



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
LABORATÓRIO DE FECUNDAÇÃO *IN VITRO*

JULIANA BARRETO ALBUQUERQUE PINTO

**AVALIAÇÃO DA APOPTOSE NA FOLICULOGÊNESE DE FETOS BOVINOS E
BUBALINOS ATRAVÉS DA TÉCNICA DE TUNEL**

BELÉM – 2009

JULIANA BARRETO ALBUQUERQUE PINTO

**AVALIAÇÃO DA APOPTOSE NA FOLICULOGÊNESE DE FETOS BOVINOS E
BUBALINOS ATRAVÉS DA TÉCNICA DE TUNEL**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de
Biomedicina da Universidade Federal
do Pará, como requisito parcial para a
obtenção do grau de Bacharel em
Biomedicina.

Orientadora: Prof^a Dr^a Simone do Socorro Damasceno Santos

BELÉM

2009

JULIANA BARRETO ALBUQUERQUE PINTO

**AVALIAÇÃO DA APOPTOSE NA FOLICULOGÊNESE DE FETOS BOVINOS E
BUBALINOS ATRAVÉS DA TÉCNICA DE TUNEL**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de Biomedicina da
Universidade Federal do Pará, como
requisito parcial para a obtenção d grau de
Bacharel em Biomedicina.

Local e data da defesa: Belém (PA), 17 de dezembro de 2009

Banca Examinadora:

Prof^a Dr^a Simone do Socorro Damasceno dos Santos
(orientadora)

Prof^a Dr^a Maria Auxiliadora Pantoja Ferreira
(ICB – UFPA)

Profa. MSc. Marcela da Silva Cordeiro
(IFPA)

Moisés Miranda - Suplente
(UFPA)

Dedico este trabalho à Deus, que me deu todas as oportunidades na vida e força pra eu chegar onde cheguei, à minha mãe, que sempre esteve comigo em todos os momentos, meu pai, meus irmãos, Gustavo, família, meus amigos e aos integrantes do LabFIV-UFPA. Vocês todos contribuíram para a minha vitória. Obrigada!

AGRADECIMENTOS

Á Deus, à Universidade Federal do Pará (UFPA), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Pará (FAPESPA), Fundação de Amparo e Desenvolvimento da Pesquisa – FADESP, Laboratório de Fecundação *in vitro* da UFPA – LabFIV/UFPA, Meus Pais, irmãos, Gustavo, minha família e amigos.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	i
AGRADECIMENTOS.....	ii
SUMÁRIO.....	iii
LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	iv
RESUMO.....	v
1 – INTRODUÇÃO.....	1
2 – OBJETIVOS.....	7
3 – MATERIAL E MÉTODOS.....	8
4 – RESULTADOS.....	10
5 – DISCUSSÃO.....	14
6 – CONCLUSÃO.....	16
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	17

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 01 - Folículo Primordial Bupalino. Aumento de 400x	3
Figura 02 - Folículo Primário Bovino. Aumento de 400x	3
Figura 03 - Folículo Secundário Bovino. Aumento de 400x	3
Figura 04 - Folículo Terciário Bovino. Aumento de 100x.....	3
Figura 05 – Coloração pela Técnica de TUNEL.....	5
Tabela 01 - Padrão de apoptose em ovários de fetos bovinos e bubalinos de diferentes idades	11
Tabela 02– Média ($\pm$ DP) de células foliculares apoptóticas em folículos ovarianos de fetos bovinos e bubalinos.....	12
Tabela 03 – Média de células foliculares em apoptose marcadas pelo TUNEL em folículos primordiais, primários e secundários de fetos bovinos e bubalinos de diferentes idades.....	13

RESUMO

A apoptose é um programa altamente conservado e regulado que leva a célula a cometer suicídio sob uma variedade de controles internos e externos. A técnica de TUNEL (Terminal deoxynucleotidyltransferase mediated dUTP Nick End Labeling) é utilizada em muitos tipos celulares para detectar a apoptose pela marcação de DNA fragmentado. Durante o período mitótico o número de ovogônias em ovários bovinos chega a dois milhões por feto. Após este período a ovogônia entra em meiose até prófase I, contudo aproximadamente 90% destas são perdidas, e ao nascimento, a população folicular é de aproximadamente 200.000 (BECKERS et al., 1996). Ondas de degeneração foram observadas por BAKER (1963) em humanos, ERICKSON (1966) em bovinos e em bubalinos por EL-GHANNAM & EL-NAGGAR (1974). De acordo com REYNAUD & DRIANCOURT (2000), durante a ovogênese a média de células germinativas em camundongo, vaca e mulher é de $2,5 \times 10^5$, $2,1 \times 10^6$ e $6,8 \times 10^6$, respectivamente. A rápida proliferação das ovogônias está associada à perda das células germinativas e como consequência desta perda, o número de folículos primordiais ao nascimento é menor que 20% em humanos (BAKER, 1963) e 5% na vaca (ERICKSON, 1966) do seu número inicial. O objetivo deste trabalho foi avaliar a ocorrência de apoptose na ovogênese e foliculogênese de fetos bovinos e bubalinos. Foram coletados ovários de 11 fetos bovino com idade entre 4 e 9 meses e de 15 fetos bubalinos entre 3 e 8 meses de idade determinados segundo ABDEL-RAOUF & EL-NAGGAR, (1968). Os ovários foram fixados em solução de Formol 10% por 24h. Em seguida, foram processados histologicamente, incluídos em parafina e feitos cortes de 7µm de espessura. Após desparafinização foram marcados pela técnica de TUNEL. Em bovinos, observou-se apoptose moderada aos 4, 5 e 7 meses, sendo rara aos 8 e 9 meses. Em bubalinos ocorreu apoptose moderada aos 3, 4, 5 e 7 meses, sendo rara aos 6 meses e ausente aos 8 meses. No presente trabalho, o método do TUNEL foi eficaz para detecção de apoptose em folículos ovarianos de fetos bovinos e bubalinos, concluindo-se que a apoptose ocorre em fetos bovinos, em todas as idades entre 4 e 9 meses com menor incidência aos 8 meses e em bubalinos ocorre em todas as idades entre 3 e 7 com menor incidência aos 6 meses. Estes resultados estão de acordo com a literatura que cita ondas de degeneração folicular durante a vida intra-uterina tanto em bovinos quanto em bubalinos, entretanto são necessários maiores estudos e uma maior amostra para melhor caracterizar a apoptose na foliculogênese destas espécies.

