

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ REITORIA DE PESQUISA E PÓS- GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

ESTUDO ESTEREOLÓGICO EM FÍGADO DE TAMBAQUI (*Colossoma
macropomum*): EFEITO TÓXICO DO NITRITO

BOLSISTA: Lucas Castanhola Dias, FAPEAM

Manaus

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ REITORIA DE PESQUISA E PÓS- GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO PARCIAL - PIB-B/0046/2011

ESTUDO ESTEREOLÓGICO EM FÍGADO DE TAMBAQUI (*Colossoma
macropomum*): EFEITO TÓXICO DO NITRITO

Bolsista: Lucas Castanhola Dias, FAPEAM

Orientador: Prof. Dr. Oscar Tadeu Ferreira da Costa

MANAUS

2012

Sumário

1. INTRODUÇÃO	6
2. JUSTIFICATIVA	8
3. OBJETIVOS	9
3.1 GERAL	9
3.2 ESPECÍFICO	9
4. MATERIAL E MÉTODOS	10
4.1 MÉTODO	10
4.1.1 LOCAL	10
4.1.2 EXPERIMENTAÇÃO	10
4.1.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL	10
4.1.4 COLETA DOS TECIDOS.	12
4.1.5 ESTEREOLOGIA	13
5. ESTATÍSTICA	15
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
6.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DA ÁGUA	16
6.2 MORFO-FISIOLOGIA HEPÁTICA	17
6.3 ESTEREOLOGIA	17

6.3.1 VOLUME	17
6.3.2 DENSIDADE DOS COMPONENTES HEPÁTICOS	18
7. REFERÊNCIAS	20
8. CRONOGRAMA	23

RESUMO

A piscicultura no Estado do Amazonas tem apresentado um crescimento significativo nos últimos anos. Isto tem despertado interesse dos governos estadual e federal, além do setor produtivo. Apesar do crescente interesse, há alguns fatores que podem afetar negativamente a produção: um sistema deficiente de recirculação de água e remoção de excretas nitrogenadas, baixa oxigenação, alta densidade de estocagem, dentre outros. Duas importantes desordens advêm da intoxicação pelo composto nitrogenado denominado nitrito (NO_2^-) nos peixes. A primeira e exaustivamente estudada se refere ação direta do NO_2^- sobre a molécula da hemoglobina (Hb) transformando-a em metahemoglobina (MetHb) incapaz de ligar e liberar O_2 aos tecidos. Os experimentos foram desenvolvidos na Universidade Federal do Amazonas – UFAM, no Laboratório de Aquicultura (FCA) e processados no Laboratório de Biologia Celular (ICB). O volume total foi adquirido pelo método clássico da estereologia descrito por Cavalieri, que basicamente consiste em usar o material inteiro e de forma sistemática e aleatória foi retirada dez seções e em seguida no microscópio fora sobreposto um grid. A densidade volumétrica dos diferentes elementos dentro do fígado foi determinado segundo (Freere & Weibel, 1967). Os dados estereológicos obtidos através da microscopia de luz foram avaliados para cada animal e o estimador da variância será determinado usando o coeficiente de erro (C.E.) para cada parâmetro. A precisão da estimativa do volume de referência segundo Cavalieri fora determinada de acordo com Cruz-Orive (1993) e Howard & Reed (1998): Vale ressaltar que o peixe já passa por um grande estresse fisiológico devido as baixas concentrações de oxigênio dissolvido na água já causando a vasodilatação. Estudos realizados por COSTA (2004) com animais de aproximadamente 100g corroboram com os efeitos farmacológicos do Nitrito mostrando de forma qualitativa que o nitrito causa aumento em vacúolos nos hepatócitos e também fora observado um aumento vascularização, até porque o nitrito é um vaso dilatador.

Todavia no presente estudo com animais entre 20 e 30g fora quantificado uma diminuição no volume de vasos. Estudos realizados por Aida Geumei (1969, 2012) mostram que o efeito do Nitrito de Sódio faz com que aconteça uma insuficiência cardíaca, promovendo uma baixa pressão sanguínea ocasionando a vasoconstrição.

