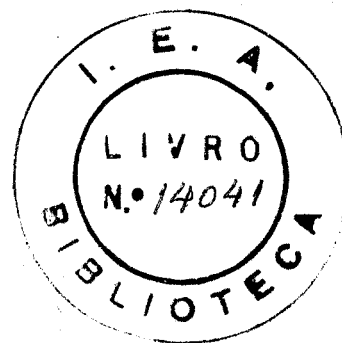


KAYO OKAZAKI

MORFOLOGIA E FISILOGIA DE MELANÓFOROS DE PEIXE TELEÓSTEO GEOPHAGUS BRASILIENSIS (QUOY & GAIMARD, 1824). EFEITO DA RADIAÇÃO GAMA.

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Fisiologia Geral, para obtenção do título de "Mestre em Ciências". Orientação do Professor Doutor PAULO SAWAYA.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
Departamento de Fisiologia
Geral

INSTITUTO DE ENERGIA ATÔMICA
Coordenadoria de Radiobiologia
Área de Biologia Celular

São Paulo
1975

AO
YUZO
pela compreensão e estímulo.

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof.Dr. PAULO SAWAYA, cuja orientação, compreensão e apoio foram altamente preciosos para minha formação e desenvolvimento desta Dissertação.
- Ao Prof.Dr. LUIS CARLOS UCHOA JUNQUEIRA, pelos valiosos conhecimentos transmitidos, e pela oportunidade que nos foi dada em realizar um trabalho desta natureza.
- Ao Prof.Dr. RÔMULO RIBEIRO PIERONI, Superintendente do Instituto de Energia Atômica de São Paulo, que tornou possível a execução deste trabalho.
- Ao Prof.Dr. FAUSTO LIMA, Coordenador da Coordenadoria de Radioquímica do Instituto de Energia Atômica de São Paulo, que propiciou a utilização da Bomba de Cobalto.
- Ao Prof.Dr. OMAR MIGUEL, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, pela orientação no tratamento estatístico dos dados.
- Ao colega EDUARDO CUNHA FARIAS, pelas sugestões e auxílio prestado durante a redação.
- Ao Técnico Especializado em Microscopia Eletrônica, Sr. JOSÉ ANTONIO TOLEDO BILOTTA e ao Sr. BELCHIOR FERREIRA DE LIMA, pela inestimável colaboração prestada.
- Ao colega LEONARDO GONDIM DE ANDRADE E SILVA, pela ajuda prestada na irradiação dos materiais.
- A Diretora do Departamento de Informação e Documentação Científica do Instituto de Energia Atômica de São Paulo, TEREZINE ARANTES FERRAZ e à Diretora da Divisão de Informação do Instituto de Energia Atômica de São Paulo, IDELMA PAGLIUSI, pela revisão das referências bibliográficas.
- A LEONOR VASCONCELOS DA SILVA, Secretária do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, pelo cuidadoso serviço datilográfico e ao Sr. CÉLIO FAVERO, operador de "Off set".
- Aos colegas do Laboratório de Biologia Celular, pelo auxílio durante a realização do presente trabalho.

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO	1
II. MATERIAIS E MÉTODOS	5
1. MATERIAIS	5
2. MÉTODOS E TÉCNICAS	5
2.1. Métodos Morfológicos	5
2.1.1. Ao Nível Óptico	5
2.1.2. Ao Nível Ultra-estrutural	5
2.2. Métodos Morfométricos	6
2.2.1. Determinação do Número de Cromatófo ros por Área de Escama (Densidade) ...	6
2.2.2. Determinação do Diâmetro da Área Celu lar Ocupada pelos Grânulos de Melanina Dispersos e Agregados	7
2.2.3. Estimativa da Fração da Superfície Ex terna da Escama Ocupada pelos Grânulos de Melanina Dispersos e Agregados	8
2.3. Métodos Citofisiológicos	8
2.3.1. Efeito dos Íons Sódio e Potássio sobre a Migração dos Grânulos de Melanina "In Vitro"	8
2.3.2. Efeito da Radiação Ionizante sobre a Mi gração dos Grânulos de Melanina "In Vi tro"	9
2.3.3. Efeito de Baixas Temperaturas (0°- 4°C) sobre a Migração dos Grânulos de Mela nina "In Vitro"	10

III.	OBSERVAÇÕES E RESULTADOS.	11
1.	Morfológicos	11
1.1.	Descrição Morfológica do Teleósteo <u>Geophagus</u> <u>brasilensis</u>	11
1.2.	Morfologia dos cromatóforos ao Nível Óptico.....	12
1.3.	Morfologia dos Melanóforos ao Nível Ultra-estru- tural	15
2.	Morfométricos	19
2.1.	Distribuição e Número dos Cromatóforos por Área de Escama (Densidade).....	19
2.2.	Diâmetro da Área Celular Ocupada pelos Grânu- los de Melanina Dispersos e Agregados	26
2.3.	Fração da Superfície Externa da Escama Ocupada pelos Grânulos de Melanina Dispersos e Agrega- dos	27
3.	Citofisiológicos.....	28
3.1.	Efeito dos Íons Sódio e Potássio sobre a Migra- ção dos Grânulos de Melanina "In Vitro"	28
3.2.	Efeito da Radiação Ionizante sobre a Migração dos Grânulos de Melanina "In Vitro"	31
3.3.	Efeito de Baixas Temperaturas (0° - 4°C) sobre a Migração dos Grânulos de Melanina "In Vitro"...	32
IV.	DISCUSSÃO.....	37
V.	CONCLUSÕES	44
VI.	RESUMO	45
VII.	SUMMARY	46
VIII.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

I. INTRODUÇÃO.

A mudança de cor nos animais é uma das diversas formas de resposta aos estímulos ambientais. Este processo é mais frequentemente encontrado em vertebrados pe⁽⁴⁵⁾lcilotérmicos e em alguns grupos de invertebrados (PARKER⁽⁴⁶⁾, 1930; SAWAYA⁽⁵²⁾, 1939; PAR⁽⁴⁹⁾KER⁽¹⁶⁾, 1948; FINGERMAN⁽¹⁷⁾, 1959; PROSSER e BROWN⁽²⁵⁾, 1961; FINGERMAN, 1970; HADLEY, 1972). Um dos exemplos mais conhecidos é do camaleão, que se mimetiza rapidamente, confundindo-se com o meio ambiente.

Esta mudança de cor baseia-se na atividade de célu⁽²⁾las pigmentadas, situadas no tegumento e denominadas cromatóforos. Os cromatóforos, de acordo com a cor que apresentam (BAGNARA, 1966) podem ser classificados; a) melanóforos - células negras, acinzentadas ou pardas devido à presença de melanina; b) xantóforos - células amarelas devido à presença de pigmentos pteridínicos, carotenóides, ou de ambos; c) eritróforos - células alaranjadas ou avermelhadas devido também à presença de pigmentos pteridínicos, carotenóides, ou de ambos e d) iridóforos - células que possuem no citoplasma cristais de purinas, principalmente guanina, e que são responsáveis pelos reflexos iridescentes.

Os cromatóforos frequentemente são células achata⁽²⁾das, de forma estrelada, apresentando pigmentos contidos em grânulos citoplasmáticos característicos. Estas células têm a propriedade de deslocar centrífuga e centrípetamente os grânulos de pigmento, ao longo de várias ramificações, promovendo a mudança de cor do animal. Assim, quando os grânulos pigmentados estão dispersos no citoplasma, o animal adquire uma coloração mais escura, e quando estão

agregados no centro celular, o animal adquire uma coloração mais clara. Estas variações na distribuição do pigmento, geralmente em resposta imediata a determinados estímulos ambientais, são denominadas de mudanças fisiológicas de cor.

Por outro lado, existe um outro tipo de mudanças de cor, as morfológicas, que aparecem mais tardiamente e duram mais tempo, podendo resultar da modificação quantitativa e/ou qualitativa da pigmentação, ou ainda da variação do número de células pigmentadas (PARKER⁽⁴⁶⁾, 1948; ODIORNE⁽⁴⁴⁾, 1957; PROSSER⁽⁴⁹⁾ e BROWN⁽⁶¹⁾, 1961; WARING⁽¹⁹⁾, 1963; FUJII⁽²⁵⁾, 1969; HADLEY, 1972).

As mudanças de cor podem ser efetuadas através de células pigmentadas isoladamente, ou ainda, através da interação uma com as outras ou com outros elementos do tegumento (PARKER⁽⁴⁶⁾, 1948; TAYLOR e BAGNARA⁽⁵⁹⁾, 1972; HAWKES⁽²⁶⁾, 1974). A "Unidade Cromatofórica" constitui um dos exemplos desta última possibilidade, sendo caracteristicamente encontrada em anfíbios e répteis (BAGNARA⁽⁵⁾, TAYLOR e HADLEY⁽³⁾, 1968; BAGNARA⁽⁴⁾, 1969; BAGNARA, HADLEY e TAYLOR⁽⁵⁹⁾, 1969; TAYLOR e BAGNARA⁽⁴¹⁾, 1972; MISCALENCU⁽⁴²⁾ e IONESCU, 1972; MISCALENCU e IONESCU, 1973).

Sabe-se da literatura que o controle da atividade cromatofórica, dependendo da espécie considerada, pode ser nervoso ou endócrino (PARKER⁽⁴⁶⁾, 1948; PROSSER e BROWN⁽⁴⁹⁾, 1961; WARING⁽⁶¹⁾, 1963; FUJII⁽¹⁹⁾, 1969; FUJII e NOVALES⁽²²⁾, 1969). Apesar disso, conforme constataram diversos autores (SPAETH⁽⁵⁸⁾, 1913; SPAETH⁽⁴⁰⁾, 1916; MATTHEWS⁽³²⁾, 1931; IWATA, WATANABE e KURIHARA⁽³³⁾, 1959; IWATA, WATANABE e NAGAO⁽⁷⁾, 1959; ETOH⁽¹²⁾, 1963; BIKLE, TILNEY e PORTER⁽²⁴⁾, 1966; GREEN, 1968;

(1) (19) (22)
 ABBOTT , 1969; FUJII , 1969; FUJII e NOVALES , 1969; WIKS
 (62) (48)
 WO e NOVALES , 1969; PORTER, BENNETT e JUNQUEIRA , 1970;
 (34) (63)
 JUNQUEIRA , 1972; WIKSWO e NOVALES , 1972; FUJII, NAKA
 (21) (54)
 ZAWA e FUJII , 1973; SCHLIWA e BEREITER-HAHN , 1973; JUN
 (35) (43)
 QUEIRA, RAKER e PORTER , 1974; MURPHY e TILNEY , 1974;
 (8) (9)
 CASTRUCCI , 1975; CASTRUCCI , 1975), essas células possuem a
 capacidade de responder "in vitro" a diversos tipos de estímulos ambi
 entais.

Para a medida desta resposta através da migração
 dos grânulos pigmentados, foram propostos diversos métodos. Dentre
 os mais utilizados podemos citar o do "Diâmetro Celular" (SPAETH
 (58) (28)
 , 1916); do "Índice Melanofórico" (HOGBEN e SLOME , 1931; SA
 (52)
 WAYA , 1939) e da "Fotometria" (HILL, PARKINSON e SOLANDT,
 (27) (56) (46)
 , 1935; SMITH , 1936). PARKER , (1948) fez uma revisão
 crítica de cada método.

Em decorrência destes estudos, várias hipóteses fo
 ram propostas para explicar o mecanismo básico da migração intrace
 (30)
 lular de grânulos pigmentados: a do movimento amebóide (HOOKER ,
 (6)
 1914); do movimento peristáltico (BALLOWITZ , 1914); da contração
 (58)
 celular (SPAETH , 1916); da transformação sol-gel do citoplasma
 (39) (14)
 (MARSLAND , 1944); da contração fibrilar (FALK e RHODIN ,
 (36)
 1957) e da eletroforese intracelular (KINOSITA , 1963). Atualmente,
 (7)
 entretanto, diversos autores (BIKLE, TILNEY e PORTER , 1966;
 (24) (62)
 GREEN , 1968; WIKSWO e NOVALES , 1969; PORTER, BENNETT
 (48) (37) (38)
 e JUNQUEIRA , 1970; MALAWISTA , 1971; MALAWISTA 1971;
 (63) (47)
 WIKSWO e NOVALES , 1972; PORTER , 1973; SCHLIWA e BE
 (53) (54)
 REITER-HAHN , 1973; SCHLIWA e BEREITER-HAHN , 1973; FU
 (20) (35)
 JII e MIYASHITA , 1974; JUNQUEIRA, RAKER e PORTER , 1974;

(43) (9)
MURPHY e TILNEY , 1974; CASTRUCCI , 1975) sugeriram a participação de microtúbulos neste processo, uma vez que estas organelas são relacionadas com os movimentos celulares em geral(INOUE e SATO (31) , 1967; ROTH (51) , 1967; TILNEY e PORTER (60) , 1967; HOLMES e CHOPPIN (29) , 1968; DUSTIN (11) , 1972; SCHRÉVEL e BUISSON (55) NET , 1973).

Apesar dos vários trabalhos realizados, porém, ainda não se acha bem esclarecido o mecanismo de migração desses grânulos.

O objetivo do presente trabalho foi o de contribuir com algumas informações sobre células pigmentadas. Estudamos os melanóforos do tegumento do Teleósteo Geophagus brasiliensis, abordando principalmente os seguintes aspectos:

- 1) morfologia dos melanóforos aos níveis óptico e ultra-estrutural;
- 2) participação dos melanóforos na mudança fisiológica de cor e do padrão pigmentar da espécie, através de estudos morfométricos;
- 3) comportamento dos melanóforos em presença dos íons sódio e potássio "in vitro";
- 4) efeito da radiação ionizante sobre o movimento dos grânulos pigmentados dos melanóforos "in vitro";
- 5) comportamento dos melanóforos quando submetidos à temperatura - de 0° - 4° C "in vitro".

II. MATERIAIS E MÉTODOS.

1. MATERIAIS.

Escamas e nadadeiras de Geophagus brasiliensis, com 10-15 cm de comprimento total, proveniente da Represa de Guapiranga, Estado de São Paulo, foram os materiais de escolha para este estudo.

2. MÉTODOS E TÉCNICAS.

2.1. Métodos Morfológicos.

2.1.1. Ao Nível Óptico: para o estudo morfológico dos cromatóforos, escamas e fragmentos de nadadeiras foram removidos dos animais, colocados em lâminas escavadas, imersos em solução de Ringer contendo 5,5 g/l de NaCl, 0,14 g/l de KCl e 0,12 g/l de CaCl_2 , pH ajustado para 7,3 por meio de NaOH (YOUNG⁽⁶⁴⁾, 1933) e observados ao microscópio óptico.