.

1 INTRODUÇÃO

BUBALINOCULTURA X BIOTÉCNICAS

Dentre os avanços da biotecnologia na reprodução animal, tem sido observado que a micromanipulação de zigotos, através da fecundação *in vitro*, bem como da congelação dos mesmos, têm se traduzido como uma das principais técnicas que irão embasar a pecuária do futuro, uma vez que, através do uso adequado da mesma, será possível promover o melhoramento da produção e reprodução animal, a diminuição de custos, o melhoramento zootécnico do rebanho em curto espaço de tempo e a redução do intervalo de tempo entre as gerações (Madam et al, 2007).

As aplicações da produção *in vitro* de embriões (PIV) são inúmeras, e a habilidade de manipular gametas e embriões em diferentes estágios possibilita estudar o desenvolvimento embrionário e os genes envolvidos na sua regulação (Bloodin et al, 2002).

A Bubalinocultura é de grande importância econômica, porém as biotécnicas utilizadas na reprodução destes animais são, geralmente, baseadas em metodologias utilizadas em bovinos (Ohashi, 1997). Os bubalinos ocupam uma grande parte da produção no mercado como produtores de carne, leite e força de trabalho. Nos últimos anos a população mundial da espécie cresceu 53% enquanto que a de bovinos, no período correspondente, cresceu apenas 15% (FAO, 2006). A produção mundial de leite do rebanho aumentou cerca de 200% desde 1973 (Rocha Loures, 2001).

O rebanho bubalino possui capacidade reprodutiva inferior ao bovino por ter maturidade tardia (Madam & Prakash, 2007), poliestria estacional (Barusselli et al, 2007), gestação mais longa que a bovina (Madam, 1988), anestro pós-parto longo (El-Wishy, 2007), folículos ovarianos em menor quantidade e resposta insatisfatória à biotécnicas como a superovulação e ao “*ovum pick up*” (Manik et al, 2002).

Os ovários das búfalas apresentam uma população de folículos primordiais de aproximadamente 19.000 (Samadi e Nasser, 1979), quantidade essa dez vezes menor do que a população bovina (Erickson, 1966), este fator provavelmente seja a causa das fêmeas bubalinas apresentarem um número menor de folículos antrais (Manik et al, 2002; Danell, 1987). Ainda 82% dos folículos antrais apresentam aparência histológica atresica (Ocampo et al, 1994).

Esta espécie necessita de maiores estudos a fim de aumentar a produção de embriões, dar suporte às outras biotécnicas e desenvolver o potencial da transferência de embriões (TE) e da PIV em escala comercial (Gupta et al, 2001),

OVOGÊNESE X FOLICULOGÊNESE

A Ovogênese é o processo através do qual ocorre a formação dos ovócitos. O mesmo se inicia durante a vida fetal e termina no momento da fecundação. Durante ele ocorrem intensas transformações e proliferações celulares que irão resultar na formação da ovogônia. (Hafez, 1995).

O estudo da Foliculogênese também é de grande importância para a aprimoração das biotécnicas, haja vista que é através dela que ocorrem a formação, o crescimento e a maturação dos folículos ovarianos. Paralelas às transformações celulares e moleculares dos ovócitos ocorrem a proliferação e diferenciação das células da granulosa e da teca, processos esses que são influenciados por fatores intra-ovarianos, intra-foliculares e sinais hormonais da Ovogênese (Driancourt, 1991).

A classificação do folículo ovariano é feita de acordo com as camadas celulares que o envolvem, podendo o mesmo ser classificado como: Primordial (Figura 01), o qual é envolvido por apenas uma camada simples de células pavimentosas; Primário (Figura 02), envolvido por uma camada de células cuboidais; Secundário (Figura 03), envolvido por duas ou mais camadas de células cuboidais e Terciário (Figura 04), o qual é envolvido por várias camadas de células e já se pode observar a cavidade antral.

