experimentos de administração hormonal, com truta arco-fris, mostraram variação entre 5 e 15%. Ainda, em relação ao trabalho de SOLAR; DONALDSON; HUNTER (1984), os valores aqui observados são inferiores, uma vez que estes autores obtiveram mortalidade de 26,5% para os gru-

pos experimentais e 28,5% para o controle.

Os resultados aqui obtidos não demonstram haver relação entre a mortalidade e as doses de hormônio utilizadas.

Em relação aos pesos médios aqui encontrados deve-se observar que confirmam as informações de inúmeros autores, já citados anteriormente, que as fêmeas de truta arco-íris crescem e pesam mais que os machos da mesma espécie, tornando assim mais interessante o cultivo monossexo.

Quanto aos animais esterilizados, embora seus pesos tenham sido superiores aos das fêmeas normais, o número reduzido de estêreis obtidos nos diferentes tratamentos não permite concluir sobre tal característica, sendo neces-

sárias novas investigações nesse sentido.

Os dados obtidos no presente trabalho permitem as seguintes conclusões:

- 1-) Os efeitos da 17 α -metiltestosterona, embora em proporções menores que os relatados na literatura, são semelhantes quanto aos aspectos macroscópicos e histológicos das gônadas.
- 2-) Os tratamentos que incluem banhos de imersão contendo solução do referido hormônio são mais eficazes que os constituídos de apenas hormônio adicionado à ração alimentar, sendo ainda os tratamentos somados (banhos de imersão e ração suplementada) mais eficientes que apenas banho de imersão.

AGRADECIMENTOS

Aos funcionários da Estação Experimental de Salmonicultura do Instituto de Pesca, Miguel dos Santos, Luiz Roberto da Silva, Jurandir Pinto da Silva e Antonio Donizeti

da Silva pela participação nos trabalhos de campo e à Rosana Aparecida da Silva pela datilografia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDRINO, A. C.; PINHEIRO, E. F. G.; TABATA, Y.A.; CARVALHO, M. H. 1987 Ciclo reprodutivo de *Salmo irideus* Gibbons (Pisces, Salmoniformes) mantidos em sistema de cultivo intensivo: caracterização microscópica dos ovários. *Rev. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. S. Paulo*, 24 (2): 157-68.
- _____; _____; RIGOLINO, M. G.; CAMPOS, E. C.; ARANA, S. 1987 Ciclo reprodutivo de *Salmo irideus* Gibbons (Pisces, Salmoniformes) mantidos em sistema de cultivo intensivo: caracterização macroscópica e microscópica dos testículos. *Rev. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. S. Paulo*, 24 (2): 169-80.
- ASHBY, K. R. 1957 The effect of steroid hormones on brown trout (*Salmo trutta* L.) during the period of gonadal differentiation. *J. Embryol. Exp. Morph.*, Amsterdam, 5 (3): 225-49.
- BYE, V. J. & LINCOLN, R. F. 1979 Male trout - an expensive luxury. *Fish Farmer*, Surrey, 2 (3): 19-21.
- _____ & _____ 1981 Get rid of the males and let the females prosper. *Fish Farmer*, Surrey, 4 (8): 1-3.
- DELLEFORS, C. & FARENO, U. 1988 Early sexual maturation in males wild sea trout, *Salmo trutta* L., inhibits smoltification. *J. Fish. Biol.*, London, 33 (7): 41-9.
- DODD, J. M. 1986 The ovary In: PANG, P. K. T. & SCHREIBMAN, M. P. *Vertbrate Endocrinology: Fundamentals and Biochemical Implications*, New York, Academic Press. 1: 351-98.
- DONALDSON, E. M. 1988 Science and the future of aquaculture. In: AQUACULTURE INTER-

MELLITO DA SILVEIRA, M.P.; TABATA, Y.A.; RIGOLINO, M.G. 1995 Análises macro e microscópica de gônadas de *Oncorhynchus mykiss*, esterilizadas ou masculinizadas pela 17 α - metiltestosterona. *B. Inst. Pesca*, São Paulo, 22(1): 93 - 102, jan./jun.