Os preparados de fragmentos de nadadeira caudal ("Split Preparation"), realizados de acordo com a técnica de FUJII⁽¹⁸⁾, (1959), foram fixados em solução de glutaraldeído a 2% em tampão fosfato 0,2M por 30 minutos, montados entre lâmina e lamínula em solução de PVP (polivinil pirrolidona) a 10% (P/V) em glicerina a 50% (V/V) e fotografados ao Fotomicroscópio ZEISS modelo II.

2.1.2. Ao Nível Ultra-estrutural: para o estudo ultra-estrutural, fragmentos de nadadeira caudal foram

fixados em solução de glutaraldeído a 2% em tampão fosfato 0,2M, pH 7,2 durante 2 horas à temperatura ambiente (25°C). Foram lavados em solução salina a 0,6%, fixados a seguir em solução de OsO₄ a 1% em tampão fosfato 0,2M durante 2 horas e lavados em solução salina a 0,6%. Foram corados em solução de acetato de uranila a 1,5 % durante 2 horas e desidratados em série alcoólica, passando depois pela acetona. Finalmente, foram embebidos em resina Polylite 8001 com 1% de peróxido de benzoila (COIRO, WEIGEL, KISIELIUS, MENEZES e BILOTTA⁽¹⁰⁾, 1972) e polimerizados a 60°C, durante 72 horas. Os cortes foram efetuados em Ultramicrotomo L.K.B., corados pelo citrato de chumbo⁽⁵⁰⁾ (REYNOLDS, 1963), e examinados ao Microcópio Eletrônico EM 9S, CARL ZEISS.

2.2. Métodos Morfométricos.

2.2.1. Determinação do Número de Cromatóforos por Área de Escama (Densidade): utilizamos 5 peixes, dos quais colhemos 3 escamas de cada uma das regiões, a saber: antero-dorsal, antero-lateral, antero-ventral, médio-dorsal, médio-lateral, médio-ventral, pósterio-dorsal, pósterio-lateral e pósterio-ventral. As escamas foram fixadas em solução de glutaraldeído a 2% em tampão fosfato 0,2M durante 30 minutos, e montadas entre lâmina e lâminula em solução de PVP a 10% em glicerina a 50%.

Para a determinação da densidade adaptamos à lente ocular do microscópio um retículo com $0,1681 \text{ mm}^2$ de área, no aumento de $\times 200$. Em cada escama contamos os cromatóforos presentes em 10 campos escolhidos ao acaso e os resultados foram calculados para uma área de 1 mm^2 . Com estes dados, determinamos as médias seguidas de seus respectivos desvios padrão e analisamos a significância dos valores obtidos nas diversas regiões através do teste "t". (GOLDSTEIN (23), 1965).

2.2.2. Determinação do Diâmetro da Área Celular Ocupada pelos Grânulos de Melanina Dispersos e Agregados: utilizamos 3 peixes, dos quais coletamos 6 escamas de cada uma das regiões mencionadas no item 2.2.1. Três escamas de cada região foram imersas em solução de NaCl 0,1M por 15 minutos à temperatura ambiente (25°C) e as restantes em solução de KCl, para se obterem respectivamente, dispersão e agregação dos grânulos de melanina. A seguir, fixamos e montamos as escamas segundo a técnica descrita no item 2.2.1.

Para esta determinação adaptamos à ocular do microscópio óptico, uma escala com divisões, de modo que a cada divisão correspondu $7,2 \mu\text{m}$ no aumento de $\times 200$. Em cada escama medimos os diâmetros das áreas celulares

ocupadas pelos grânulos de melanina, dispersos ou agregados conforme o caso, de 10 melanóforos escolhidos ao acaso. A partir dos valores obtidos , nas condições de dispersão e agregação, calculamos as respectivas médias gerais e seus correspondentes desvios padrão, seguidos do teste "t".

2.2.3. Estimativa da Fração da Superfície Externa da Es
cama Ocupada pelos Grânulos de Melanina Disper
sos e Agregados: utilizamos 3 peixes dos quais coletamos 6 escamas da região antero-dorsal. Três escamas de cada exemplar foram imersas em solução de NaCl 0,1M e as demais em solução de KCl 0,1M por 15 minutos à temperatura ambiente (25°C). A seguir, fixamos e montamos as escamas segundo a técnica descrita no item 2.2.1.

Para esta experiência, utilizamos uma lente ocular integradora I da CARL ZEISS de 25 interseções ("hits"). Em cada escama contamos 10 campos escolhidos aleatoriamente no aumento de x 320. Os resultados expressos em médias seguidas de seus correspondentes desvios padrão, foram submetidos ao teste "t".

2.3. Métodos Citofisiológicos.

2.3.1. Efeito dos íons Sódio e Potássio sobre a Migração
dos Grânulos de Melanina "In Vitro": escamas da região antero-dorsal foram removidas com pinça, e imersas por 15-30 minutos em so

lução de Ringer à temperatura ambiente (25°C). A seguir, a solução de Ringer foi substituída por soluções de KCl 0,1M e NaCl 0,1M alternadamente, acompanhando-se ao microscópio óptico, o efeito destes íons sobre a migração dos grânulos de melanina. Para seu registro usamos o "Índice Melanofórico" considerando-se 4 graus, correspondendo o grau 1 à máxima agregação e o grau 4 à máxima dis(28)persão, que HOGBEN e SLOME (1931), propuseram e adotaram nas pesquisas sobre os melanóforos de anfíbios.

2.3.2. Efeito da Radiação Ionizante sobre a Migração dos Grânulos de Melanina "In vitro": escamas coletadas da região antero-dorsal, mantidas em tubos de vidro, contendo solução de Ringer, foram irradiadas com raios gama com uma Bomba de Cobalto-60 (Gammacell 220), nas doses de 10 000, 50 000, 100 000, 130 000 e 150 000 rad', respectivamente. A taxa de dose foi cerca de $5,82 \times 10^5$ rad/hora. Após a irradiação, as escamas de cada grupo, foram estimuladas contínua e alternadamente com soluções de KCl 0,1M e NaCl 0,1M à temperatura ambiente (25°C). Os melanóforos incapazes de responder em presença dos íons potássio, foram estimulados com adrenalina (5×10^{-5} M) dissolvida em solução de Ringer. As reações dos melanóforos foram observadas ao microscópio óptico.

2.3.3. Efeito da Baixa Temperatura (0 - 4°C) sobre a Migração dos Grânulos de Melanina "In vitro": es camas removidas da região antero-dorsal foram divididas em 2 grupos, A e B, previamente trata das com soluções de NaCl 0,1M e KCl 0,1M, res pectivamente, à temperatura ambiente (25°C). A se guir, estas escamas foram incubadas nas mesmas soluções durante 30 minutos à temperatura de 0 - 4°C. Após o período de incubação, as escamas do grupo A, foram estimuladas com íons potássio e as do grupo B, com íons sódio a 0 - 4°C, para ve rificar respectivamente, os efeitos da baixa tempe ratura, sobre as migrações centrípeta e centrífu ga dos grânulos pigmentados. Posteriormente, es tas escamas passaram a ser estimuladas à tempe ratura ambiente (25°C) com os mesmos íons. A ob servação dos melanóforos foi realizada ao microscó pio óptico.

Os mesmos materiais submetidos aos tratamentos acima mencionados foram processados para a microscopia eletrônica conforme descritos em Métodos morfológicos 2.1.2., para a análise da ultra-estrutura dos melanóforos submetidos à baixa temperatura (*), e a dos melanóforos transfe ridos posteriormente à temperatura ambiente (25°C).

(*) a fixação, coloração e desidratação foram realizadas à temperatura de 0 - 4°C.

III. OBSERVAÇÕES E RESULTADOS.

1. Morfológicos.

1.1. Descrição Morfológica do Teleósteo Geophagus brasiliensis.

O Teleósteo Geophagus brasiliensis (QUOY & GAIMARD, 1824) (FIG. 1), apresenta o corpo achatado lateralmente e coberto de escamas ctenóides. A coloração é, em geral, pardo-acizentada, mais escura no dorso, apresentando cada escama, pequena mancha azul-iridescente. As nadadeiras dorsal, ventrais, anal e caudal são acinzentadas com manchas e estrias azuladas e avermelhadas. As nadadeiras peitorais são amareladas.

Esta espécie ainda se caracteriza por apresentar uma faixa escura vertical que se estende do ápice da cabeça ao rebordo inferior do opérculo, passando pelos olhos e um disco escuro na região médio-lateral.



FIG. 1 - Geophagus brasiliensis. (Acará Diadema). Tamanho natural.

1.2. Morfologia dos Cromatóforos ao Nível Óptico.

Na pele desta espécie podemos distinguir 4 tipos de cromatóforos: melanóforos, xantóforos, eritróforos e iridóforos. Como se sabe, são células pigmentadas que se localizam na derme, e recobertas por camadas de células epidérmicas.

Os melanóforos são células pardo-escuras e estreladas, com processos ramificados, apresentando de dois a quatro núcleos excêntricos, facilmente observáveis entre os grânulos de melanina (FIG. 2). Estes grânulos observados individualmente, dispõem-se ao longo dos processos celulares em filas mais ou menos paralelas. Quando os grânulos de melaninas estão dispersos ao máximo, o centro celular apresenta-se claro, e nele faltam os grânulos, os quais passam a ocupar totalmente os respectivos processos celulares. Em caso contrário, agregam-se de forma compacta no corpo celular, permanecendo os processos celulares desprovidos de pigmento. (FIG. 3).

Nos xantóforos que são células amarelas, de contornos irregulares e pouco nítidos, não se distingue granulação (FIG. 3).

Os eritróforos podem apresentar cor alaranjada ou vermelha (FIG. 4) e predominam nas nadadeiras. Os eritróforos vermelhos são menos frequentes. Morfologicamente os eritróforos assemelham-se aos melanóforos.

Os iridóforos são células pequenas, de forma alongada e de aspecto iridescente. Estas células podem ser encontradas em grupos compactos, formando manchas azuis-iridescentes, ou agrupadas ao redor dos outros tipos de cromatóforos, principalmente dos melanóforos (FIG. 5).



FIG. 2 - Geophagus brasiliensis, Melanóforos (M). Notam-se grânulos pigmentados dispersos; numerosos processos celulares ramificados (Pc); dois núcleos (N) e alguns xantóforos (X) que rodeiam o melanóforo. (X1.300)

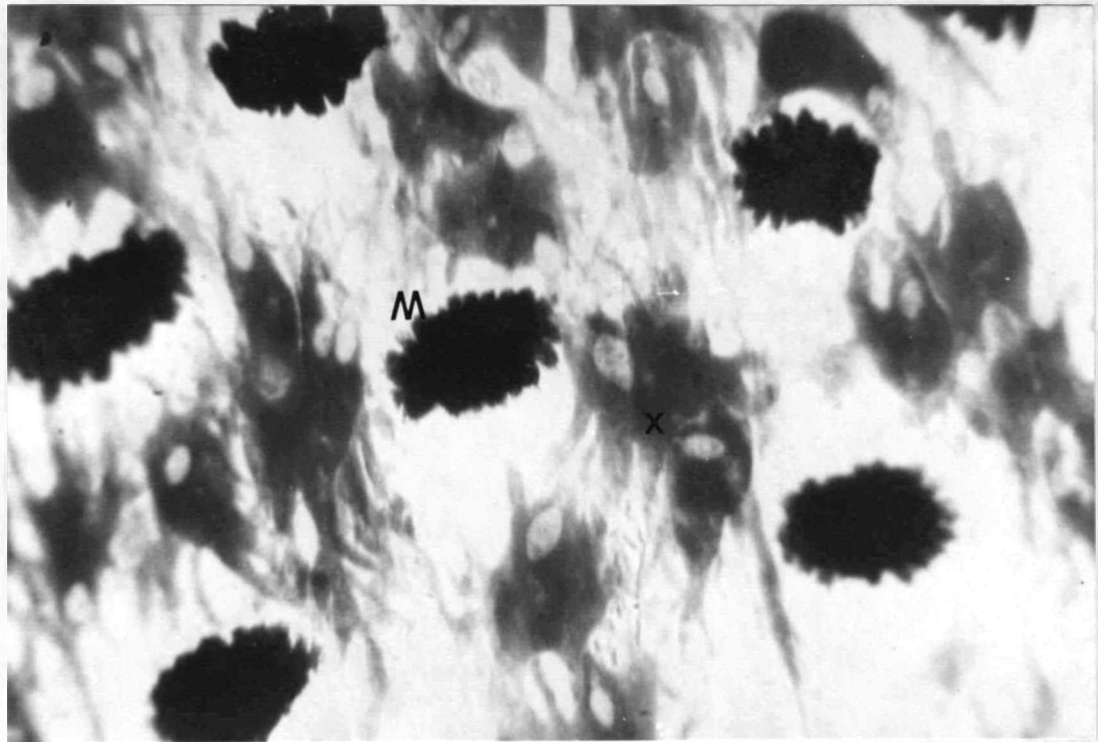


FIG. 3 - Geophagus brasiliensis, Melanóforos (M) com os grânulos de pigmento agregados no corpo celular. Xantóforos (X) contrastam com os melanóforos. (X1.300)

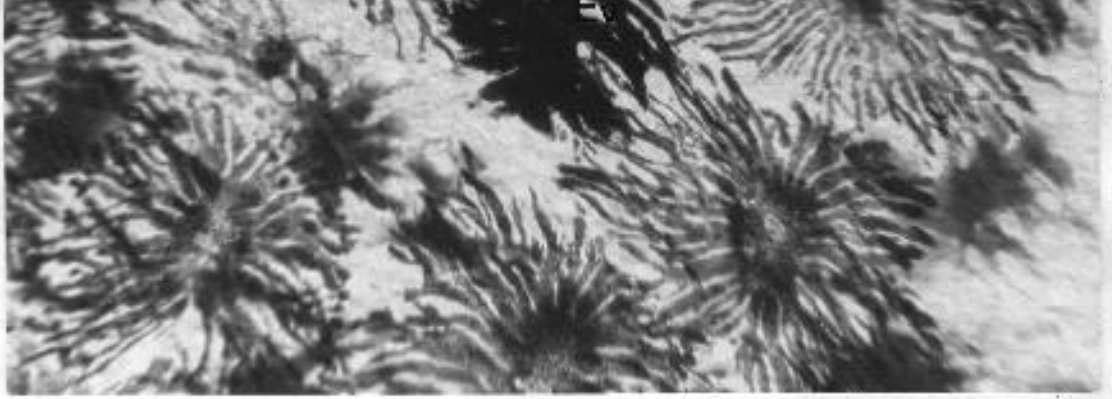


FIG. 4 - Geophagus brasiliensis. Melanóforos (M) e eritróforos verme
lho (Ev) e alaranjados (Ea) (X800)