Segundo Sirad & Blondin (1996), ovócitos imaturos possuem graus de competência variados, adquiridos durante a foliculogênese, sendo que diversas condições foliculares promovem diferenças entre os ovócitos e seu potencial de desenvolvimento. As diferenças ovocitárias podem ser avaliadas segundo diferentes aspectos: morfologia do *cumulus oophorus*, tamanho folicular, estágio de desenvolvimento do folículo, estímulo ovariano e manipulação dos ovócitos antes da maturação *in vitro*.

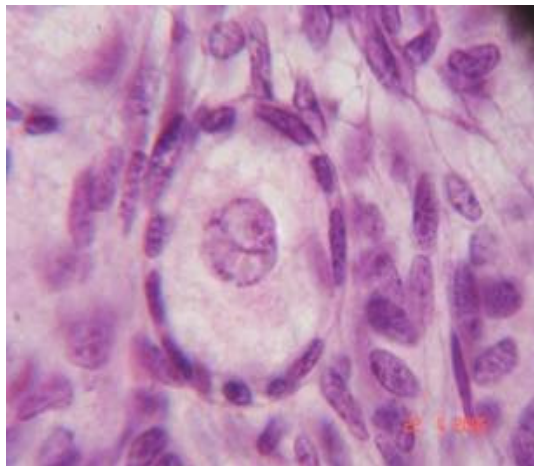


Figura 01 - Folículo Primordial Bupalino. Aumento de 400x

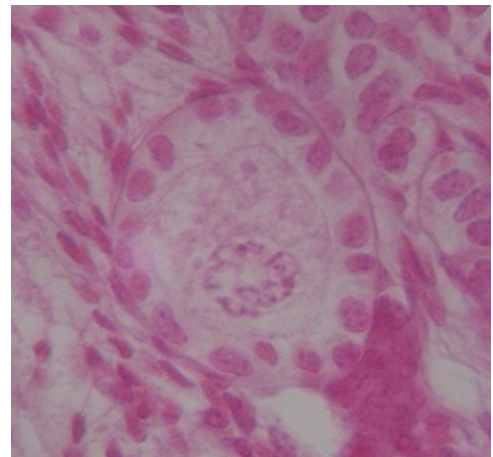


Figura 02 - Folículo Primário Bovino. Aumento de 400x

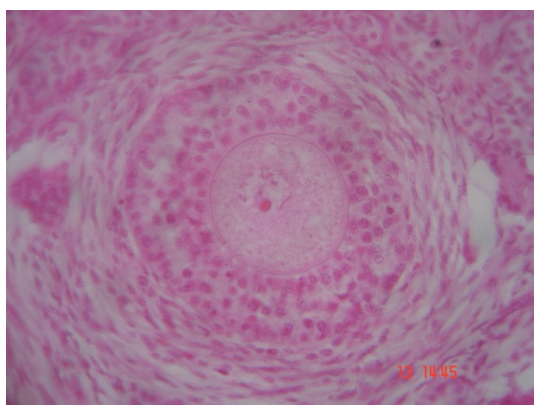


Figura 03 - Folículo Secundário Bovino. Aumento de 400x

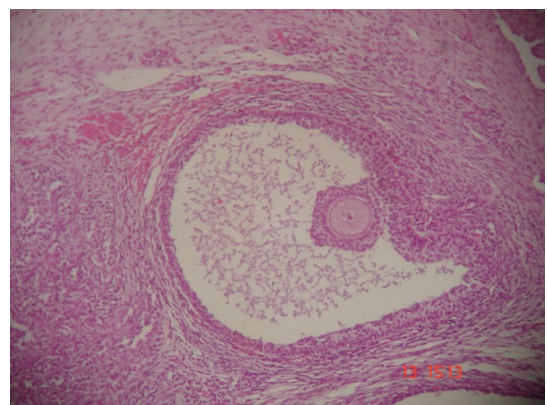


Figura 04 - Folículo Terciário Bovino. Aumento de 100x

As falhas na tentativa de fertilizar ovócitos maduros são geralmente atribuídas à maturação citoplasmática inadequada, apesar da maturação nuclear estar completa, pois muitos eventos podem não coincidir com a maturação nuclear. Ovócitos de pequenos folículos antrais são parcialmente competentes a terminar a maturação nuclear, emitir o primeiro corpúsculo polar e desenvolver até o estágio de blastocisto, diferente de ovócitos provenientes de grandes folículos antrais, cuja taxa de blastocisto é comparativamente mais alta (Eppig & O'Brien, 1996).

Estima-se que somente um em cada 1000 folículos ovarianos atinja a ovulação (Ireland, 1987), essa eliminação expressiva do número de folículos ovarianos ocorre por um processo fisiológico chamado Atresia (Saumande, 1981).