1. INTRODUÇÃO

A piscicultura no Estado do Amazonas tem apresentado um crescimento significativo nos últimos anos. Isto tem despertado interesse dos governos estadual e federal, além do setor produtivo. Apesar do crescente interesse, há alguns fatores que podem afetar negativamente a produção: um sistema deficiente de recirculação de água e remoção de excretas nitrogenadas, baixa oxigenação, alta densidade de estocagem, dentre outros. Duas importantes desordens advêm da intoxicação pelo composto nitrogenado denominado nitrito (NO_2^-) nos peixes. A primeira e exaustivamente estudada se refere ação direta do NO_2^- sobre a molécula da hemoglobina (Hb) transformando-a em metahemoglobina (MetHb) incapaz de ligar e liberar O_2 aos tecidos. Em conseqüência, vários órgãos enfrentam períodos de severa hipóxia após exposição ao NO_2^- (Margiocco et al., 1983). A segunda desordem se refere ação direta do NO_2^- sobre o funcionamento de órgãos vitais para a homeostase dos animais. Dentre esses, destaca-se o fígado por sua grande importância em vários processos metabólicos e também por que esse órgão recebe drenagem que já possui baixa oxigenação naturalmente. Qualquer situação q diminua o O_2 (ex. NO^2) só vem a piorar o estado hipóxico hepático.

O fígado pode ser um órgão altamente vulnerável a intoxicação pelo NO_2^- por dois motivos. Primeiro, esse órgão desempenha importante papel na detoxificação de substâncias nocivas. Segundo, devido à dupla irrigação sangüínea (o sangue venoso desoxigenado representa grande porcentagem do suprimento neste órgão), qualquer fator que agrave esta "condição hipóxica fisiológica" pode resultar em sérias conseqüências sobre a morfologia hepática (Arillo et al., 1984).

Condições estressantes são facilmente observadas em condições de cultivo intensivo e não há informações sobre os efeitos tóxicos do NO_2^- sobre a organização hepática em tambaqui, embora esta espécie seja amplamente utilizada em programas de aquicultura.

O tambaqui, *Colossoma macropomum*, é uma espécie pertencente à família Serrasalmidae (Serrasalminae). Nativo das bacias dos rios Solimões, Amazonas e Orinoco é amplamente distribuído na zona tropical da América do Sul e na Amazônia Central. Sua carne é importante fonte de proteína animal (Araújo-Lima & Goulding, 1998). Sua criação em cativeiro se torna praticável em grande parte por sua rusticidade, rápida adaptação a alimentação por ração e elevada capacidade de digerir proteína animal e vegetal. Sua criação

está disseminada pelas regiões de clima quente do Brasil e é a primeira espécie sobre a qual se conhece o suficiente para promover sua criação em cativeiro (Nunes et al., 2006).

Portanto, o presente projeto se propõe a executar uma análise morfométrica através da estereologia do fígado de tabaqui. A estereologia segundo Rocha (2012) é uma potente ferramenta matemática e estatística na qual se quantifica estruturas como, hepatócitos, vasos, hepatopâncreas que estão presente no fígado do tabaqui e assim conseguimos produzir com precisão informações tridimensionais (volume, densidade) a partir de dados bidimensionais (Lâminas histológicas). Para tal, as ferramentas mais atuais propostas pela ISS (International Society for Stereology) serão empregadas na órgão já citada em um ambiente controlado com indução direta de nitrito.

2. JUSTIFICATIVA

O estresse aos animais oriundo das práticas de cultivo intensivo de peixes pode resultar em elevada mortalidade por alterarem a morfologia hepática a ponto de interferirem no metabolismo normal dos peixes. É de conhecimento que tais alterações pesam negativamente sobre o ganho de massa dos animais levando a baixa na produtividade, tendo em vista a grande importância da espécie para a aquicultura na região. Conhecer a morfologia hepática e determinar valores morfométricos para os componentes tissulares é fundamental para um melhor entendimento da prevenção de doenças nos animais.