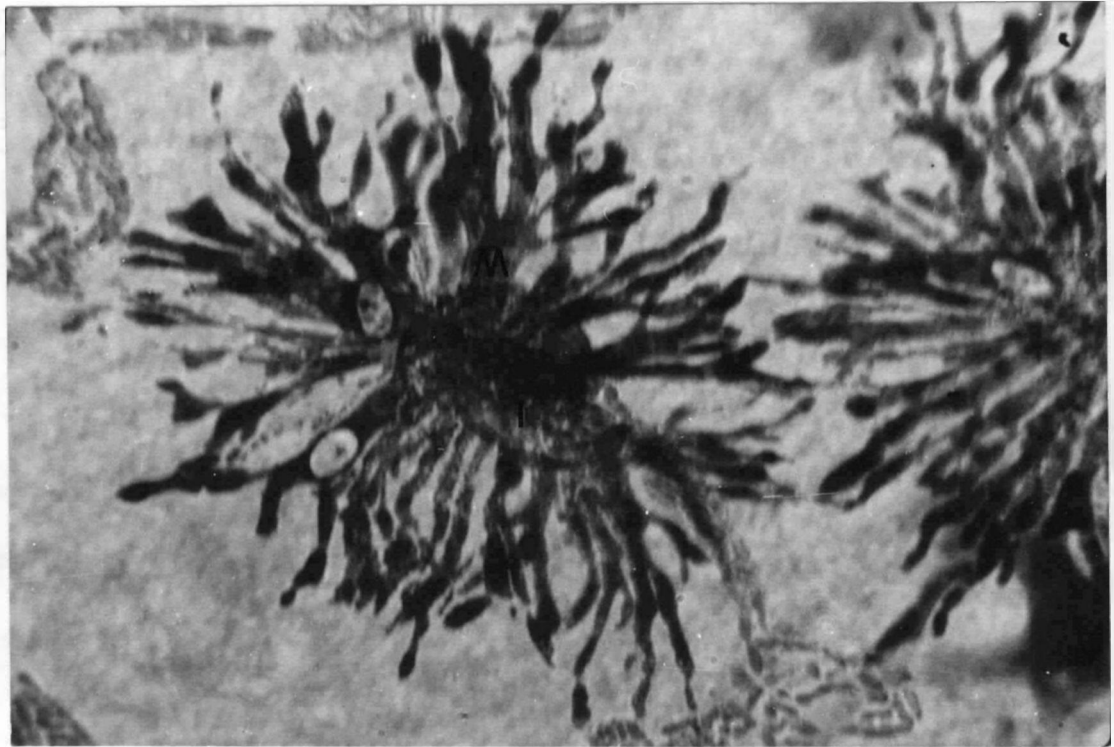


FIG. 5 - Geophagus brasiliensis. Aglomerado de iridóforos (I) ao re
dor do corpo celular de um melanóforo (M). (X2.200)

1. 3. Morfologia dos Melanóforos ao Nível Ultra-estrutural.

Ao nível ultra-estrutural, os melanóforos apresentam-se envolvidos por membrana plasmática (FIG. 6), ao longo do qual se observam inúmeras vesículas de micropinocitose.

O citoplasma caracteriza-se pela presença de numerosos grânulos de forma esférica ou elíptica com conteúdo fortemente eletrondispersante e homogêneo, circunscrito por uma membrana, medindo 0,5 μ m de diâmetro médio. O retículo endoplasmático liso é moderadamente desenvolvido e encontra-se disperso por todo o citoplasma, entre os grânulos. No centro celular (FIG. 7) ocorre um par de centríolos e ao redor destas estruturas, é frequente a presença de delicadas cisternas de retículo endoplasmático, algumas com ribossomos aderidos às superfícies externas, ribossomos livres e polissomos em número moderado, 3 a 4 complexos de Golgi pouco desenvolvidos, e pequenos acúmulos de material finamente granular e denso, semelhantes aos descritos por SCHLIWA e BEREITER-HAHN (53) (1973).

Microtúbulos com cerca de 24 nm de diâmetro, irradiam-se do centro celular, isolados ou formando feixes paralelos, que percorrem longitudinalmente os processos celulares (FIG. 8), aparentemente projetando-se contra a membrana plasmática da extremidade distal destes (FIG. 9). Entre estes microtúbulos, grânulos de pigmento - podem estar alinhados.

Além destas estruturas, um número moderado de mitocôndrios, ribossomos livres, polissomos e microfilamentos (3 a 5 nm de diâmetro) ocorrem irregularmente dispersos no citoplasma. Os mitocôndrios de forma esférica ou de bastonete, possuem cristas em prateleira e matriz sem grânulos densos.

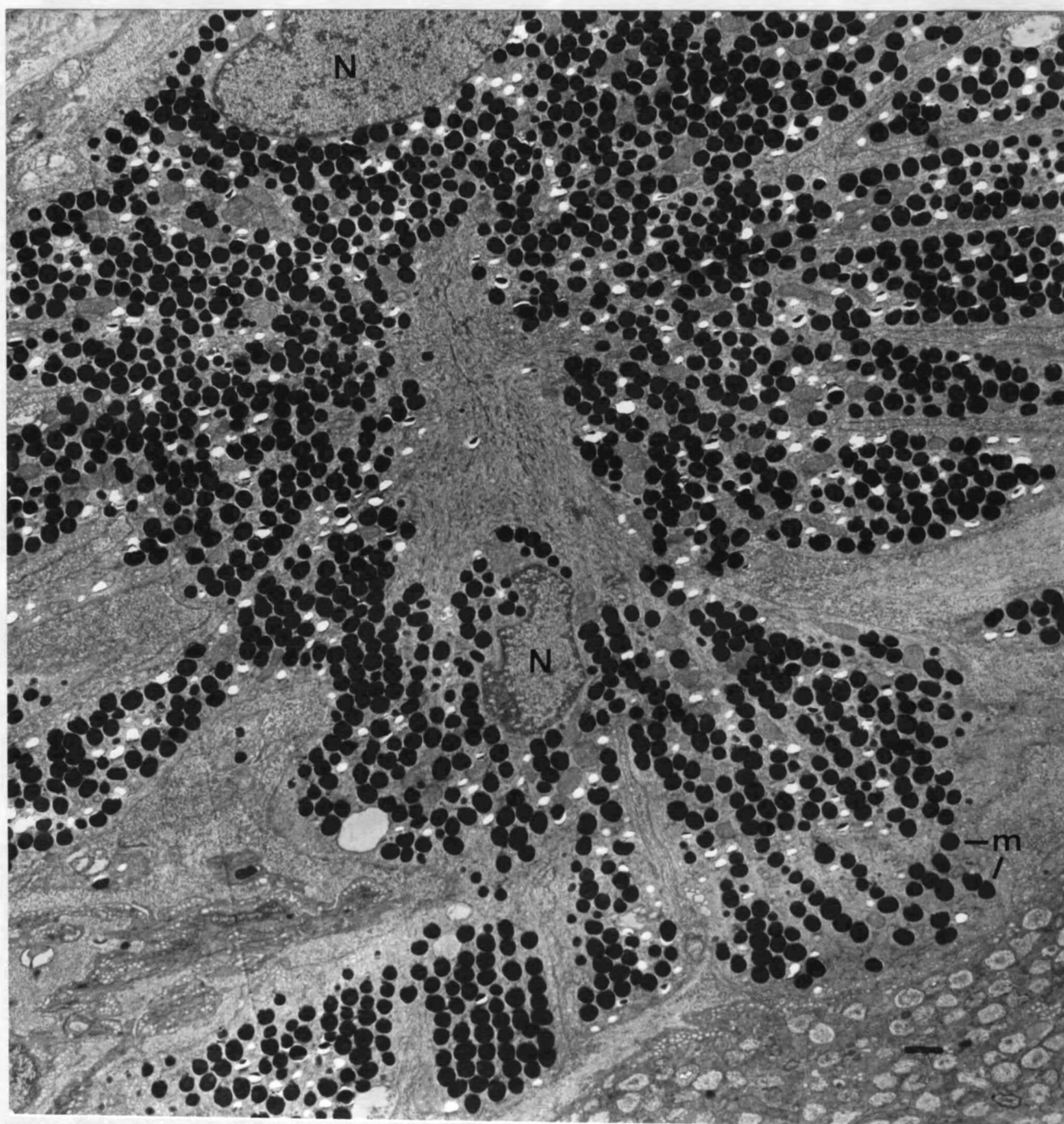


FIG. 6 - Eletromicrografia do melanóforo com os grânulos de melanina (melanosomos) (m) dispersos nos processos celulares. Entre os dois núcleos (N) excêntricos, situa-se o centro celular, ca racteristicamente sem grânulos de pigmento.

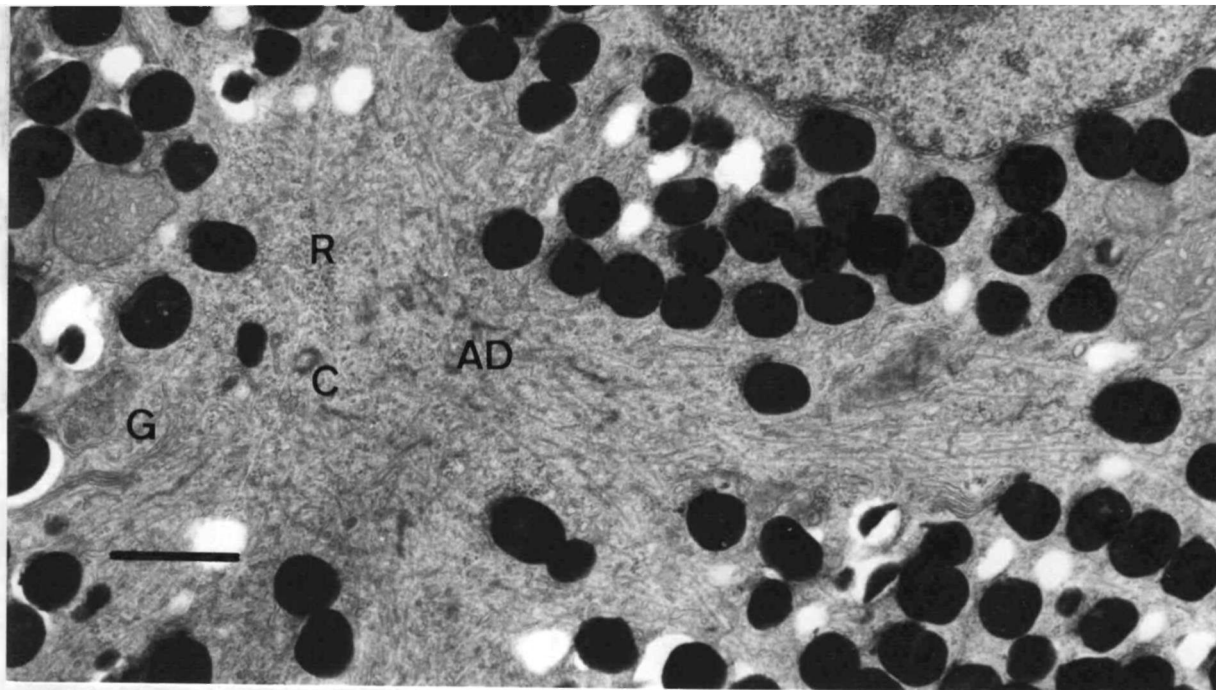


FIG. 7 Eletromicrografia do centro celular de um melanóforo.
AD= área densa ; C= centríolo; G= complexo de Golgi; N= nú-
cleo; Nu= núcleolo; R= ribossomos.

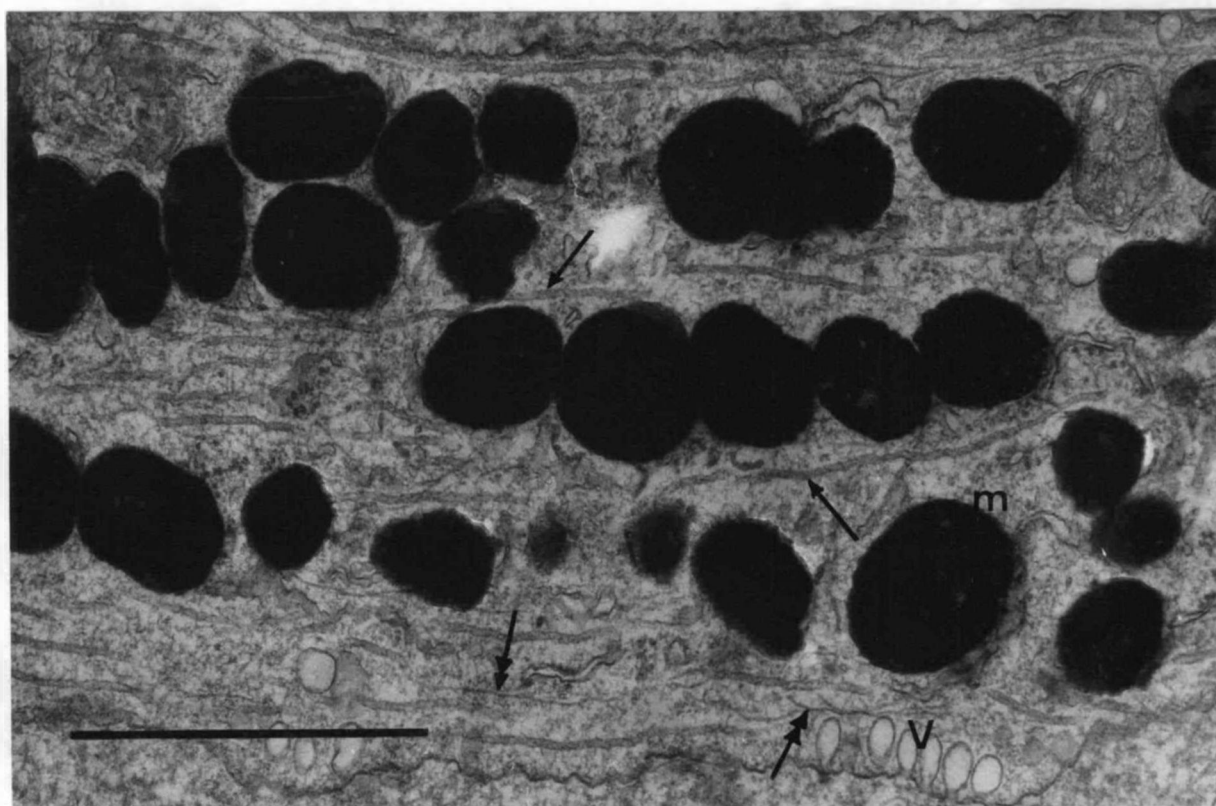


FIG. 8 Eletromicrografia de um segmento de processo melanofórico.
Entre os microtúbulos (setas), observam-se melanossomos (m). As setas (↔) indicam os microfilamentos. V=vesícu-
las de micropinocitose.