APOPTOSE

A apoptose é um programa altamente conservado e regulado que leva a célula a cometer suicídio sob uma variedade de controles internos e externos. As maiores características da apoptose são condensação nuclear e citoplasmática, aumento do volume do retículo endoplasmático e fragmentação do citoplasma, com digestão do DNA por nucleases endógenas (endonucleases) em fragmentos oligonucleossômicos (185 a 200 bp).

Embriões fragmentados exibem alterações morfológicas típicas de células mortas por apoptose (Yang & Rajahamendram, 2002), contudo, a ocorrência e a regulação da apoptose embrionária e sua relação com a competência de desenvolvimento e perdas embrionárias não estão bem esclarecidas.

Takase et al., (1995) e Matwee et al., (1999) indicaram que a apoptose está relacionada com os processos de degeneração em ovócitos imaturos de camundongos e bovinos, entretanto, não existem estudos em relação a incidência de apoptose em bubalinos.

TUNEL

A técnica de TUNEL (Terminal deoxynucleotidyltransferase mediated dUTP Nick End Labeling) cora fragmentos finais de DNA (3'-OH) em apoptose através da Deoxinucleotidil Terminal Transferase (Figura 5). Tal técnica é utilizada em muitos tipos celulares para detectar a apoptose em fases tardias, detectando tanto células apoptóticas quanto necróticas (fragmentação do DNA) e pode ser utilizada para analisar a fragmentação embrionária pela marcação de DNA fragmentado.

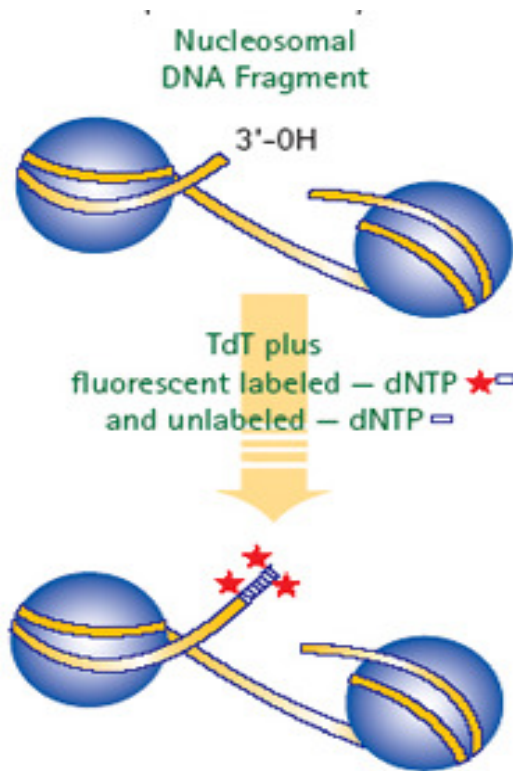


Figura 5 – Coloração pela Técnica de TUNEL.

Fonte: http://www.emdbiosciences.com/html/cbc/Apoptosis_Resource_changes_in_nucleus.htm

Em células normais, não apoptóticas, a fosfatidilserina (PS) é segregada para o lado interno da membrana. Os estágios iniciais da apoptose são caracterizados pelo distúrbio da função da membrana, isto é, por uma distribuição assimétrica dos fosfolipídios, ocorrendo antes da destruição da membrana, que colapsa sendo a PS exposta na superfície externa da membrana, e não pode ser avaliado pelo TUNEL.

Como citado, o processo de morte celular causa muitas perdas ovocitárias e embrionárias em muitas espécies, com alguns trabalhos já realizados em algumas espécies como camundongos e bovinos, contudo até o momento nenhum trabalho foi feito para detectar e estudar a apoptose em ovócitos bubalinos, o que vem a ser o objetivo deste projeto.

2 OBJETIVOS:

OBJETIVO GERAL:

- Avaliar a ocorrência de apoptose na ovogênese e foliculogênese de fetos bovinos e bubalinos pela técnica de TUNEL.

OBJETIVO ESPECÍFICO:

- Determinar a fase de maior ocorrência de apoptose na foliculogênese através da técnica de TUNEL.

3 MATERIAL E MÉTODOS:

3.1 COLETA DOS OVÁRIOS

Foram utilizados ovários de fetos bubalinos e bovinos, obtidos no matadouro Socipe-Tapanã (Belém-PA).

Foram coletados ovários de 11 fetos bovino com idade entre 4 e 9 meses e de 15 fetos bubalinos entre 3 e 8 meses de idade oriundos de animais adultos abatidos em matadouro.

Logo após o abate, em um intervalo de aproximadamente 20 a 30 minutos, os úteros de vacas adultas gestantes foram abertos para retirada do feto, que sendo fêmea foi medido para determinação da idade segundo o método de Abdel-Raouf & El-Naggar (1968), o qual consiste em medir a distância entre a base do crânio e a base da cauda do feto e relacionar esse comprimento à idade fetal.

Feito isto os ovários foram retirados e fixados em solução de Formol 10% e transportados até o Laboratório de Histologia Geral para processamento histológico.