O presente projeto tem a finalidade de executar uma análise morfométrica do fígado de exemplares de tambaqui submetidos à exposição por NO_2^- durante o cultivo intensivo. Vale ressaltar que são escassas as informações sobre a histologia quantitativa nesta espécie.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Realizar um estudo estereológico no fígado de tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) após exposição ao nitrito dissolvido na água

3.2. Objetivos específicos

- i) Aplicar técnicas estereológicas para a determinação do volume total fígado, volume do parênquima e estroma hepático, bem como ductos biliares, veias, artérias;

- ii) Comparar os resultados obtidos entre controle (isento de NO_2^-) pelo agente estressor aplicado (NO_2^-)

- iii) Correlacionar os dados obtidos á biologia da espécie.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MÉTODO:

4.1.1. Local

Os experimentos foram desenvolvidos na Universidade Federal do Amazonas – UFAM, no Laboratório de Aquicultura (FCA) e processados no Laboratório de Biologia Celular (ICB).

4.1.2. EXPERIMENTAÇÃO

Exemplares juvenis de tambaqui, oriundos da Estação de Piscicultura de Balbina (Presidente Figueiredo – AM) vinculada a Secretaria de Produção Rural (SEPRO) foram utilizados neste estudo (massa aprox. 30 a 60 g). Após a coleta, os peixes foram mantidos por 6 semanas em caçapas de 80L supridas com contínuo fluxo de água fresca e aerada (tensão de oxigênio, $pO_2 > 130$ mmHg). A composição físico-química da água foi determinada durante este período. Os peixes eram alimentados diariamente com ração comercial, porém, a mesma fora suspensa 3 dias antes do início dos experimentos. Verificações diárias no estado de saúde dos animais foram realizadas (condição das nadadeiras, brânquias e pele quanto a presença de erosões, parasitas e sintomas de infestação por bactérias) e somente os animais aparentemente saudáveis foram utilizados nos experimentos.

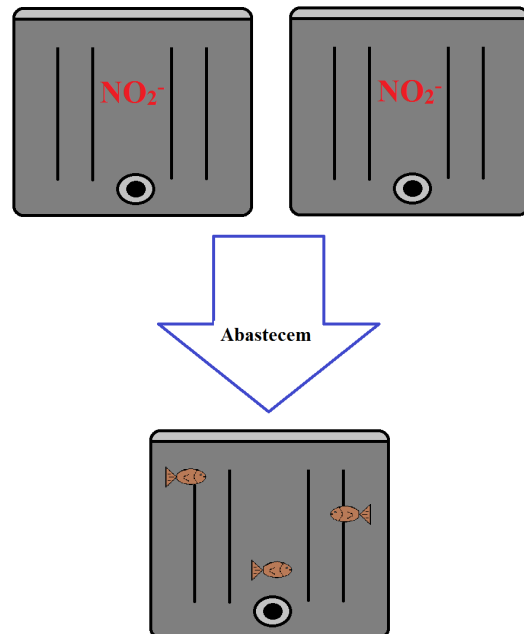
4.1.3. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Os experimentos foram conduzidos em caçapas de 80 Litros com fluxo contínuo de água aerada e com a mesma composição química utilizada na aclimação. O seguinte protocolo experimental foi adotado:

1. Tratamento 1: grupo controle (N=6), água isenta de NO_2^- .
2. Tratamento 2: grupo controle (N=6), água isenta de NO_2^- - Replica do tratamento 1
3. Tratamento 3: grupo exposto ao NO_2^- (N=6), adição de nitrito de sódio (NaNO_2 ; Merck) até a concentração de 0,04 mM NO_2^- . Essa concentração representa 31% da LC50 96 h NO_2^- estimada para o tambaqui (0,13 mM) no estudo de Costa et al., (2000). A concentração de NO_2^- será ajustada segundo o método colorimétrico da sulfanilamida-naftalenodiamino (Strickland & Parsons, 1972). E a água contaminada com nitrito ficou em duas caçapas alimentando as caçapas em que estavam os animais como mostra a figura 1.
4. Tratamento 4: grupo exposto ao NO_2^- (N=6) – Replica do tratamento 3

Em cada tratamento as condições serão mantidas por 96 horas com monitoramento constante das condições físico-químicas.