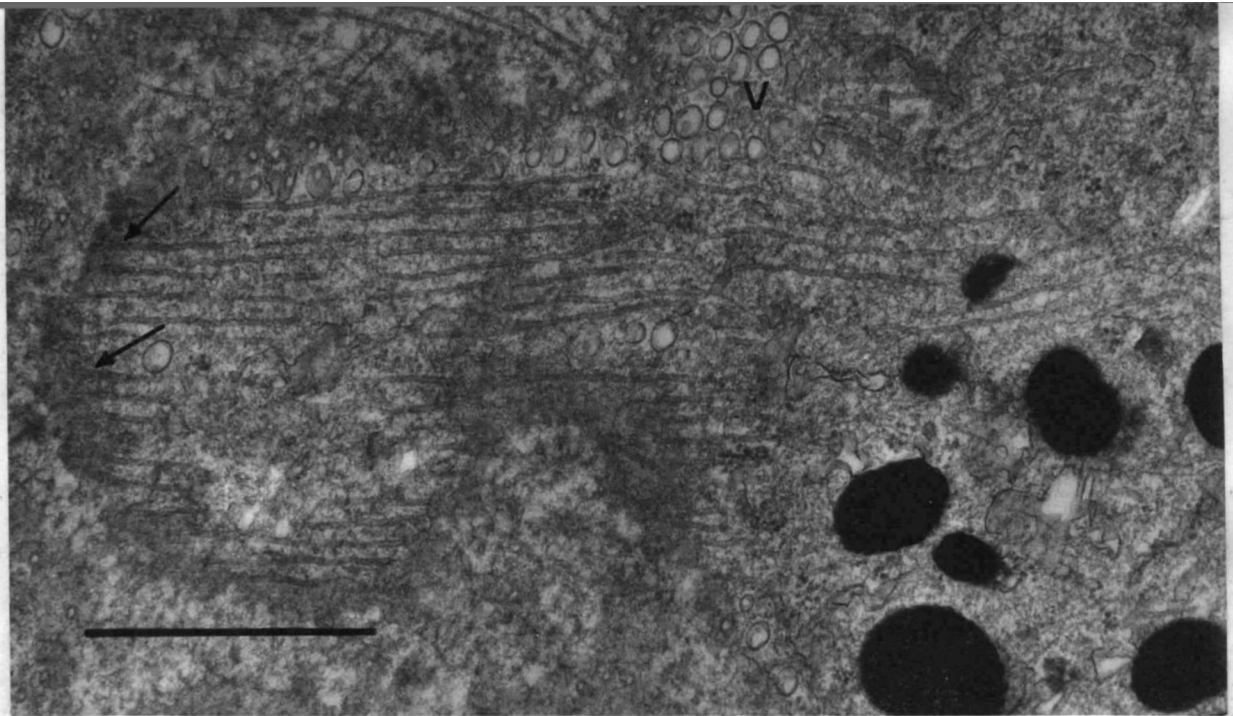


FIG. 9 - Eletromicrografia de uma extremidade distal de processo melanofórico, onde se observa a projeção dos microtúbulos (setas) sobre a membrana plasmática. V= vesículas de micropinocitose.

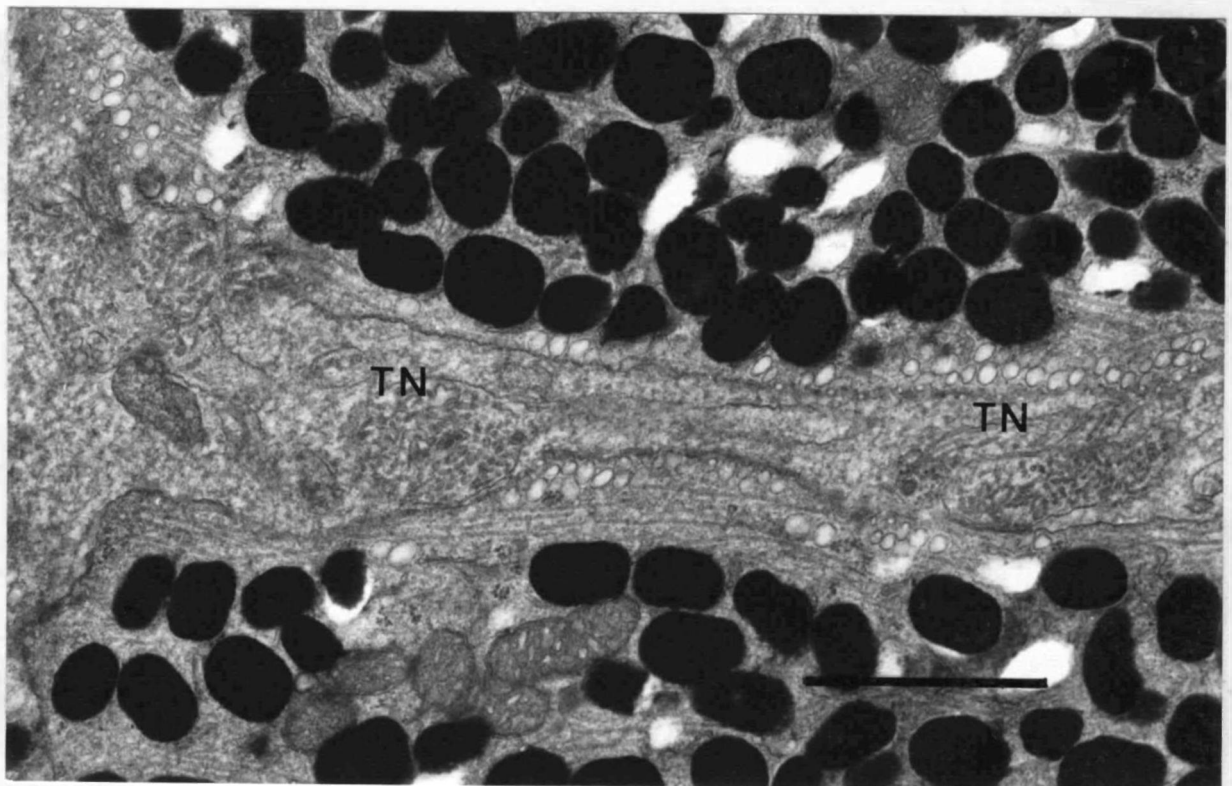


FIG. 10 - Eletromicrografia mostrando terminações nervosas (TN), junto à membrana plasmática de processos melanofóricos. Numerosas vesículas sinápticas são observáveis no interior das terminações nervosas.

Ocasionalmente são encontrados lisossomos, corpos multivesiculares e figuras de Mielina. Notam-se no citoplasma, pequenas vesículas arredondadas ou ovaladas, medindo $0,15\ \mu\text{m}$ de diâmetro médio, contendo material finamente granular, de média eletrondispersividade, embora em pequena quantidade, tanto no corpo como nos processos celulares.

Os núcleos, geralmente em número de dois, ocupam posições excêntricas, com frequência opostas, no corpo celular. O envoltório nuclear, sem ribossomos aderidos, apresenta numerosos poros com diafragma. A cromatina é dispersa. Um, ou mais raramente dois nucleólos, podem ser encontrados em cada núcleo.

Ao longo da membrana plasmática dos processos celulares, várias terminações nervosas foram observadas, contendo grande número de vesículas de perfil circular ou ovalado, por vezes com conteúdo de média ou alta eletrondispersividade (FIG. 10). Um ou dois mitocôndrios pequenos podem ocorrer entre estas vesículas sinápticas.

2. Morfométricos.

2.1. Distribuição e Número de Cromatóforos por Área de Escama (Densidade).

Os resultados deste estudo estão expressos nas TABELAS I, II, III e IV.

Examinando-se as TABELAS I e II, observa-se que os melanóforos e xantóforos ocorrem em todas as nove regiões consideradas. A interpretação dos dados de ambas as tabelas após tratamento pelo teste "t" (GOLDSTEIN⁽²³⁾, 1965) ($t_{\alpha} = 2,31$ e $\alpha = 0,05$) sugere:

- a) haver um gradiente de densidade melanofórica de crescente em sentido dorso-ventral. ($t = 5,51$; $t = 7,01$; $t = 12,01$; $t = 5,59$ e $t = 11,24$);
- b) que entre as 3 regiões consideradas (anterior, média e posterior) de cada faixa (dorsal, lateral e ventral) não há diferença significativa das densidades melanofóricas. ($t = 0,42$; $t = 1,22$; $t = 1,76$; $t = 1,01$ e $t = 0,18$);
- c) que a densidade melanofórica da mancha escura ca racterística da região médio-lateral, apresenta-se alta em relação às regiões antero-lateral e postero-lateral, porém semelhante às densidades das re giões dorsais. ($t = 0,89$);
- d) haver um gradiente de densidade xantofórica de crescente em sentido dorso-ventral. ($t = 6,87$; $t = 11,91$; $t = 8,05$; $t = 13,50$; $t = 6,60$ e $t = 10,81$);
- e) haver na faixa dorsal um gradiente de densidade xanto fórica antero-posterior decrescente. ($t = 1,55$ e $t = 4,00$);
- f) não haver diferença significativa entre as densida des xantofóricas das 3 regiões da faixa lateral. ($t = 0,35$ e $t = 1,25$);
- g) haver na faixa ventral um gradiente de densidade xantofórica antero-posterior crescente. ($t = 2,02$ e $t = 3,85$).

Em contraposição aos melanóforos e xantóforos, os e ritróforos alaranjados e avermelhados não são frequentes; são

escassos e restritos às regiões laterais e ventrais, conforme se observa nas TABELAS III e IV. Assim sendo, devido à grande variabilidade dos valores obtidos e o alto valor de seus desvios padrão, não se justifica a aplicação do teste "t" na distribuição dos eritróforos.

O estudo na densidade dos iridóforos não foi realizado em virtude destas pequenas células se apresentarem comumente aglomeradas, ocuparem diferentes níveis da pele que recobre as escamas e, nos preparados histológicos, serem incolores. No entanto, verificamos que este tipo celular ocorre em todas as regiões examinadas.

Apesar de não ter sido aferida a densidade cromatófórica nas nadadeiras, gostaríamos de mencionar que as manchas e estrias avermelhadas são fundamentalmente constituídas por eritróforos, enquanto que as cinza-azuladas o são por iridóforos e melanóforos.

TABELA I
DENSIDADES DOS MELANÓFOROS

REGIÃO	Densidade Média (nº de células/mm ²)
antero-dorsal	220,94 $\pm$ 51,32
antero-lateral	91,97 $\pm$ 10,40
antero-ventral	56,43 $\pm$ 10,83
médio-dorsal	209,87 $\pm$ 28,95
médio-lateral (mancha escura)	194,60 $\pm$ 24,98
médio-ventral	50,76 $\pm$ 6,25
pósterio-dorsal	189,92 $\pm$ 23,92
pósterio-lateral	110,37 $\pm$ 20,94
postero-ventral	55,08 $\pm$ 12,16

TABELA II
DENSIDADES DOS XANTÓFOROS

REGIÃO	Densidade Média (nº de células/mm ²)
antero-dorsal	340,94 $\pm$ 55,16
antero-lateral	102,36 $\pm$ 54,58
antero-ventral	40,25 $\pm$ 11,97
médio-dorsal	294,46 $\pm$ 37,80
médio-lateral (mancha escura)	112,47 $\pm$ 33,53
médio-ventral	55,40 $\pm$ 11,79
pósterio-dorsal	229,54 $\pm$ 28,92
pósterio-lateral	133,92 $\pm$ 14,62
pósterio-ventral	72,81 $\pm$ 14,62

TABELA III

DENSIDADES DOS ERITRÓFOROS ALARANJADOS

REGIÃO	Densidade Média (nº de células/mm ²)	
antero-dorsal	-	
antero-lateral	12, 17 $\pm$	12, 84
antero-ventral	15, 86 $\pm$	13, 78
médio-dorsal	-	
médio-lateral (mancha escura)	14, 55 $\pm$	15, 46
médio-ventral	10, 54 $\pm$	14, 78
pósterodorsal	-	
pósterolateral	3, 93 $\pm$	7, 82
pósteroventral	0, 71 $\pm$	1, 59

TABELA IV

DENSIDADES DOS ERITRÓFOROS AVERMELHADOS

REGIÃO	Densidade Média (nº de células/ mm ²)
antero-dorsal	
antero-lateral	1,31 $\pm$ 1,96
antero-ventral	1,82 $\pm$ 1,55
médio-dorsal	
médio-lateral (mancha escura)	0,16 $\pm$ 0,26
médio-ventral	0,12 $\pm$ 0,10
pósterodorsal	
pósterolateral	
póstero-ventral	

2.2. Diâmetro da Área Celular Ocupada pelos Grânulos de Melanina Dispersos e Agregados.

Com o intuito de avaliar quantitativamente a participação dos melanóforos na mudança fisiológica de cor, iniciamos determinando o diâmetro da área celular ocupada pelos grânulos de melanina dispersos e agregados.

Os resultados desta determinação estão expressos na TABELA V.

Assim, o diâmetro da área celular ocupada pelos grânulos de melanina dispersos foi de $113,66\mu\text{m}$, e quando agregados, de $18,83\mu\text{m}$. O teste "t" ($t = 34,18$) demonstrou significância entre as médias ($t_{\alpha} = 1,96$ e $\alpha = 0,05$).

Verificamos ainda que os melanóforos de várias regiões apresentaram os diâmetros das áreas celulares ocupadas por seus grânulos pigmentados relativamente constantes, quer no estado disperso, quer no estado agregado.