3.2 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO E TUNEL

Após 24 horas de fixação os ovários foram processados para histologia clássica (desidratação em concentrações crescentes de álcool (70%, 80%, 90% e absoluto I, II e III); inclusão em parafina, confecção de cortes seriados de 7 µm de espessura. Após este procedimento os cortes foram desparafinizados em Xilol, submetidos a reação pelo TUNEL (TACS-XL – Basic – TA 100 , R&D Systems, Inc. USA) de acordo com as instruções do fabricante, corados com H.E e analisados em microscopia óptica de luz.

Foram analisados os aspectos gerais do estroma ovariano e folículos primordiais, primários e secundários onde se contou o número de células

foliculares marcadas positivamente pelo TUNEL em cada classe folicular e em cada idade fetal.

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados foi feita pelo método da análise de variância e teste T, pelo software BioEstat 5.0 (Ayres et al. 2007).

4 RESULTADOS

Em bovinos, observou-se apoptose moderada aos quatro, cinco e sete meses, sendo rara aos oito e nove meses. Em bubalinos ocorreu apoptose moderadamente aos três, quatro, cinco e sete meses, sendo rara aos seis meses e ausente aos oito meses (Tabela 01).

Quando comparados folículos primordiais, primários e secundários, a média geral de células apoptóticas, em bovino foi superior no folículo secundário porém em bubalinos não houve diferença entre eles. Observou-se ainda que o folículo secundário bovino apresentou maior número de células apoptóticas em relação ao folículo secundário bubalino (Tabela 02).

Em bovinos, observou-se que os folículos primordiais foram mais afetados aos oito meses, não havendo diferença entre os primários nas diferentes idades, entretanto nos folículos secundários houve menor incidência de apoptose aos quatro e maior aos oito meses.

Quando analisados os folículos bubalinos observou-se uma maior incidência de apoptose aos três meses em folículos primordiais, em folículos primários aos cinco e sete meses e em folículos secundários não se observou diferença estatisticamente significativa, sendo que no geral, não foi observada apoptose nos ovários de fetos de oito meses de idade (Tabela 03).

Tabela 01 - Padrão de apoptose em ovários de fetos bovinos e bubalinos de diferentes idades.

Idade Fetal (meses)	Bovino	Bubalino
3	Não avaliado	++ (n=3)
4	++ (n=2)	++ (n=3)
5	++ (n=3)	++ (n=2)
6	Não avaliado	+ (n=3)
7	++ (n=2)	++ (n=3)
8	+ (n=2)	- (n=1)
9	+ (n=2)	Não avaliado

n= número de fetos +++: densamente presente, ++: moderadamente presente, + raramente presente, - : ausente

Tabela 02– Média ($\pm$ DP) de células foliculares apoptóticas em folículos ovarianos de fetos bovinos e bubalinos.

	Folículo Primordial	Folículo Primário	Folículo Secundário
Bovino	0,5 ($\pm$ 1,0) ^a n= 182	0,5 ($\pm$ 0,8) ^a n=124	1,5 ($\pm$ 1,8) ^{bA} n=161
Bubalino	0,5 ($\pm$ 0,9) ^a n=198	0,4 ($\pm$ 0,7) ^a n=169	0,5 ($\pm$ 0,9) ^{aB} n=43

Diferentes sobrescritos minúsculos na mesma linha indicam diferença estatisticamente significativa ($P < 0,01$).

Diferentes sobrescritos maiúsculos na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativa ($P < 0,01$).

Tabela 03 – Média de células foliculares em apoptose marcadas pelo TUNEL em folículos primordiais, primários e secundários de fetos bovinos e bubalinos de diferentes idades.

		Idade Fetal (meses)							
			3	4	5	6	7	8	9
BOVINO	Classe Folicular								
	Primordial	Não avaliado	0,1 (±0,4) ^a (0-1) n=28	0,6 (±0,9) ^a (0-3) n=65	Não avaliado	0,2 (±0,6) ^{ab} (0-3) n= 63	1,8 (±1,2) ^c (0-4) n=26	Não avaliado	
	Primário	Não avaliado	0,3 (±0,5) ^a (0-1) n=10	0,7 (±0,9) ^a (0-3) n=45	Não avaliado	0,2 (±0,6) ^a (0-3) n=57	1,2 (±1,0) ^a (0-3) n=12	Não Avaliado	
	Secundário	Não avaliado	0,3 (±0,5) ^a (0-1) n=9	1,6 (±2,5) ^{ab} (0-10) n=118	Não avaliado	1,5 (±1,3) ^{ab} (0-6) n=26	2,9 (± 1,8) ^b (1-6) n=8	Não avaliado	
BUBALINO	Primordial	2,0 (±1,4) ^a (0-5) n=23	0,3 (±0,5) ^{bc} (0-2) n=47	0,5 (±0,8) ^b (0-3) n=52	0,3 (±0,6) ^{bc} (0-3) n=91	0,3 (±0,5) ^{bc} (0-2) n=64	0,0 ^{b c} n=35	Não Avaliado	
	Primário	Não observado	0,3 (±0,6) ^a (0-3) n=63	0,8 (±0,6) ^b (0-2) n=33	0,1 (±0,3) ^{ac} (0-1) n=78	0,7 (±1,1) ^b (0-5) n=59	0,0 ^{acd} n=14	Não avaliado	
	Secundário	Não observado	0,8 (±1,6) ^a (0-5) n=10	1,0 (± 1,4) ^a (0-2) n=8	0,4 (±0,7) ^a (0-3) n=51	0,9 (±1,0) ^a (0-2) n=15	0,0 ^a n=10	Não avaliado	

Diferentes sobrescritos na mesma linha indicam diferença estatisticamente significante (P<0,01).