Figura 1: Mostra como fora montado o experimento para os peixes que iriam ser expostos ao nitrito, duas caçapas contendo o sal nitrito de sódio abasteciam a caçapa contendo o tratamento.



4.1.4. COLETA DOS TECIDOS

Após o período de exposição, os peixes foram anestesiados (MS-222 tamponado) e imediatamente sacrificados através de contusão na região cefálica. Após esta etapa, todos os animais serão pesados e medidos (comprimento total) antes da coleta dos tecidos. Será posto uma cânula na artéria hepática fazendo com que o órgão se irrigado pela solução de glutaraldeído 2,5% + solução tampão de fosfato de Na⁺ (pH 7,8; osmolaridade, aproximadamente 300mOsmol).



Figura 2: momento da coleta de tecido, na qual fora feita a necropsia para retirada do órgão na qual foi o nosso objeto de estudo.

4.1.5. ESTEREOLOGIA

O volume total foi adquirido pelo método classico da estereologia descrito por Cavalieri, que basicamente consiste em usar o material inteiro e de forma sistemática e aleatória foi retirada dez secções e em seguida no microscopio fora sobreposto um grid figura 3.2 e 3.3. O volume referencial será dado inicialmente pelo método descrito por Scherle (1970). Que consiste na imersão do órgão no fluido na qual fora fixado em uma balança analítica. A diferença do peso sem o órgão e o peso com o órgão, o valor apresentado foi transformado para cm^3 como mostra a figura 3.1.

Figura 3.1: mostra o método de Scherle onde W_1 é o valor do líquido sem o órgão e W_2 é o valor com o fígado completamente imerso e sem tocar na parede do recipiente. O resultado da diferença de $W_2 - W_1$ foi considerado o volume

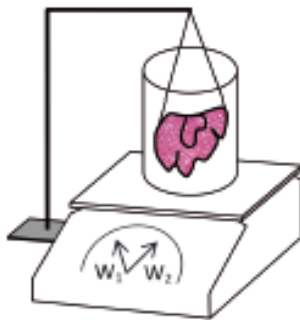


Figura 3.2: método descrito por Cavalieri que definiu a obtenção do volume pelo fracionamento do material e retirando secções de forma sistemática e ao acaso, em seguida feita uma contagem de pontos feita por um grid que foi sobreposto no material histológico

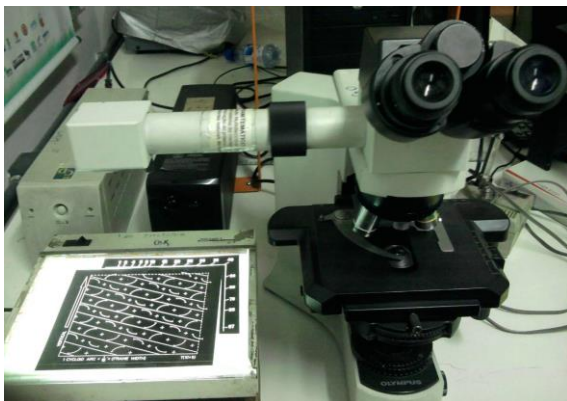
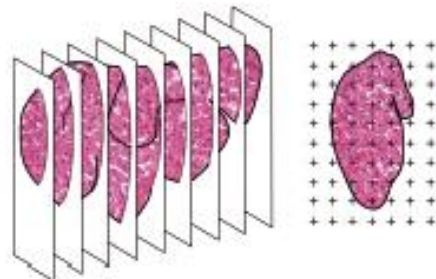


Figura 3.3. Microscópio usado para realizar uma das etapas do método de Cavallieri, que seria a sobreposição do grid que esta na camara clara, então a imagem virtual dos pontos se “funde” com campo de visão no microscopio.

A densidade volumétrica dos diferentes elementos dentro do fígado foi determinado segundo (Freere & Weibel, 1967). O material foi fracionado e serão escolhidos aleatoriamente cinco fragmentos do material, duas seções por fragmento, e 6 campos de visão aleatorios e sisteméticos por seção, usando uma técnica clássica estereológica baseado em contagem de pontos. Os volumes absolutos foram obtidos através de relação direta entre os volumes relativos e o volume total do fígado.