TABELA V
DIÂMETRO DA ÁREA CELULAR OCUPADA PELOS GRÂNULOS DE MELANINA

	Melanóforos com grânulos dispersos (μm)	Melanóforos com grânulos agregados (μm)
peixe nº 1	$108,60 \pm 11,58$	$19,74 \pm 0,95$
peixe nº 2	$112,51 \pm 13,59$	$18,81 \pm 0,59$
peixe nº 3	$119,87 \pm 16,70$	$17,96 \pm 0,98$
Média final	$113,66 \pm 14,37$	$18,83 \pm 1,11$

2.3. Fração da Superfície Externa da Escama Ocupada pelos Grânulos de Melanina Dispersos e Agregados.

Os resultados deste estudo morfométrico, realizado com o intuito de avaliar quantitativamente a participação dos melanóforos na mudança fisiológica de cor, estão expressos na TABELA VI.

Assim, os grânulos de melanina quando dispersos e agregados, ocuparam respectivamente 67,15% e 10,49% da fração da superfície externa da escama.

Estes valores foram calculados levando-se em consideração as médias dos números de melanóforos iguais a 22,80 e 23,10 por campo microscópico, com grânulos dispersos e agregados, respectivamente. O teste "t" ($t = 26,64$) demonstrou ser significativa a diferença entre as médias ($t_{\alpha} = 2,12$ e $\alpha = 0,05$).

TABELA VI

FRAÇÃO DA SUPERFÍCIE EXTERNA DA ESCAMA OCUPADA PELOS GRÂNULOS DE MELANINA

	Melanóforos com grânulos dispersos (%)	Melanóforos com grânulos agregados (%)
peixe nº 1'	63,60 $\pm$ 2,40	9,07 $\pm$ 2,05
peixe nº 2'	64,27 $\pm$ 4,60	11,87 $\pm$ 1,51
peixe nº 3'	73,60 $\pm$ 5,20	10,53 $\pm$ 1,66
Média final	67,15 $\pm$ 6,08	10,49 $\pm$ 1,95

3. Citofisiológicos.

3.1. Efeito dos íons Sódio e Potássio sobre a Migração dos Grânulos de Melanina "In Vitro".

Observamos que os íons sódio provocam nos melanóforos "in vitro" dispersão dos grânulos de melanina, ao contrário dos íons potássio, que nas mesmas condições, provocam agregação. As FIGS. 11, a, b, c, d, ilustram estas observações.

Os efeitos que estes íons causam sobre os melanóforos, além de antagônicos, são reversíveis, o que nos permite estimular essas células alternada e repetidamente, resultando migrações centrífugas e centrípetas dos grânulos de melanina ao longo dos processos celulares. Estas dispersões e agregações dos grânulos se processam de forma sincrônica e regular ao redor de 100 minutos, após o que, as migrações se tornam mais retardadas e de caráter mais irregular (FIG. 12).

O efeito dos íons potássio, observável pela migração centrípeta ou agregação dos grânulos de melanina, é mais rápido, uniforme e regular que o efeito dos íons sódio. Quando melanóforos com grânulos dispersos naturalmente ou por efeito dos íons sódio, são estimulados com íons potássio, percebe-se que o processo migratório dos grânulos de melanina se inicia na extremidade distal dos processos celulares. Progressivamente o restante dos grânulos, ordenados em filas mais ou menos paralelas e em movimento contínuo, migram ao longo dos processos celulares e se concentram no corpo celular. Esta migração se realiza num tempo médio de 90 segundos.

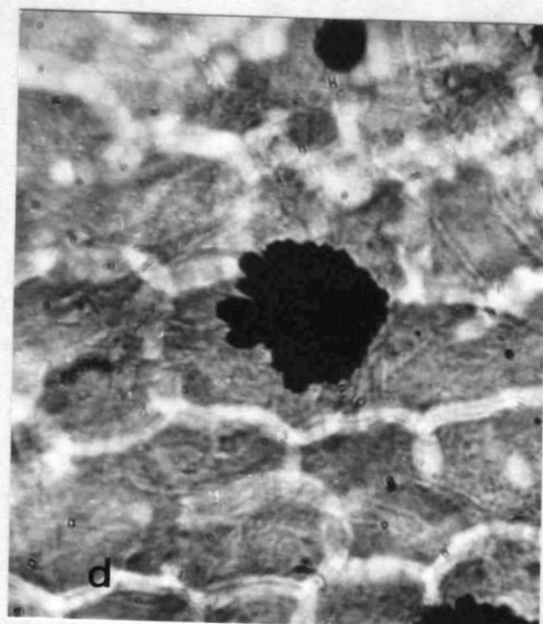
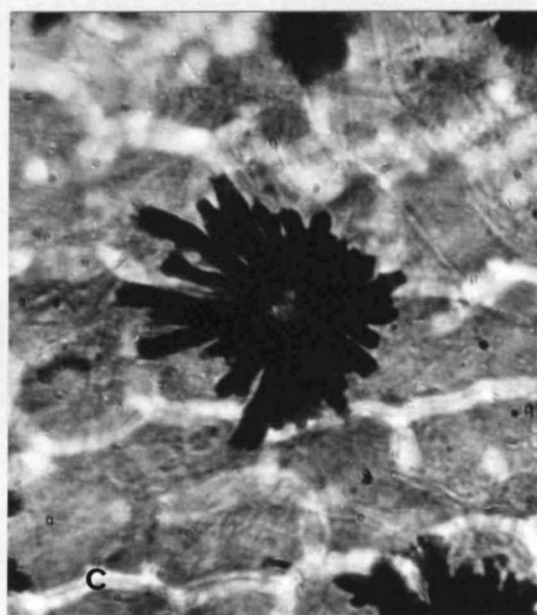
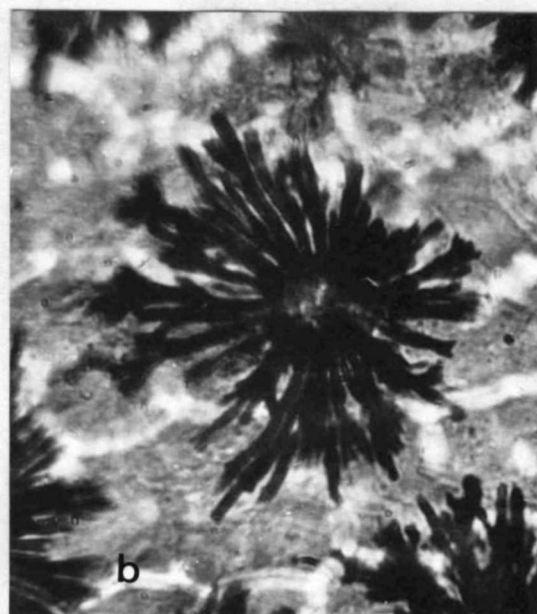
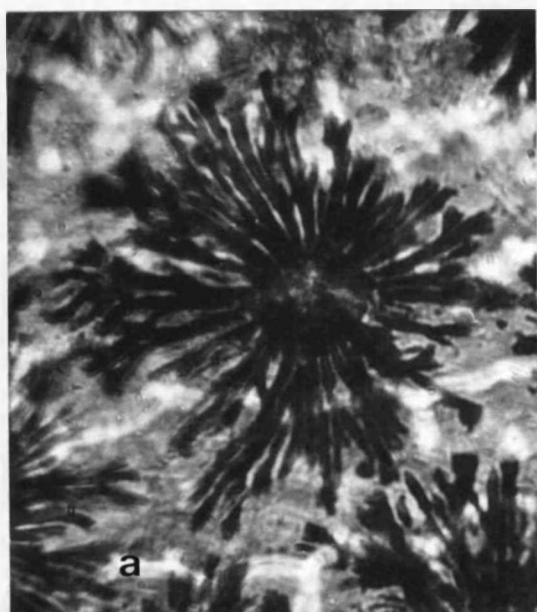


FIG. 11 - a,b,c,d. Fotomicrografias de um melanóforo estimulado com íons potássio, mostrando vários estágios de agregação dos seus grânulos. O processo inverso (dispersão) o correrá se esta célula for estimulada com íons sódio. (x 1600).

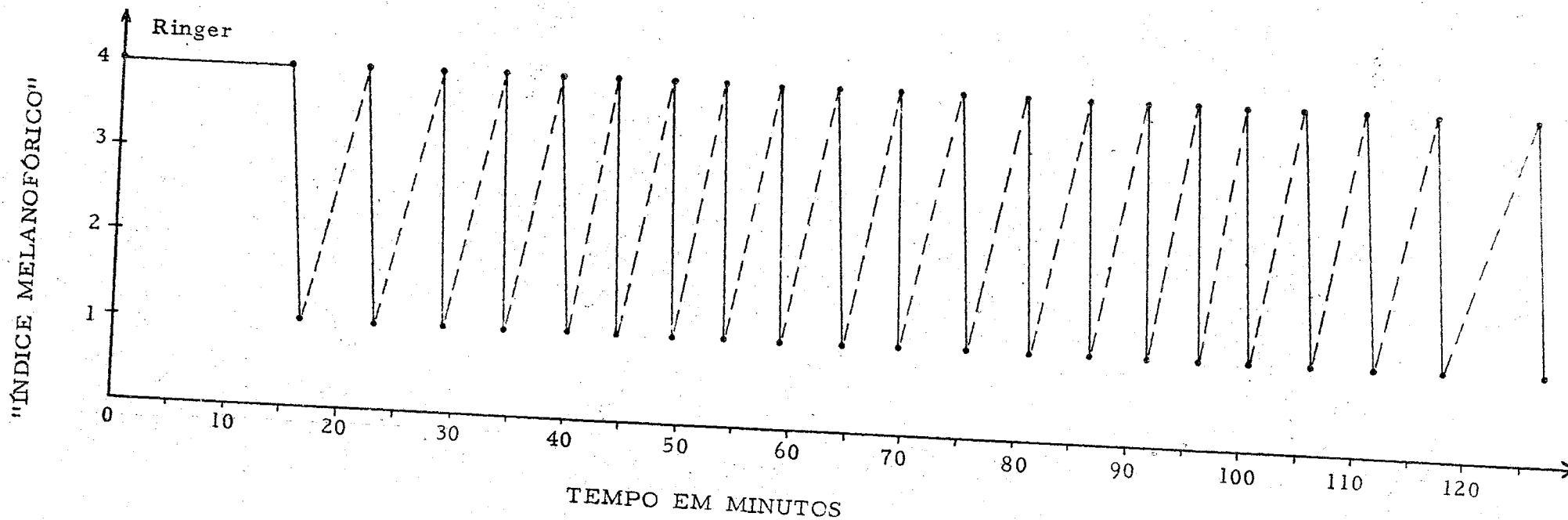


FIG. 12 - Curva de respostas melanofóricas regulares e sincrônicas, obtida pela estimulação alternada com soluções de KCl 0,1M (—) e NaCl 0,1M, (-----) após incubação por 15 minutos em solução de Ringer. Temperatura ambiente = 25°C.

O efeito dos íons sódio sobre os melanóforos é ca racterizado pela migração centrífuga ou dispersão de seus grãnulos de melanina, que se verifica num tempo médio de 5 mi nutos. Nesta migração, percebe-se que os grânulos de melanina deslocam-se em bloco, em direção às extremidades distais dos processos celulares. Esse avanço se faz sob forma saltatória ou de pulsações de pequena amplitude.

Além deste movimento de migração, pode-se distinguir outros dois tipos de movimentos destes grânulos, quais sejam:

"Movimento de Vai e Vem", que se caracteriza pelo movimento de pequenos grupos de grânulos que, em direção axial se deslocam proximal e distalmente, em curta distância.

"Movimento Vibratório", que se observa em todos os grânulos, sendo irregular e de pequena amplitude.

3.2. Efeito da Radiação Ionizante sobre a Migração dos Grânulos de Melanina "In Vitro".

Os melanóforos irradiados com raios gama na dose de 10 000 rad., quando estimulados alternadamente com soluções de NaCl 0,1M e KCl 0,1M, respondem dispersando e agregando os seus grânulos de pigmento, respectivamente. Apresentam reações indistinguíveis das dos normais, tanto no tempo de migração como no período de resposta.

No entanto, um ligeiro retardamento na migração dos grânulos em resposta aos íons sódio, foi observado na do

se de 50 000 rad. Com o aumento das doses, as migrações dos grânulos, principalmente a dispersão, tornaram-se gradativamente mais retardadas, ocorrendo uma diminuição no período de resposta, regular e sincrônica, proporcional à dose respectiva.

Na dose de 150 000 rad., a dispersão dos grânulos em resposta aos íons sódio foi totalmente inibida, permanecendo os melanóforos com os grânulos agregados. No entanto, o "Movimento de Vai e Vem" e o "Movimento Vibratório" dos grânulos, menos intensamente que os dos normais foram observados nestes melanóforos.

A FIG. 13 mostra os efeitos de diferentes doses de radiação gama sobre o tempo máximo de resposta regular e sincrônica dos melanóforos, quando estimulados contínua e alternadamente com soluções de NaCl 0,1M e KCl 0,1M.

Cabe aqui referir que a adrenalina (5×10^{-5} M) determinou a agregação dos grânulos de melanina aos quais deixaram de responder aos íons potássio.

3.3. Efeito de Baixas Temperaturas (0° - 4°C) sobre a Migração dos Grânulos de Melanina "In Vitro".

Verificamos que, quando os melanóforos são submetidos às baixas temperaturas, a movimentação dos grânulos de melanina cessa e a migração dos mesmos em sentido tanto centrífugo como centrípeto em respostas aos íons sódio e potássio, respectivamente, é inibida.