5 - DISCUSSÃO

De acordo com McGee et al, (1998) as células germinativas dos mamíferos migram do saco vitelínico para a gônada indiferenciada (derivada da mesoderme) nas primeiras semanas de desenvolvimento. Depois diferencia-se para oogonia, prolofera por mitose e inicia o processo de meiose, ocorrendo nesta fase a primeira e maior onda de apoptose das células germinativas femininas. Subsequentemente, os oócitos sobreviventes progridem para a fase de dictióteno da prófase I onde seu desenvolvimento é interrompido até a ovulação.

De acordo com Lévy (2005), o processo de degeneração por apoptose é muito importante, pois, atinge cerca de 80% das células germinativas presentes no ovário, diminuindo de 7×10^6 no início da gestação para 1×10^6 ao nascimento e para 3×10^5 na puberdade em humanos. Os períodos de degeneração são o período de mitose das oogonias, de prófase (pré-leptóteno e paquíteno) da meiose I e o período de formação dos folículos primordiais com experimentos confirmando que estas mortes celulares são por apoptose (Coucovanis et al. 1993; Pesce & De Felici, 1994; De Pol et al. 1997; De Pol et al. 1998).

Em bovinos, Beckers *et al.*, (1996) citam que durante o período mitótico o número de ovogônias chega a dois milhões por feto. Após este período a ovogônia entra em meiose até prófase I, contudo aproximadamente 90% destas são perdidas, e ao nascimento, a população folicular é de aproximadamente 200.000.

Em bubalinos, El-Ghannam & El-Naggar (1974, 1975) fizeram estudos histológicos descritivos observando ovogônias entre três e quatro meses e ondas de degeneração folicular. Estas ondas de degeneração são semelhantes às observadas por Baker (1963) em humanos e por Erickson (1966) em bovinos.

As ondas de degeneração observadas pelos autores supracitados podem ser ondas apoptóticas, pois, segundo Vinatier & Dufour, (1996), a apoptose está envolvida na fisiologia de muitos tecidos e órgãos, inclusive no ovário, e está envolvida no desenvolvimento folicular ovariano de todos os mamíferos.

A apoptose foi avaliada em ovários fetais humanos por De Pol et al, (1998), Abir et al, (2002) e Fulton et al, (2005) e em ovários fetais ovinos por Aladaer et al, (2008), entretanto não existem dados na literatura referentes a bovinos e bubalinos.

Alguns outros estudos histológicos do ovário e da população folicular em búfalos foram realizados por Danell (1987), Le Van Ty et al., (1989), Smith et al., (1991) e Kumar et al., (1997), onde todos observaram uma pequena população folicular em relação à população folicular de bovinos apresentando, contudo, uma grande variação individual (entre zero a 720.000), sendo este número influenciado por fatores como espécie, raça, fatores genéticos, idade e estado reprodutivo do animal.

Células da granulosa e da teca interna de folículos pré e pós ovulação apresentam fragmentação internucleossomal do DNA características de apoptose (Guthrie et al, 1995; Joly et al , 1994; Nicosia et al, 1995; Palumbo et al, 1994; Zheng et al, 1994). Abir et al,(2002) utilizaram os métodos de TUNEL e imunocitoquímica para Bcl-2 concluindo que seus estudos não apresentaram evidências conclusivas de que a apoptose é responsável pelas extensivas perdas de oogonias e oócitos da metade da gestação até o nascimento, com taxas de apoptose de até 6%, sendo que a apoptose é responsável pela perda de mais de 85% das células germinativas em humanos. Estes autores especulam que o declínio do número de células germinativas é uma degeneração conseqüente do delicado evento da dinâmica meiótica ou talvez necrose ou outros processos de morte celular, sugerindo a necessidade de maiores estudos.

Aladaer et al,(2008) realizou estudos histológicos e de apoptose pelo TUNEL em ovários de fetos ovinos, observando apoptose entre 37 e 99 dias de gestação com maior taxa entre 58 e 73 dias.

De acordo com D'haeseleer et al, (2005) a apoptose foi localizada em todos os tipos de células ovarianas de bovinos adultos em vários estágios de ciclo estral, usando detecção de caspase-3 ativa, TUNEL e DAPI. Ferranil et al, (2005) utilizou as metodologias de TUNEL e histoquímica para Caspase-3 em ovários de vacas bovinas e bubalinas para detectar apoptose em folículos antrais.