O parênquima e estroma hepáticos serão analisados. O estroma será subdividido operacionalmente em ductos biliares (lumens e paredes), vasos venosos e arteriais (lumens e paredes - excluindo sinusóides), tecido conjuntivo periadventicial dos ductos biliares e vasos sanguíneos e melanomacrófagos; outros componentes do fígado, conseqüentemente, foram considerados como parênquima, como anteriormente aplicado em estudos de teleósteos (Hampton et al, 1989;. Rocha et al, 1995.) e do fígado de mamíferos (Weibel, 1979). Para contagem de pontos, foi usado um microscópio Olympus BX-41 conectado com uma câmera fotográfica (Olympus U-DA) e em seguida fotografados 6 campos, as imagens obtidas foram usadas no programa Imod® que automaticamente põem um grid (figura 4) virtual sobre a imagem onde os sistemas teste de contagem nos serviram como parâmetros de determinação (Perry, 1978).

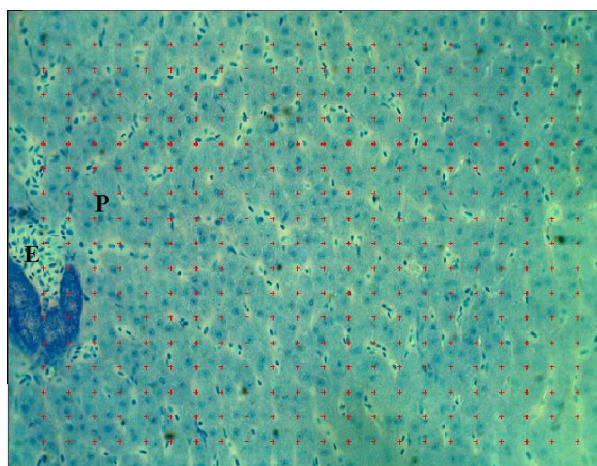


Figura 4: corte histológico do material com a sobreposição do grid usado para determinação de densidade e volume de parênquima, que é o conjunto de células funcionais do órgão (hepatócitos – P); e estroma que é tecido que da sustentação do órgão (vasos – E).

5. ESTATÍSTICA

Os dados estereológicos obtidos através da microscopia de luz foram avaliados para cada animal e o estimador da variância será determinado usando o coeficiente de erro (*C.E.*) para cada parâmetro. A precisão da estimativa do volume de referência segundo Cavalieri fora determinada de acordo com Cruz-Orive (1993) e Howard & Reed (1998):

$$CE(\sum P) = \frac{\sqrt{\text{var } P}}{\sum P}$$

A $\text{var}P$ depende do “*noise*” (acurácia do sistema teste) e a variância da soma das áreas ($\text{var}_{\Sigma\text{area}}$): $\text{var}P = \text{noise} + \text{var}_{\Sigma\text{area}}$ (Gundersen & Jensen, 1987; Howard & Reed 1998). O “*noise*” indica o quanto à estimativa poderia mudar se o sistema teste fosse disposto de modo diferente. A variância da área é uma função do número de seções e é calculada baseada na análise de covariograma dos dados sobre as áreas transversais (Howard & Reed, 1998).

Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média, E. P. M. Diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos foi detectada por meio de análise de variância one-way ANOVA seguida pelo t-teste de múltiplas comparações de Bonferroni. Diferença significativa foi considerada quando $P < 0,05$.

6. RESULTADO/DISCUSSÃO

6.1. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DA ÁGUA E BIOMETRIA

As condições físico-químicas da água foram monitoradas a cada 24 horas durante o tempo de exposição de 96 horas e estão apresentadas na Tabela 1. As condições se mantiveram nos padrões ideais para cultivo (Kubitza, 1997)

Tabela 1: Características físico-químicas da água durante o experimento com valores máximos e mínimos, e a média de variação.