Uma análise ultra-estrutural destes melanóforos, mostrou a ausência dos microtúbulos, tanto na região do

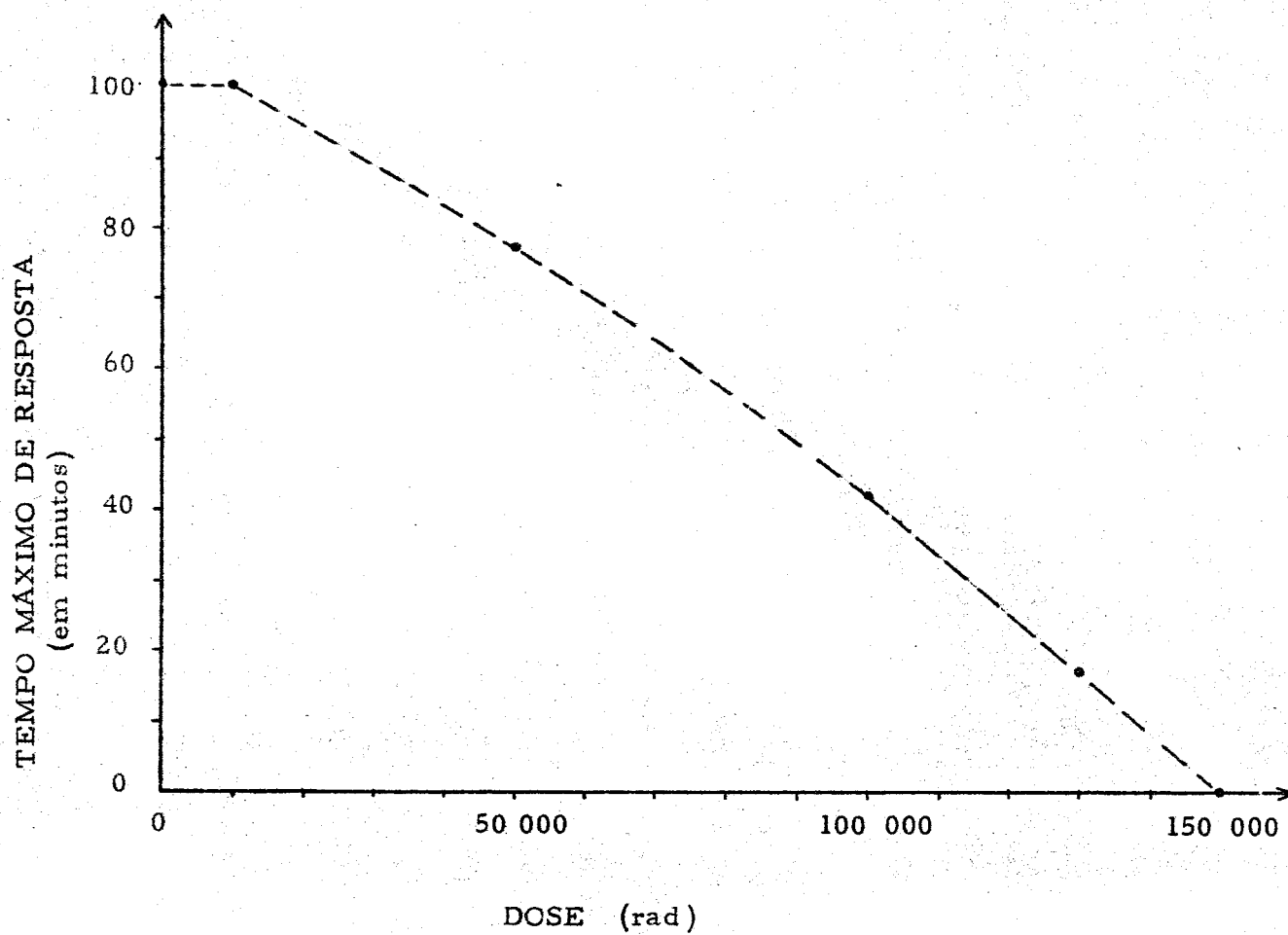


FIG. 13 - Relação entre a dose de radiação gama e o tempo máximo de resposta melanofórica regular e sincrônica.

corpo celular como nos processos celulares, enquanto que ou tras organelas permaneceram aparentemente inalteradas (FIGS. 14 e 15). Com frequência, feixes densos de microfilamentos, distribuídos irregularmente no citoplasma, foram observados.

Quando os melanóforos são transferidos à tempera tura ambiente (25°C), imediatamente se reiniciam o "Movimento de Vai e Vem" e o "Movimento Vibratório" dos grânulos.

Nos melanóforos estimulados com íons potássio, den tro de um a dois minutos, os grânulos de melanina próximos às bases dos processos celulares migram em resposta aos íons potássio, formando uma massa compacta no corpo celu lar, enquanto que os grânulos restantes permanecem imóveis nos processos celulares. Posteriormente, estes grânulos, da extremidade proximal à distal dos processos celulares, mi gram em sentido centrípeto, de modo progressivo, irregular, em tempos variáveis, ocorrendo a agregação num tempo mé dio de 15 minutos.

Nos melanóforos estimulados com íons sódio, os grânulos de pigmento migram em sentido centrífugo, sob for ma saltatória ou de pulsações de pequena amplitude, ainda que lentamente em relação aos dos normais, ocorrendo a disper são dos grânulos num tempo médio de 15 minutos.

A FIG. 16 mostra a ultra-estrutura do melanóforo fixado 2 minutos após ser transferido à temperatura ambien te. Os microtúbulos são encontrados próximos à região do corpo celular, enquanto que nos processos celulares, eles são raramente observados.

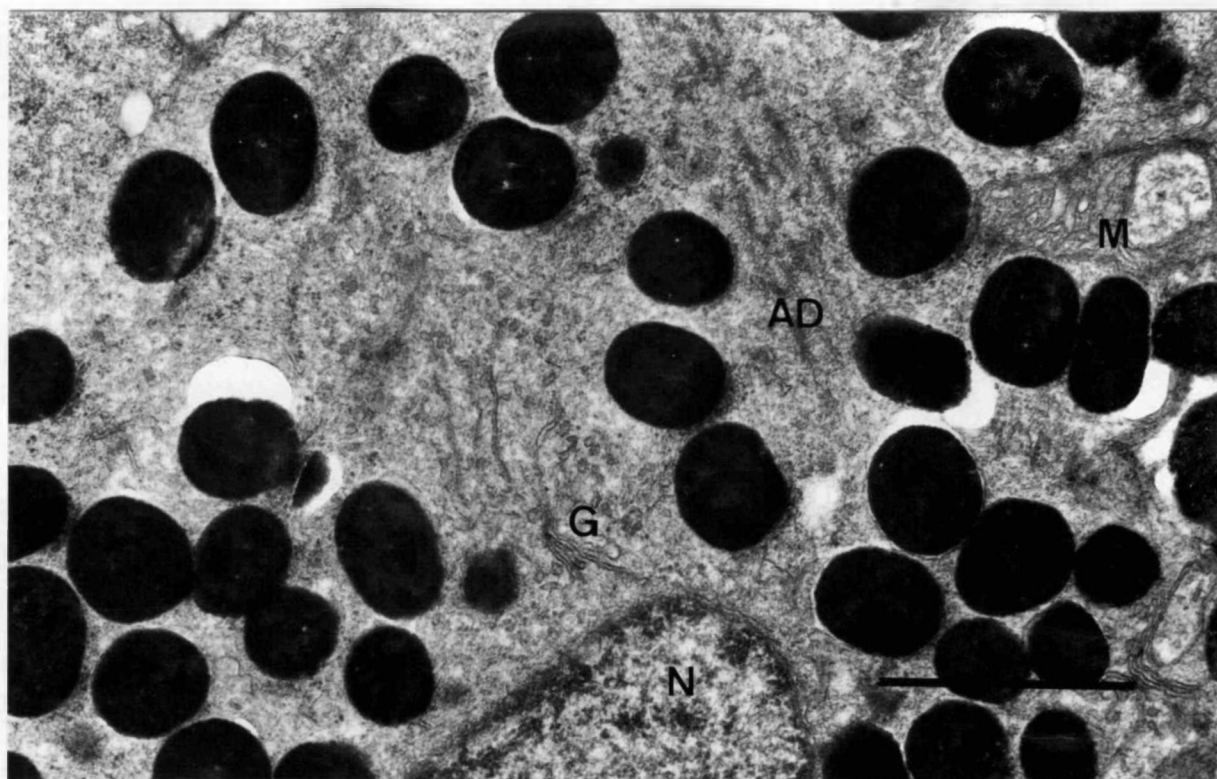


FIG. 14 - Eletronmicrografia do centro celular de melanóforo após incubação durante 30 minutos em solução de NaCl 0,1M à temperatura de 0° - 4°C. Os microtúbulos frequentemente abundantes nesta área da célula, não são observáveis. AD = área densa; G = complexo de Golgi; M=mitocôndrio; N = núcleo.

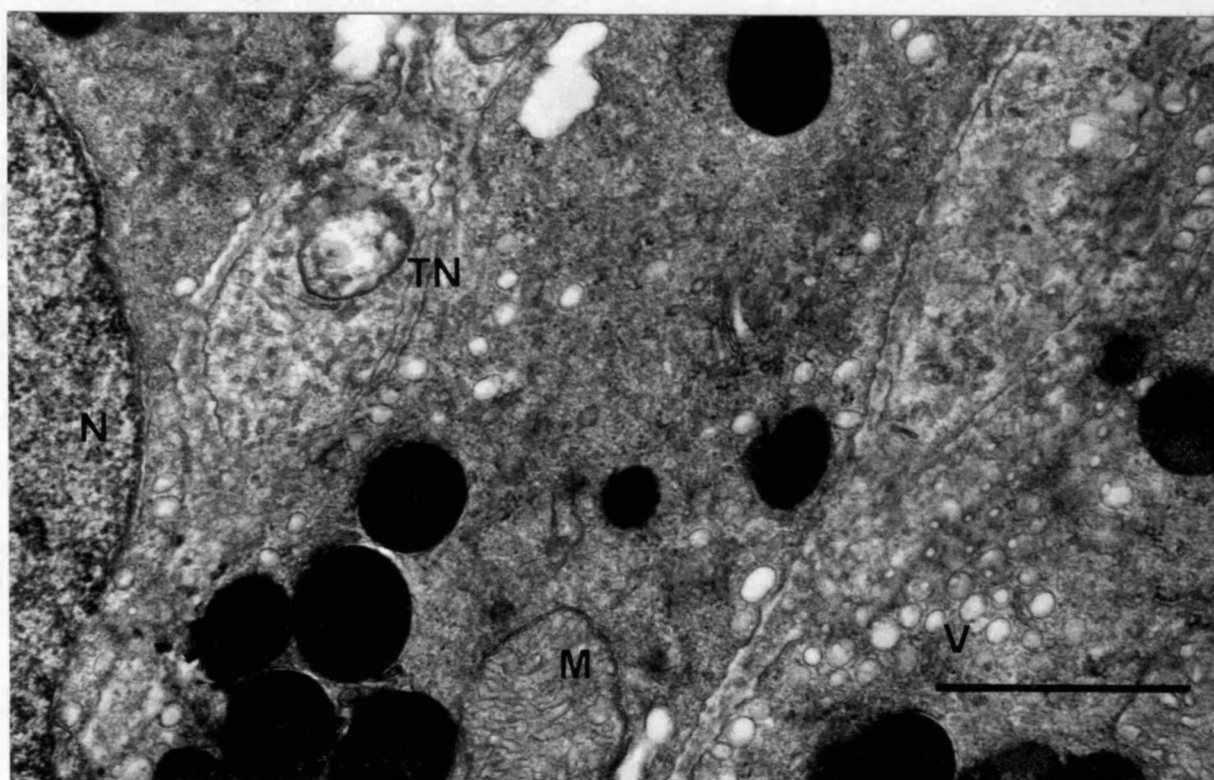


FIG. 15 - Eletronmicrografia de melanóforo após incubação durante 30 minutos em solução de KCl 0,1M à temperatura de 0° - 4°C. Observe-se ausência de microtúbulos no citoplasma. M = mitocôndrio; N = núcleo; TN = terminação nervosa; V = vesículas de micropinocitose.

Após 30 minutos de permanência à temperatura ambiente, o comportamento dos melanóforos em presença dos íons sódio e potássio, assim como a sua ultra-estrutura, foram indistinguíveis das células normais.

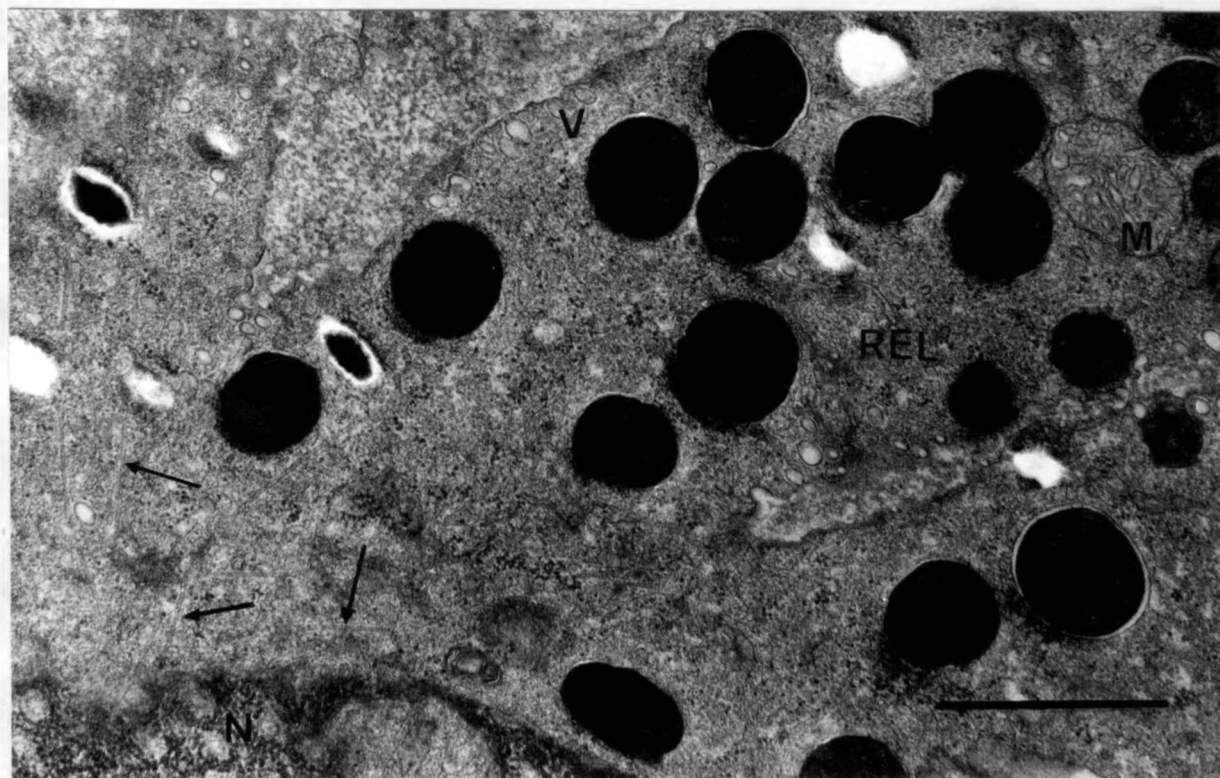


FIG. 16 - Eletromicrografia do melanóforo após incubação durante 30 minutos em solução de NaCl 0,1M à temperatura de 0° - 4°C , fixado 2 minutos após ser transferido à temperatura ambiente (25°C). Observe-se que os microtúbulos (setas) são visíveis apenas na região do corpo celular. M = mitocôndrio; N = núcleo; R = ribossomos; REL = retículo endoplasmático liso; V = vesículas de micropinocitose.