- NATIONAL CONGRESS & EXPOSITION, Vancouver 1988. *Proceedings...* Vancouver, British Columbia Pavilion Corporation. p. 299-309.
- DONALDSON, E. M. & HUNTER, G. A. 1982a. Sex control with particular references to salmonids. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, West Vancouver, 39: 99-110.
- _____ 1983 Sex control in Pacific Salmon. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF SALMONID REPRODUCTION, Seattle, Proceedings... p. 25-32.
- FOOTE, C. J.; CLARKE, W. C.; BLACKBURN, J. 1991 Inhibition of smolting in precocious male chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*. *Can. J. Zool.*, Ottawa, 69: 1848-52.
- GOETZ, F. W.; DONALDSON, E. M.; HUNTER, G. A.; DYE, H. M. 1979 Effects of estradiol-17 β and 17 α -methyltestosterone on gonadal differentiation in the coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Aquaculture*, Amsterdam, 17: 267-78.
- GOOS, H. J. T.; de LEEUW, R.; COOK, H.; van OORDT, P. G. W. J. 1986 Gonadotropic hormone-releasing hormone (GnRH) bioactivity in the brain of the immature rainbow trout, *Salmo gairdneri*: The effect of testosterone. *Gen. Comp. Endocrinol.*, New York, 64: 80-4.
- HERMAN, R. L. 1991 Effects of orally administered steroids on lake trout and Atlantic salmon. *Prog. Fish. Cult.*, Bethesda, 53: 157-61.
- JOHNSTONE, R.; SIMPSON, T. H.; YOUNGSON, A. F. 1978 Sex reversal in salmonid culture. *Aquaculture*, Amsterdam, 13: 115-34.
- MAGRI, M. H.; SOLARI, A.; BILLARD, R.; REINAUD, P. 1985 Influence of testosterone on precocious sexual development in immature rainbow trout. *Gen. Comp. Endocrinol.*, New York, 57: 411-21.
- NAGAHAMA, Y. 1983 The functional morphology of teleosts gonads. In: HOAR, W. S. & HANDALL, D. J. ed. *Fish Physiology*. New York, Academic Press. 9A: 223-64.
- _____ 1986 Testis. In: PANG, P. K. T. & SCHREIBMAN, M.P. *Vertbrate Endocrinology: Fundamentals and Biochemical Implication*, New York, Academic Press. 1: 399-437.
- OKADA, H.; MATSUMOTO, H.; YAMAZAKI, F. 1979 Functional masculinization of genetic females in rainbow trout. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, Tokyo, 45 (4): 413-9.
- PIMENTEL GOMES, F. 1982 *Curso de Estatística Experimental* Livraria Nobel S. A., São Paulo, 430p.
- SCOTT, A. P. & SUMPTER, J. P. 1989 Seasonal variations in testicular stages in plasma concentrations of sex steroids in male rainbow trout *Salmo gairdneri* maturing at 2 years old. *Gen. Comp. Endocrinol.*, New York, 73: 46-58.
- SOLAR, I. I. & DONALDSON, E. M. 1985a. The use of androgens for the production of sterile rainbow trout for mariculture. ANNUAL NORTHWEST FISH CULTURE CONFERENCE, 36, Tacoma, Washington. *Proceedings...* p. 131-9.
- _____ & _____ 1985b. Studies on genetic and hormonal sex control in domesticated rainbow trout. II. Use of methyltestosterone for masculinization and sterilization in cultured rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci.*, West Vancouver, 1380: 1-9.
- _____ ; _____; HUNTER, G. A. 1984 Optimization of treatment regimes for controlled sex differentiation and sterilization in wild rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) by oral administration of 17 α methyltestosterone. *Aquaculture*, Amsterdam, 42: 129-39.
- THORGAARD, G. H. 1977 Heteromorphic sex chromosomes in male rainbow trout. *Science*, 196: 900-2.
- van den HURK, R. & SLOF, G. A. 1981 A morphological and experimental study of sex differentiation in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Cell Tissue Res.*, Berlin, 218: 487-97.
- _____ & van OORDT, P. G. W. J. 1985 Effects of natural androgens and corticosteroids on gonad differentiation in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, New York, 57: 216-22.

MELLITO DA SILVEIRA, M.P.; TABATA, Y.A.; RIGOLINO, M.G. 1995 Análises macro e microscópica de gônadas de *Oncorhynchus mykiss*, esterilizadas ou masculinizadas pela 17 α - metiltestosterona. *B. Inst. Pesca*, São Paulo, 22(1): 93 - 102, jan./jun.

van den HURK, R. ; PEUTE, J.; VERMEIJ, J. A. J. 1978 Morphological and enzyme cytochemical aspects of the testis and vas deferens of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Cell Tissue Res.*, New York, 186: 309-25.

_____; VERMEIJ, J. A. J.; STEGENGA, J.; PEUTE, J.; van OORDT, P. G. W. J. 1978 Cyclic changes in the testis and vas deferens of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*) with special reference to sites of steroidogenesis. *Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys.*, Paris, 18: 899-904.

YAMAMOTO, T. 1969 Sex differentiation. In: HOAR, W. S. & RANDALL, D. J., ed. *Fish Physiology.*, New York, Academic Press. 3: 117-75.

YAMAZAKI, F. 1976 Application of hormones in fish culture. *J. Fish. Res. Board Can.*, Ottawa, 33: 948-58.

_____. 1983 Sex control and manipulation in fish. *Aquaculture*, Amsterdam, 33: 329-54.