PARÂMETROS	CONTROLE	NITRITO
pH	Min: 6,70	Min: 6,21
	Max: 7,46	Max: 7,26
Temperatura (°C)	Min: 25,80	Min: 26,0
	Max: 27,90	Max: 27,2
O₂ (ppm)	Min: 7,52	Min: 7,35
	Max: 8,90	Max: 8,24
Condutividade (Ω.cm)	Min: 17	Min: 2
	Max: 46	Max: 12

Tabela 2. Biometria dos animais da unidade experimental.

TRATAMENTO	PESO (g)	COMP TOTAL (cm ²)	COMP PADRÃO (cm ²)	Scherle – Volume do Fígado (mL)
#1	37,20	13,9	12,60	0,4186
#2	46,25	14,2	13,20	0,4577
#3	33,81	13,0	11,60	0,4018
#5	18,30	10,0	9,70	0,4788
#5	22,70	11,0	10,50	0,2541
#6	24,33	11,5	10,90	0,2493

Tabela 3. Biometria dos animais do grupo controle

TRATAMENTO	PESO (g)	COMP TOTAL (cm ²)	COMP PADRÃO (cm ²)	Scherle – Volume do Fígado (mL)
#1	44,55	15,0	1,2	0,4460
#2	30,08	12,0	11,0	0,3639
#3	3303	12,6	12,0	0,1908
#4	29,83	12,2	11,6	0,3096
#5	47,15	15,1	13,9	0,3900
#6	34,77	13,4	12,4	0,2076

6.2. MORFO-FISIOLOGIA HEPATICA

A unidade morfofuncional do fígado é o lóbulo hepático, que se agrupa formando lobos. Cada lóbulo hepático acha-se representando por um parênquima de células hepáticas (hepatócitos) e um estroma conjuntivo-vascular. Os hepatócitos estão dispostos em placas orientadas radialmente como um muro de tijolos e os mesmos estão separados por capilares sanguíneos denominados sinusóides, ricos em células fagocitárias que recebem o nome de células de Kupffer, pertencentes ao sistema macrofágico. O fígado desempenha numerosas funções metabólicas tais como síntese de lipídeos, proteínas e carboidratos. E no fígado do *C. macropomum* encontra-se mergulhado um hepato-pâncreas que tem por função a mesma de outros vertebrados (regulação endócrina e enzimas pancreáticas exócrinas).

6.3. ESTEREOLOGIA

6.3.1. VOLUME

Fora realizado com dois animais, sendo um controle e outro nitrito, com método de Cavalieri adquirindo volume total do órgão através do processamento histológico para que fosse comparado com o método de Scherle, também usando controle e nitrito. Podendo assim ilustrar a diferença e o poder de cada método para se aferir volume (Gráfico 1).

VOLUME DO FÍGADO DE TAMBAQUI: SCHERLE X CAVALIERI

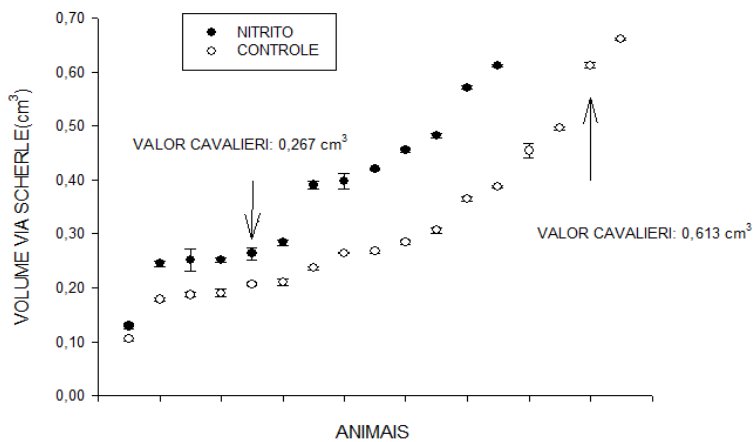


Gráfico 1: Mostra a comparação de dois modos de se aferir volume – Scherle X Cavalieri. Isso ilustra o grande poder de ambos, porém o Cavalieri se torna mais elegante pela sua riqueza de detalhes técnicas.