Observamos no tegumento do Teleósteo Geophagus
brasiliensis, a presença de 4 tipos de cromatóforos: melanóforos, xantó-
 foros, eritróforos e iridóforos. Cada tipo celular apresentou cor e mor-
 fologia características (PARKER⁽⁴⁵⁾, 1930; PARKER⁽⁴⁶⁾, 1948; BAGNA-
 RA⁽²⁾, 1966; FUJII⁽¹⁹⁾, 1969; FINGERMAN⁽¹⁷⁾, 1970; FARIAS, BILOT-
 TA, OKAZAKI e JUNQUEIRA⁽¹⁵⁾, 1974).

O colorido básico pardo-acinzentado, característico da espécie, depende, fundamentalmente, dos melanóforos. Estas células pigmentadas, também são as que mais contribuem na mudança de cor, pois dentre outros cromatóforos, são os que mais rapidamente movimen-
 tam seus grânulos pigmentados.

Ao microscópio óptico, os melanóforos mostram - forma estrelada devido às projeções celulares ramificadas. No citoplas-
 ma, é característica a presença de numerosos grânulos de pigmento , pardos ou cinza-enegrecidos. Quando esses grânulos estão dispersos , dois núcleos pálidos e de contornos ovalados são vistos com frequência na periferia do corpo celular. Nesta condição, o centro celular apare-
 ce como uma área circular clara, sem grânulos.

Ao nível ultra-estrutural, o centro celular se ca-
 racteriza pela presença de um par de centríolos, retículo endoplasmáti-
 co liso, ribossomos livres, polissomos, complexos de Golgi e numero-
 sos microtúbulos dispostos radialmente. Pequenos acúmulos de mate-
 rial finamente granular e de alta eletrondispersividade, aparecem mui-
 tas vezes ao redor dos microtúbulos do centro celular. Essas estru-
 ras, observadas também em melanóforos de Pterophyllum scalare , fo-
 ram consideradas por SCHLIWA e BEREITER-HAHN⁽⁵³⁾, (1973), como
 possíveis centros de polimerização de microtúbulos.

Nos processos celulares, os microtúbulos se orien tam paralelamente ao eixo longitudinal. Os grânulos de melanina quan do dispersos, alinham-se frequentemente entre os microtúbulos. Mito côndrios, elementos vesiculares do retículo endoplasmático liso, ribos somos livres, polissomos e microfilamentos são observados irregular mente distribuídos entre os microtúbulos e grânulos de pigmento.

A relativa escassez de mitocôndrios, permite supor que o melanóforo requer baixa taxa de energia para suas atividades. Ri bossomos e polissomos em pequenas quantidades sugerem moderada síntese protéica para uso próprio. Pequenas cisternas com ribossomos aderidos só ocasionalmente são observadas. A ocorrência rara de es truturas lisossômicas sugere pequena taxa de renovação das organelas melanofóricas, por extensão, baixo "turn over" de melanina. As pe quenas vesículas contendo material granular, encontradas dispersas no citoplasma, são de natureza e função ainda desconhecidas.

Os núcleos apresentam geralmente perfil irregular. O envoltório nuclear, sem ribossomos aderidos, possui numerosos po ros com diafragma. Em meio à cromatina dispersa, geralmente se ob serva um nucléolo.

As vesículas de micropinocitose ocorrem em grande número, ao longo de toda a membrana plasmática. BIKLE, TILNEY e (7) PORTER, (1966) sugeriram uma possível relação entre estas estru turas e o transporte de mediadores químicos.

A presença nas terminações nervosas, de vesícu las de perfil circular e ovalado, medindo cerca de 35 - 65 nm, por ve zes contendo material denso, indica que as mesmas são de natureza a drenérgica (JUNQUEIRA, RAKER e PORTER (35), 1974).

Estas observações ultra-estruturais estão de acordo

com as de BIKLE, TILNEY e PORTER⁽⁷⁾ (1966); GREEN⁽²⁴⁾ (1968); FU⁽¹⁹⁾ JII⁽⁶³⁾ (1969); WIKSWO e NOVALES⁽³⁵⁾ (1972); JUNQUEIRA, RAKER e PORTER⁽⁸⁾ (1974) e CASTRUCCI⁽⁸⁾ (1975).

Os cromatóforos encontram-se amplamente distribuídos em todas as regiões examinadas da pele, com exceção dos eritróforos que se acham restritos às regiões laterais e ventrais, em pequena quantidade. No entanto, estes cromatóforos, principalmente os do tipo alaranjado, são encontrados em grande número nas manchas ou estrias avermelhadas das nadadeiras.

As densidades melanofórica e xantofórica decrescem em sentido dorso-ventral. Este gradiente de densidade cromatofórica que confere ao dorso uma tonalidade mais escura que a do ventre, constitui uma característica geral dos peixes.

A mancha circular, característica da região médio-lateral, é notavelmente mais escura que as regiões dorsais. Como a densidade melanofórica na mancha e das regiões dorsais são semelhantes, e os melanóforos da mancha apresentam-se nitidamente mais escuros, a diferença de tonalidade entre essas duas áreas parece decorrer de uma maior quantidade de melanina por célula na mancha.

Frequentemente, os melanóforos estão associados aos iridóforos, formando estes reflexos verde-azulados ao redor dos corpos celulares dos melanóforos. Ao nível ultra-estrutural, pequenos agrupamentos de iridóforos foram observados entre as bases dos processos melanofóricos. Este tipo de associação cromatofórica é característica também em outras espécies (PARKER⁽⁴⁵⁾, 1930; HAWKES⁽²⁶⁾, 1974; CASTRUCCI⁽⁸⁾, 1975).

Uma vez verificado que os melanóforos são os cromatóforos que mais efetivamente concorrem para as mudanças de cor nes

ta espécie, determinamos quantitativamente sua participação neste fenômeno, verificando que o pigmento disperso ocupa uma área, cujo diâmetro é cerca de 6 vezes maior que o da área que ocupa quando agregado. O mesmo resultado foi obtido, para a fração da superfície externa da escama ocupada pelos grânulos de melanina, nos dois extremos de distribuição do pigmento. Estes dados nos mostram uma distribuição relativamente ampla dos grânulos pigmentados ao longo dos processos melanofóricos, o que permite ao animal exibir variada gama de tonalidades.

A movimentação dos grânulos pigmentados foi observada "in vitro", submetendo-se os melanóforos à ação dos íons sódio e potássio. Assim, os íons potássio induzem uma migração centrípeta dos grânulos de melanina, que se verifica num tempo médio de 90 segundos. Inversamente, os íons sódio provocam uma migração centrífuga dos grânulos pigmentados, sendo seu efeito mais lento, menos regular e uniforme do que o dos íons potássio, ocorrendo a dispersão num tempo, cerca de 3 vezes maior do que o de agregação.

Estímulos alternados e contínuos com estes dois íons sobre os melanóforos, resultaram em dispersões e agregações de seus grânulos que se processaram de forma sincrônica, regular e homogênea, por um período de tempo em torno de 100 minutos. A partir daí, as migrações dos grânulos tornaram-se mais retardadas e de caráter mais irregular. Durante estas migrações, 3 tipos de movimentos dos grânulos ("Movimento de Massa", "Movimento de Vai e Vem" e "Movimento Vibratório") descritos para outras espécies de Teleósteos (GREEN (24), 1968; PORTER (47), 1973; MURPHY e TILNEY (43), 1974) foram observados.

Estas reações dos melanóforos em presença dos íons

sódio e potássio, são caracteristicamente encontradas em outras espécies (SPAETH (57), 1913; SPAETH (58), 1916; MATTHEWS (40), 1931, IWATA, WATANABE e KURIHARA (32), 1959; IWATA, WATANABE e NAGAO (33), 1959; BIKLE, TILNEY e PORTER (7), 1966; FUJII (19), 1969; PORTER, BENNETT e JUNQUEIRA (48), 1970; JUNQUEIRA (34), 1972; HAWKES (26), 1974; JUNQUEIRA, RAKER e PORTER (35), 1974; MURPHY e TILNEY (43), 1974; CASTRUCCI (8), 1975).

Com base nestas observações, verificamos os efeitos de diferentes doses de radiação gama, sobre o processo migratório dos grânulos induzidos por íons sódio e potássio, "in vitro".

A análise da FIG. 13 mostrou que a radiação ionizante na dose de 10 000 rad, aparentemente não teve efeitos sobre a resposta citofisiológica dos melanóforos. As dispersões e as agregações dos grânulos sob a ação dos íons sódio e potássio, respectivamente, se processaram de forma sincrônica e regular, por período de tempo tão longo quanto em células normais. Com o aumento das doses, um retardamento gradativo nas migrações dos grânulos, principalmente na dispersão foi verificado, ocorrendo uma diminuição no período de resposta regular e sincrônica proporcional à dose. A dispersão dos grânulos em resposta aos íons sódio, foi totalmente inibida na dose de 150 000 rad.

Estes dados sugerem ser o processo dispersante mais sensível à radiação gama do que o agregante, o que concorda com as observações de ETOH (12) (1963) em melanóforos de Carassius carassius.

Por outro lado, os melanóforos submetidos à ação da radiação ionizante que deixaram de reagir aos íons potássio, agregaram os seus grânulos, em resposta à adrenalina.

Um fenômeno semelhante foi verificado em melanóforos de outras espécies (FUJII (18), 1959; IWATA, WATANABE e KURIHARA

(32) RA, 1959; IWATA, WATANABE e NAGAO (33), 1959; ETOH e EGA
(13) MI, 1963), nos quais uma ação direta da adrenalina é uma possível
ação do potássio sobre os melanóforos, através das terminações nervo-
sas, liberando mediadores químicos foram propostas. Com fundamento
nestas observações, pode-se sugerir que a radiosensibilidade dos mela-
nóforos é mais baixa do que a das terminações nervosas (ETOH (12),
1963; FUJII, NAKAZAWA e FUJII, (21) 1973).

As baixas temperaturas (0° - 4°C) mostraram um
efeito inibitório completo sobre as migrações centrífuga e centrípeta -
dos grânulos de melanina, quando os melanóforos foram estimulados res-
pectivamente com íons sódio e potássio "in vitro".

Ao nível ultra-estrutural, uma ausência dos microtú-
bulos tanto na região do corpo como nos processos melanofóricos foi
observada, enquanto que outras organelas permaneceram aparentemente
inalteradas.

Uma despolimerização dos microtúbulos por ação de
baixas temperaturas foi verificada por vários autores (INOUE e SATO
(31), (51) (60) (11), 1967; ROTH, 1967; TILNEY e PORTER, 1967; DUSTIN,
(55) (43) 1972; SCHREVEL e BUISSONNET, 1973; MURPHY e TILNEY,
1974). Com o desaparecimento dos microtúbulos, os microfilamentos a-
parentemente aumentaram em número, formando muitas vezes feixes den-
sos dispersos no citoplasma. Foi sugerido que muitos desses microfilamen-
tos sejam decorrentes de uma 2a. forma de polimerização das proteí-
nas microtubulares (WIKSWO e NOVALES (63), 1972).

Quando os melanóforos foram transferidos para a
temperatura ambiente, a movimentação dos grânulos reapareceu inicial-
mente próxima à região do corpo celular. Simultaneamente, uma análi-
se ultra-estrutural destes melanóforos, mostrou a presença dos micro

túbulos, nesta mesma região. Posteriormente, o fluxo de movimento dos grânulos seguiu em sentido centrífugo ao longo dos processos celulares, ocorrendo a dispersão e a agregação dos grânulos, em presença dos íons sódio e potássio, respectivamente. A ultra-estrutura destes melanóforos não se distingue da dos normais.

Resultados análogos foram obtidos por MURPHY e TILNEY (43) (1974) em melanóforos de Gymnocorymbus, onde uma possível repolimerização dos microtúbulos, a partir da região do centro celular às extremidades distais dos processos melanofóricos foi sugerida.

Estas observações, mostrando um paralelismo entre despolimerização dos microtúbulos e inibição simultânea na movimentação dos grânulos, coincidem com as de muitos autores, ao analisarem os efeitos de baixas temperaturas, colchicina e vinblastina, em melanóforos de outras espécies (WIKSWO e NOVALES (62), 1969; PORTER, BENNETT e JUNQUEIRA (48), 1970; WIKSWO e NOVALES (63), 1972; SCHLIWA e BEREITER-HAHN (54), 1973; JUNQUEIRA, RAKER e PORTER (35) (43) (9), 1974; MURPHY e TILNEY (43), 1974; CASTRUCCI (9), 1975). Com os resultados conseguidos, estes autores apoiaram a hipótese da possível participação dos microtúbulos na migração dos grânulos pigmentados, proposta por BIKLE, TILNEY e PORTER (7) (1966) e por GREEN (24) (1968), em melanóforos de Fundulus.

Embora o mecanismo básico da migração intracelular dos grânulos pigmentados ainda não esteja esclarecido (FUJII e NOVALES (22) (62), 1969; WIKSWO e NOVALES (62), 1969; TAYLOR e BAGNARA (59) (63) (20), 1972; WIKSWO e NOVALES (63), 1972; FUJII e MIYASHITA (20), 1974), os resultados obtidos sugerem haver uma relação entre microtúbulos e movimento dos grânulos, nestas células.

V. CONCLUSÕES.

Os resultados obtidos neste estudo permitem con
cluir que:

- 1) O Geophagus brasiliensis apresenta no tegumento os 4 tipos de cromatóforos: melanóforos, xantóforos, eritróforos e iridóforos.
- 2) A coloração geral, pardo-acinzentada, característica da espécie, se deve principalmente aos melanóforos.
- 3) Os melanóforos são de cor e morfologia características, semelhantes aos de outras espécies de Teleósteos.
- 4) Os melanóforos distribuem-se por todas as regiões do tegumento, decrescendo sua densidade em sentido dorso-ventral.
- 5) Os grânulos de melanina, quando na máxima dispersão, ocupam área cujo diâmetro é cerca de 6 vezes maior que o da área que ocupam quando se acham totalmente concentrados.
- 6) Considerando-se a superfície externa de cada escama, os grânulos de melanina distribuem-se numa área que é cerca de 6 vezes maior que a área que ocupam quando se acham concentrados.
- 7) "In vitro", a solução de NaCl 0,1M provoca dispersão, enquanto - que a solução de KCl 0,1M provoca concentração dos grânulos de melanina.
- 8) O aumento das doses de radiação gama reduz gradativa e proporcionalmente o período de resposta regular e sincrônica dos melanóforos.
- 9) "In vitro", baixas temperaturas (0° - 4°C) inibem a movimentação dos grânulos de melanina e despolimerizam os microtúbulos.