6 - CONCLUSÃO

No presente trabalho, o método do TUNEL foi eficaz para detecção de apoptose em folículos ovarianos de fetos bovinos e bubalinos, concluindo-se que a apoptose ocorre em fetos bovinos, em todas as idades entre quatro e nove meses com maior incidência aos oito meses e em bubalinos ocorre em todas as idades entre três e sete com menor incidência aos seis meses, entretanto são necessários maiores estudos para o melhor esclarecimento desta questão.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-RAOUF, M. & EL-NAGGAR, M.A. **Biometry of the egyptian buffalo foetus. UARJ. Vet. Sci. v. 5**, p.37-43, 1968.
- ABIR, R.; ORVIETO, R.; DICKER, D.; ZUKERMAN, Z.; BARNETT, M.; FISCH, B. Preliminary studies on apoptosis in human fetal ovaries. **Fertility and Sterility, v. 78, n.2**, p.259-264, 2002.
- ALADAER, Q.; ZHANG, Z.P.; CAO, G.F.; ZHANG, Y. Histological study of germ cells development and apoptosis in mongolian sheep fetal ovaries **Animal Reproduction Science, v.103**, n.1-2, p. 179-186, 2008.
- AYRES, M.; AYRES Jr., M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.S. BioEstat 5.0 - Aplicações **Estatísticas nas áreas das Ciências Biológicas e Médicas**. Sociedade Civil Mamirauá, Brasília, CNPq, 2007, 272p.
- BAKER, T.G. A quantitative and cytological study of germ cells in humam ovaries. **Proccedings of the Royal Society, series B, v. 158**, n. 972, p. 417 – 433, 1963.
- BARUSELLI, P.S., SOUZA, A.H., MARTINS, C.M. et al., Sêmen sexado: inseminação artificial e transferência de embriões **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, 2007.
- BECKERS, J.F., DRION, P.V., FIGUEIREDO, J.R., GOFFINN, L., PIROTTIN, D., ECTORS, F.J. The ovarian follicle in cow: *in vivo* growth and *in vitro* culture. **Reprod. Dom. Anim. v. 31**, p. 543-548, 1996.

BLONDIN P, BOUSQUET D, TWAGIRAMUNGU H, BARNES F, SIRARD MA.

Manipulation of Follicular Development to Produce Developmentally Competent Bovine Oocytes. *Biology of Reproduction*, v.66, p.38-43, 2002.

CLEARY, M.L.; SMITH, S.D.; SKLAR, J. Cloning and structural analysis of cDNAs for Bcl-2 and a hybrid bcl2/immunoglobulin transcript resulting from the t(14;18) translocation. **Cell** v.47, p. 19-28, 1986.

COUCOUVANIS EC, SHERWOOD SW, CARSWELL-CRUMPTON C, SPACK EG, JONES PP. Evidence that the mechanism of prenatal germ cell death in the mouse is apoptosis. **Exp Cell Res** 209, 238–47, 1993.

D'HAESELEER, M., M. Van Poucke, et al. (2005). "Cell-specific localization of oestrogen receptor beta (ESR2) mRNA within various bovine ovarian cell types using in situ hybridization." **Anat Histol Embryol** 34(4): 265-72.

DANELL, B. **Oestrus behaviour, ovarian morphology and cyclical variation in follicular system and endocrine pattern in water buffalo heifers.** Tese de doutorado, Universidade de Uppsala, Sweden, 1987.

DE POL A, MARZONA L, VACCINA F, NEGRO R, SENA P, FORABOSCO A. Apoptosis in different stages of human oogenesis. **Anticancer Res**;18:3457–3461, 1998.

DE POL A, VACCINA F, FORABOSCO A, CAVAZUTTI E, MARZONA L. Apoptosis of germ cells during human prenatal oogenesis. **Hum Reprod** 12, 2235–2241, 1997.

- DRIANCOURT, M. A. Follicular dynamics in sheep and cattle. *Theriogenology*, v. 35, n.1, p. 55 – 79, 1991.
- EL-GHANNAM, F. & EL-NAGGAR, M.A. Studies of oocyogenesis of buffalo ovaries. **Zbl. Vet. Med. Association v. 22**, p.248-255, 1975.
- EL-GHANNAM, F. & EL-NAGGAR, M.A. The prenatal development of the buffalo ovary. **J. Reprod. Fertil. v. 41**, p. 479 - 483, 1974.
- EPPIG, J.J. & O'BRIEN, M.J. Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles. **Biol. Reprod. 54**, p.197-207, 1996.
- ERICKSON, B.H. Development and radio-response of pre-natal bovine ovary. **J. reprod. Fertil. V. 10**, p. 97-105. 1966.
- EL-WISHY, A. B., 2007. The postpartum buffalo: I.Endocrinological changes and uterine involution. **Anim. Reprod. Sci.**, 97: 201-215.
- FULTON, N., S. J. MARTINS DA SILVA, et al. (2005). "Germ cell proliferation and apoptosis in the developing human ovary." **J Clin Endocrinol Metab 90**(8): 4664-70.
- FAO, 2006:FAOSTAT, 2006. Statistical Data from Food and Agriculture of United Nations. [HTTP://faostat.fao.org](http://faostat.fao.org)
- GUTHRIE HD, COOPER BS, WELCH GR, ZAKARIA AD, JOHNSON LA. Atresia in follicles grown after ovulation in the pig: measuremt of increased apoptosis in granulosa cells and reduced follicular fluid estradiol- 17 beta. **Biol Reprod 52**, 920-927,1995.