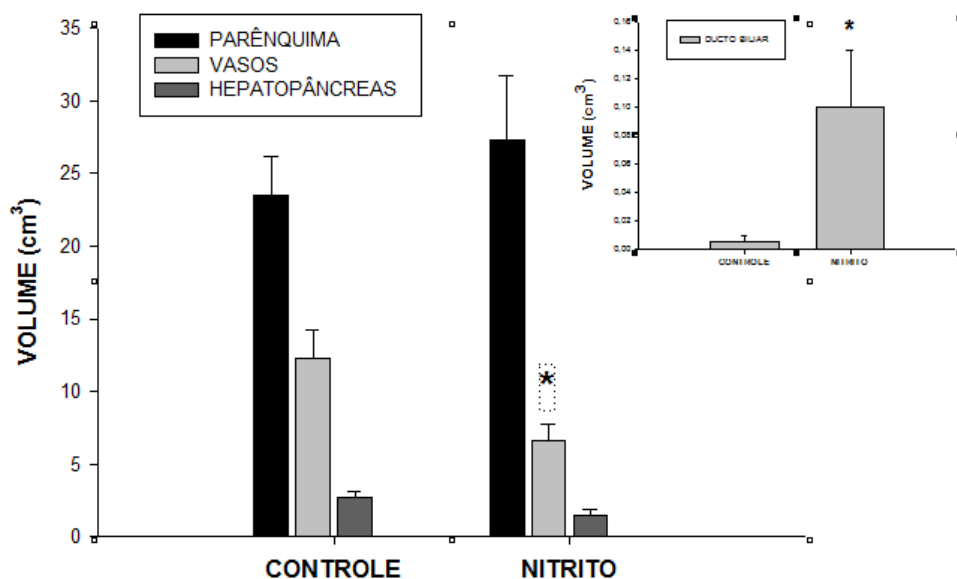
5.3.2 DENSIDADE DOS COMPONENTES HEPATICOS

Vale ressaltar que o peixe já passa por um grande estresse fisiológico devido as baixas concentrações de oxigênio dissolvido na água já causando a vasodilatação. Estudos realizados por COSTA (2004) com animais de aproximadamente 100g corroboram com os efeitos farmacológicos do Nitrito mostrando de forma qualitativa que o nitrito causa aumento em vacúolos nos hepatócitos e também fora observado um aumento vascularização, até porque o nitrito é um vaso dilatador.

Todavia no presente estudo com animais entre 20 e 30g fora quantificado uma diminuição no volume de vasos. Estudos realizados por Aida Geumei (1969, 2012) mostram que o efeito do Nitrito de Sódio faz com que aconteça uma insuficiência cardíaca, promovendo uma baixa pressão sanguínea ocasionando a vasoconstrição.

Gráfico 2: ilustra as diferenças em porcentagem do volume de componentes hepaticos

VOLUMES ABSOLUTOS DOS COMPONENTES HEPÁTICOS



Por tanto concluo que o nitrito afeta a função hepática por reduzir a porcentagem de vasos no parênquima, isso pode ser danoso ao animal por que este órgão, em condições normais, já experimenta uma condição hipoxica como característica de sua irrigação. O nitrito só vem a piorar tal condição e propiciar outras alterações como dano renal, cardíaco, etc que tem o potencial de conduzir a morte do animal.