VI. RESUMO.

Escamas de Geophagus brasiliensis (QUOY & GAIMARD, 1824) foram coletadas de várias regiões do corpo de peixe. Os cromatóforos (melanóforos, xantóforos, eritróforos e iridóforos) de escamas isoladas foram analisados ao microscópio.

Demonstrou-se que "in vitro", o NaCl 0,1M provoca dispersão dos grânulos, e o KCl 0,1M induz uma concentração destes grânulos.

Experimentos sobre a radiação de escamas foram realizados, para verificar os efeitos de radiação gama sobre os melanóforos. O período de resposta dos melanóforos foi proporcional à dose de radiação.

Foi demonstrado que a superfície externa da escama, foi ocupada pelos grânulos de melanina numa extensão de 6 vezes maior que a área desta escama, quando os grânulos estavam concentrados.

"In vitro", foi também verificado que baixa temperatura (0° - 4°C), determina uma inibição dos movimentos de grânulos de melanina e despolimeriza os microtúbulos.

VII. SUMMARY.

Fish scales from Geophagus brasiliensis (QUOY & GAIMARD, 1824) have been collected from several regions of the fish body. The chromatophores (melanophores, xantophores, erythrophores and iridophores) of these isolated scales have been analysed under microscope.

It was demonstrated what "in vitro", NaCl 0,1 M provokes melanophore dispersion of the granules, and KCl 0,1M in duces a concentration of those granules.

Some experiments on the radiation of scales have been performed, in order to verify the effects of the gama radiation on the melanophores. The responsiveness period of the melanophores were proporcional to the radiation's dose.

It was demonstrated that the external surface of scale, was ocupied by the granules of melanin in one extension 6 ti mes the area of that scale when the granules of melanophores were concentrated.

"In vitro", it was also verified that low tempera ture (0° - 4° C) determine an inhibition of the movements of the granules of melanin and despolymerize the microtubules.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. ABBOTT, E.S. The effects of light and temperature on isolated melanophores in Fundulus heteroclitus L. Can. J. Zool., Ottawa, 47:203-7, 1969.
2. BAGNARA, J.T. Cytology and cytophysiology of non-melanophore pigment cells. Int. Rev. Cytol., New York, 20:173-205, 1966.
3. _____. Responses of pigment cells of amphibians to intermediate. In: CENTRE NATIONALE DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE, Paris. La spécificité zoologique des hormones hypophysaires et de leurs activités: annales des Colloques internationaux ..., Paris, 16-20 juillet, 1968. Paris, 1969. p.153-9.
4. _____.; HADLEY, M.E. & TAYLOR, J.D. Regulation of brightly-colored pigmentation of amphibians. Gen. comp. Endocr., New York, (suppl. 2):425-38, 1969.
5. _____.; TAYLOR, J.D. & HADLEY, M.E. The dermal chromatophore unit. J. Cell Biol., New York, 38:67-79, 1968.
6. BALLOWITZ, E. Ueber die Pigmentströmung in den Farbstoffzellen und die Kanälchenstruktur des Chromatophoren-Protoplasmas. Pflüg. Arch. ges. Physiol., 157:165-210, 1914 apud JUNQUEIRA, L.C.; RAKER, E. & PORTER, K.R. Studies on pigment migration in the melanophores of the teleost Fundulus heteroclitus (L). Archiv histol. jap., Okayama, 36(5):361, 1974.
7. BIKLE, D.; TILNEY, L.G. & PORTER, K.R. Microtubules and pigment migration in the melanophores of Fundulus heteroclitus L. Protoplasma, Leipzig, 61:322-45, 1966.
8. CASTRUCCI, A.M.L. Chromatophores of the teleost Tilapia melanopleura. 1. Ultrastructure and effect of sodium and potassium on pigment migration. Comp. Biochem. Physiol., London, 50A:453-6, 1975.
9. _____. _____. 2. The effects of chemical mediators microtubule-disrupting drugs and ouabain. Comp. Biochem. Physiol., London, 50A:457-62, 1975.
10. COIRO, J.R.R.; WEIGL, D.R.; KISIELIUS, J.; MENEZES, H. & BILLOTTA, J.A.T. A new embedding medium (Polylite 8001) for biological material. Ciênc. Cult., S. Paulo, 24(7):660-2, 1972.

(*) De acordo com o PNB-66, rev. 1969, da A.B.N.T. (Associação Brasileira de Normas Técnicas).
As abreviaturas dos títulos de periódicos foram feitas de acordo com o "World List of Scientific Periodicals", 1963.

11. DUSTIN, JR., P. Microtubules et microfilaments: leur role dans la dynamique cellulaire. Arch. Biol., Liège, 83:419-80, 1972.
12. ETOH, H. The effect of γ -irradiation on the physiological responses of the nerve-melanophore system in Carassius carassius. Zool. Mag., Tokyo, 72:277-82, 1963.
13. _____ & EGAMI, N. Responses to Na^+ , K^+ , atropine and adrenaline of melanophores induced by X-irradiation in the fin of the goldfish Carassius auratus. Annotnes zool. jap., Tokyo, 36(3):133-9, 1963.
14. FALK, S. & RHODIN, J. Mechanism of pigment migration within teleost melanophores. In: ELECTRON microscopy: proceedings of the Stockholm conference, 1956. New York, Academic Press, 1957. p.213-5.
15. FARIAS, E. C.; BILOTTA, J. A. T.; OKAZAKI, K. & JUNQUEIRA, L. C. Ultrastructure of the erythrophores of the teleost Geophagus brasiliensis. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA, 2º, Ribeirão Preto, 1974. Resumos...Ribeirão Preto, Soc. Lat. Americano de Microscopia Eletrônica, 1974. p.40-1.
16. FINGERMAN, M. The physiology of chromatophores. Int. Rev. Cytol., New York, 8:175-210, 1959.
17. _____. Comparative physiology: chromatophores. A. Rev. Physiol., Palo Alto, Calif., 32:345-72, 1970.
18. FUJII, R. Mechanism of ionic action in the melanophore system of fish. 1. Melanophore-concentrating action of potassium and some other ions. Annotnes zool. jap., Tokyo, 32:47-58, 1959 apud FUJII, R. Chromatophores and pigments. In: HOAR, W. S. & RANDALL, D. J. Fish physiology. New York, Academic Press, 1969. v. 3, p. 318 e 332.
19. _____. Chromatophores and pigments. In: HOAR, W. S. & RANDALL, D. J. Fish physiology. New York, Academic Press, 1969. v. 3, p. 307-53.
20. _____ & MIYASHITA, Y. Chromatophores: their motile mechanisms and regulatory systems. Cell, Tokyo, 6(5):130-9, 1974.
21. _____; NAKAZAWA, T. & FUJII, Y. Effects of ultraviolet radiation on melanophore system of fish. Pigment Cell, Basel, 1:195-205, 1973.
22. _____ & NOVALES, R. R. Cellular aspects of the control of physiological color changes in fishes. Am. Zoologist, Thousand Oaks, Calif., 9:453-63, 1969.
23. GOLDSTEIN, A. Biostatistics: an introductory text. 2.ed. New York, Macmillan, 1965.

- ~~24.~~ GREEN, L. Mechanism of movements of granules in melanocytes of Fundulus heteroclitus. Proc. natl Acad. Sci. U.S.A., Washington, D.C., 59:1179-86, 1968.
- ~~25.~~ HADLEY, M. E. Functional significance of vertebrate integumental pigmentation. Am. Zoologist, Thousand Oaks, Calif., 12: 63-76, 1972.
- ~~26.~~ HAWKES, J. W. The structure of fish. 2. The chromatophore unit. Cell Tiss. Res., Berlin, 149:159-72, 1974.
- ~~27.~~ HILL, A. V.; PARKINSON, J. L. & SOLANDT, D. Y. Photoelectric records of the colour change in Fundulus heteroclitus. J. exp. Biol., Cambridge, 12:397-99, 1935.
- ~~28.~~ HOGBEN, L. & SLOME, D. The pigmentary effector system. 6. The dual character of endocrine coordination in amphibian colour change. Proc. R. Soc., London, B108:10-53, 1931.
- ~~29.~~ HOLMES, K. V. & CHOPPIN, P. W. On the role of microtubules in movement and alignment of nuclei in virus-induced syncytia. J. Cell Biol., New York, 39:526-43, 1968.
- ~~30.~~ HOOKER, D. Amoeboid movement in the corial melanophores of Rana. Am. J. Anat., Baltimore, 16:237-50, 1914 apud JUNQUEIRA, L. C.; RAKER, E. & PORTER, K. R. Studies on pigment migration in the melanophores of the teleost Fundulus heteroclitus (L). Archvm histol. jap., Okayama, 36(5):361,
- ~~31.~~ INOUÉ, S. & SATO, H. Cell motility by labile association of molecules: the nature mitotic spindle fibers and their role in chromosome movement. J. gen. Physiol., Baltimore, 50 (6, suppl.):259-92, 1967.
- ~~32.~~ IWATA, K. S.; WATANABE, M. & KURIHARA, T. Changes in state and response of the fish scale melanophore during continuous immersion in Ringer's solution. Biol. J. Okayama Univ., 5: 185-94, 1959.
- ~~33.~~ _____; _____ & NAGAO, K. The mode of action of pigment concentrating agents on the melanophores in an isolated fish scale. Biol. J. Okayama Univ., 5:195-206, 1959.
- ~~34.~~ JUNQUEIRA, L. C. U. Effect of vinblastine, colchicine, sodium, potassium and adrenaline on pigment migration of melanophores in ten species of teleosts. Anais Acad. bras. Ciênc., Rio de Janeiro, 44(1):167-9, 1972.
- ~~35.~~ _____; RAKER, E. & PORTER, K. R. Studies on pigment migration in the melanophores of the teleost Fundulus heteroclitus (L). Archvm histol., jap., Okayama, 36(5):339-66, 1974.

36. KINOSITA, H. Electrophoretic theory of pigment migration within fish melanophore. Ann. N. Y. Acad. Sci., 100:992-1004, 1963.
37. MALAWISTA, S.E. The melanocyte model. Colchicine-like effects of other antimitotic agents. J. Cell Biol., New York, 49:848-55, 1971.
38. _____. Cytochalasin B reversibly inhibits melanin granule movement in melanocytes. Nature, Lond., 234(5328):354-5, 1971.
39. MARSLAND, D.A. Mechanism of pigment displacement in unicellular chromatophores. Biol. Bull, Woods Hole, Mass., 87:252-61, 1944.
40. MATTHEWS, S.A. Observations on pigment migration within the fish melanophore. J. exp. Zool., Philadelphia, 58:471-86, 1931.
41. MISCALENCU, D. & IONESCU, M.D. Fine structure of dermal chromatophores in the Natrix natrix (L.) snake. Anat. Anz., Jena, 131:470-5, 1972.
42. _____ & IONESCU, M.D. The fine structure of the epidermis and dermal chromatophores in Vipera ammodytes (L.). Acta anat., Basel, 86:111-22, 1973.
43. MURPHY, D.B. & TILNEY, L.G. The role of microtubules in the movement of pigment granules in teleost melanophores. J. Cell Biol., New York, 61:757-79, 1974.
44. ODIORNE, J.M. Color changes. In: BROWN, M.E. Physiology of fishes. New York, Academic Press., 1957. v.2, p.387-401.
45. PARKER, G.H. Chromatophores. Biol. Rev., Cambridge, 5:59-90, 1930.
46. _____. Animal color changes and their neurohumours. London, Cambridge Univ. Press, 1948.
47. PORTER, K.R. Microtubules in intracellular locomotion. Ciba Fdn Symp., London, 14:149-69, 1973.
48. _____; BENNETT, G.S. & JUNQUEIRA, L.C. Microtubules in intracellular pigment migration. In: ANNALES du septième congrès international de microscopie électronique, Grenoble, 1970. s.n.t. p.945-6.
49. PROSSER, C.L. & BROWN JR., F.A. Fisiologia comparada. 2.ed. Philadelphia, Saunders, 1961.
50. REYNOLDS, E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. J. Cell Biol., New York, 17:208-12, 1963.

51. ROTH, L.E. Electron microscopy of mitosis in ameba. 3. Cold and urea treatments: a basis for tests of direct effects of mitotic inhibitors of microtubules formation. J. Cell Biol., New York, 34:47-59, 1967.
52. SAWAYA, P. Sobre a mudança de cor nos crustáceos. Bolm, Fac. Filos. Ciênc. Univ. S. Paulo (13), Zool. (3), 1939.
53. SCHLIWA, M. & BEREITER-HAHN, J. Pigment movements in fish melanophores: morphological and physiological studies. 2. Cell shape and microtubules. Z. Zellforsch. mikrosk. Anat., Berlin, 147:107-25, 1973.
54. _____ & BEREITER-HAHN, J. 3. The effects of colchicine and vinblastine. Z. Zellforsch. mikrosk. Anat., Berlin, 147:127-48, 1973.
55. SCHRÉVEL, J. & BUISSONNET, S. Dépolymérisation réversible des microtubules sous-pelliculaires: conséquences sur la motilité cellulaire. J. Microscopie, Paris, 17:94a, 1973.
56. SMITH, D.C. A method for recording chromatophore pulsations in isolated fish scales by means of a photoelectric cell. J. cell. comp. Physiol., Philadelphia, 8:83-7, 1936.
57. SPAETH, R.A. The physiology of the chromatophores of fishes. J. exp. Zool., Philadelphia, 15(4):527-85, 1913.
58. _____. Evidence proving the melanophore to be a disguised type of smooth muscle cell. J. exp. Zool., Philadelphia, 20:193-215, 1916.
59. TAYLOR, J.D. & BAGNARA, J.T. Dermal chromatophores. Am. Zoologist, Thousand Oaks, Calif., 12:43-62, 1972.
60. TILNEY, L.G. & PORTER, K.R. Studies on the microtubules in heliozoa. 2. The effect of low temperature on these structures in the formation and maintenance of the axopodia. J. Cell Biol., New York, 34:327-43, 1967.
61. WARING, H. Color change mechanisms of cold-blooded vertebrates. New York, Academic Press, 1963.
62. WIKSWO, M.A. & NOVALES, R.R. The effect of colchicine on migration of pigment granules in the melanophores of Fundulus heteroclitus. Biol. Bull., Woods Hole, Mass., 137:228-37, 1969.
63. _____ & NOVALES, R.R. Effect colchicine on microtubules in the melanophores of Fundulus heteroclitus. J. Ultrastruct. Res., New York, 41:189-201, 1972.
64. YOUNG, J.Z. The preparation of isotonic solutions for use in experiments with fish. Pubbl. Staz. zool. Napoli, 12:425-31, 1933.