- HAFEZ, E. S. E. **Ciclos reprodutivos. Reprodução Animal**. 6ª edição, Manole, Trad.Renato Campanarut Barnabé, p. 102 – 104, 1995.
- JOLY PD, TISDALL D J, HEATH DA, LUN S, MCNATTY KP. Apoptosis in bovine granulosa cells in relation to steroid synthesis, cyclicadenosine 3', 5'-monophospahte response tofollicle-stimulating hormone. **Biol Reprod** **51**, 934-944, 1994.
- KUMAR, A., SOLANKI, V.S., JINDAL, S.K., TRIPATHI, V.N., JAIN, G.C. Oocyte retrieval and histological studies of follicular population in buffalo ovaries. **Anim. Reprod. Sci.** **v.47**, n. 3, p. 189-195, 1997.
- LE VAN TY, CHUPIN, D., DRIANCOURT, D.A. Ovarian follicular population in buffaloes and cows. **Anim. Reprod. Sci.** **v. 19**, p. 171-178, 1989.
- LÉVY, R. Apoptosis in oocyte **Gynécologie Obstétrique & Fertilité** **33** 645–652, 2005.
- MADAM, M.L.. Status of reproduction in female buffalo. In: Buffalo Production an Health: a compendium of latest research information based on Indian studies. **ICAR publication**, New Delhi, India, p 89-100. 1988.
- MADAM, M.L., PRAKASH B. S. Reproductive endocrinology and biotechnology application among buffaloes. **Soc. Reprod. Fertil. Suppl.** V64, p 161-281, 2007.
- MANIK, R.S.; PALTA, P., SINGLA, S.K.; SHARMA, V. 2002. Folliculogenesis in buffalo (*Bubalus bubalis*): a review. **Reprod. Fertil. Dev.**, 14(5-6): 315-325.

- MCGEE, E. A., S. Y. Hsu, et al. (1998). "Cell death and survival during ovarian follicle development." **Mol Cell Endocrinol** **140**(1-2): 15-8.
- NICOSIA N, NICOSIA RF, SAUNDERS BO, MURO-CACHO C. Cell proliferation and apoptosis during development and aging of the rabbit corpus luteum. **Ann Clin Lab Sci** 25, 143-157, 1995.
- OCAMPO, M., J. O. BECKER, & J. G. BALDWIN. 1994. Occurrence of *Belonolaimus longicaudatus* on bermudagrass in the Coachella Valley. *Plant Disease* 78:529.
- PALUMBO A, YE H J. In situ localization of apoptosis in the rat ovary during follicular atresia. **Biol Reprod** 51, 888-895, 1994.
- PESCE M, DE FELICI M. Apoptosis in mouse primordial germ cells: a study by transmission and scanning electron microscope. **Anat Embryol (Berl)**;189:435–440, 1994.
- SANTAD, M.A., NASSER, A.A. A quantitative study of primordial follicles in buffalo heifer ovaries. In: *Anais 13th FAOrSIDA. Int. Course on Aniam. Repod*, Uppsala, Sweden, 1979.
- SAUMANDE, J. (1981) Radioimmunoassay of estradiol 17β in unextracted Plasma. *Steroids* 38,425-437.
- SIRARD & BLONDIN (1996). "Analysis of atresia in bovine follicles using different methods: flow cytometry, enzyme-linked immunosorbent assay, and classic histology." **Biol Reprod** **54**(3): 631-7.

- ROCHA LOURES R, 2001: Buffalo production System in Americas. IN: Proceedings of the Sixth World Buffalo Congress. Maracaibo, Venezuela. Pag 74-76
- SMITH, O.F., ADRIANO, F., DURAN, P. VENTURINA, H., ARGANOSA, A., CRUZ, L.C. Ovarian follicular population in swamp buffaloes at various ages. **III World Buffalo Congress – Proceedings**, p.86 – Bulgária, Varna, 1991.
- TAKASE, K.; ISHIKAWA, M.; HOSHIAI, H. Apoptosis in the degeneration process of unfertilized mouse ova. **Tohoko J. Exp. Med.** **175**, 69-76, 1995.
- VINATIER, D.; DUFOUR, D. Apoptosis: A programmed cell death involved physiology in ovarian and uterine. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology** **67**, p.85-102, 1996.
- YANG, M.Y.; RAJAMAHENDRAN, R. Involvement of apoptosis in bovine blastocysts produced in vitro. **Theriogenology** **51**, 336, 1999.
- YANG, M.Y.; RAJAMAHENDRAN, R. Expression of Bcl-2 and Bax proteins in relation to quality of bovine oocytes and embryos produced in vitro. **Animal Reproduction Science** **70** , 159-169, 2002.
- ZHENG, D. Q., J. L. Vayssiere, et al. (1994). "Apoptosis is antagonized by large T antigens in the pathway to immortalization by polyomaviruses." Oncogene **9**(11): 3345-51.