REFERÊNCIAS

- AINDA GUEMEI, I. ISSA; MAHFOUZ M. Intra-hepatic vascular response to sodium nitrite. *Br J. Pharmac* (1969), 35, 456-459.
- ARAÚJO-LIMA, C.A.R.M.; GOULDING, M. Os frutos do tabaqui: ecologia, conservação e cultivo na Amazônia. Tefé: Sociedade Civil Mamirauá; Brasília: CNPq, 186p, 1998.
- ARILLO, E. GAINO, C. MARGIOCCO, P. MENSI AND G. SCHENONE. Biochemical and ultrastructural effects of nitrite in rainbow trout: Liver hypoxia as the root of the acute toxicity mechanism. *Environmental Research*, Volume 34, Issue 1, Pages 135-154, June 1984
- COSTA, O. T. F., FERREIRA, D. J. S., MENDONÇA, F. L. P., AND FERNANDES, M. N. Acute toxicity of nitrite to freshwater teleost tambaqui, *Colossoma macropomum* (Teleostei, Serrasalminidae). *Comp. Biochem. Physiol. Supplement* 126B, 26, 2000.
- CRUZ-ORIVE, L.M. Systematic sampling in stereology. *Bull. Intern. Statis. Inst., Proceedings 49th Session, Florence*. n. 52, v. 2, p. 451-468, 1993.
- FREERE, R.H., & E.R. Weibel.; Stereologic techniques in microscopy. *J. R. Microsc. Soc.*, 87:25-34, 1967
- GUNDERSEN, H.J.G. & JENSEN, E.B. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *Journal of Microscopy*. n. 147, p. 229-263, 1987.
- HAMPTON, J.A., Lantz & D.E. Hinton; Functional units in rainbow trout (*Salmo gairdneri*, *Richardson*) liver: III. Morphometric analysis of parenchyma, stroma, and component cell types. *Am. J. Anat. Rec.*, 221:619-634, 1989
- HOWARD, C.V. & REED, M.G. Unbiased stereology: three-dimensional measurements in microscopy. Berlin: Springer Verlag & Bios Scientific Publishers, 1998.

JENSEN F.B. Nitrite disrupts multiple physiological functions in aquatic animals. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 135, 9–24, 2003.

KROUPOVA, H., MACHOVA, J., SVOBODOVA, Z. Nitrite influence on fish: a review. *Vet. Med. – Czech*, 50, (11): 461–471 Review Article, 2005.

LEWIS, W. M. AND MORRIS, D. P. Toxicity of nitrite to fish: A review. *Trans. Am. Fish. Soc.* 115, 183-195, 1986.

MARGIOCCO, C., ARRILO, A., MENSI, P., AND SCHENONE, G. Nitrite bioaccumulation in *Salmo gairdneri* Rich. and hematological consequences. *Aquatic Toxicol.* 3, 261-270, 1983.

NUNES, E.S.S.; CAVERO, B.A.S.; PEREIRA-FILHO, M.; ROUBACH, R. Enzimas digestivas exógenas na alimentação do tabaqui. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.41, n.1, p.139-143, 2006.

PERRY, S.F. Quantitative anatomy of the lungs of the red-eared turtle, *Pseudemys scripta elegans*. *Respiration Physiology*. n. 35, p. 245-262, 1978.

ROCHA E., R.A.F. Monteiro, and C.A. Pereira; The liver of the brown trout, *Salmo trutta fario*: A light and electron microscope study. *J. Anat.*, 185:241-249, 1994.

ROCHA, E., R.A.F. Monteiro, and C.A. Pereira; Microanatomical organization of hepatic stroma of the Brown trout, *Salmo trutta fario* (Teleostei, Salmonidae). *Can. J. Zool.*, 72:1683-1687, 1995.

SCHERLE, W. A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology. *Mikroskopie*. 1970 Jun;26(1):57-60.

STRICKLAND, J. D. H. & PARSONS, T. R. A Practical Handbook of Seawater Analysis. Fish. Res. Bd. Canada Bulletin 167, 1972.

WEIBEL, E.R. Stereological Methods. Practical methods for biological morphometry, Vol. 1. London: Academic Press, 1979.

6. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

Nº	Descrição	Ago 2011	Set	Out	Nov	Dez	Jan 2012	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul
	Coleta			NR	NR		X	X					
	Experimentos			NR	NR	NR	X	X					
	Análise química da água			NR	NR		X	X					
	Processamento das amostras				NR	NR	X	X	X	X	X		
	Análise estereológica – volume					NR	X	X	X				
	Análise estereológica – densidade de volume					NR	X	X	X				
	Análise dos resultados					NR	X	X	X	X	X		
	Preparação apresentação oral												
	Revisão bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
	- Elaboração do Resumo e Relatório Final (atividade obrigatória)											X	X
	- Preparação da Apresentação Final para o Congresso (atividade obrigatória)											X	X