


**HÉLIO BATISTA DOS SANTOS**

The seal of the Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) is a circular emblem. It features a central illustration of a classical building with a pediment and columns, topped with a flame. Below the building is the Latin motto "INCIPIIT VITA NOVA". The outer ring of the seal contains the text "UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS" at the top and "7 DE SETEMBRO DE 1927" at the bottom, separated by two small stars.

**APOPTOSE E PROTEÍNAS DO CHOQUE TÉRMICO (HSP70) E DE  
PROLIFERAÇÃO CELULAR (PCNA) EM OVÁRIOS DE DUAS ESPÉCIES DE  
PEIXES DA BACIA DO RIO SÃO FRANCISCO EM DIFERENTES  
CONDIÇÕES AMBIENTAIS.**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
BELO HORIZONTE – MG  
2008**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**HÉLIO BATISTA DOS SANTOS**

**APOPTOSE E PROTEÍNAS DO CHOQUE TÉRMICO (HSP70) E DE  
PROLIFERAÇÃO CELULAR (PCNA) EM OVÁRIOS DE DUAS  
ESPÉCIES DE PEIXES DA BACIA DO RIO SÃO FRANCISCO EM  
DIFERENTES CONDIÇÕES AMBIENTAIS.**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Biologia Celular da  
Universidade Federal de Minas Gerais,  
como requisito parcial para a obtenção  
do título de Doutor em Ciências (Área  
de Concentração em Biologia Celular).**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
BELO HORIZONTE – MG  
2008**

043  
S237a

Santos, Hélio Batista dos

Apoptose e proteínas do choque térmico (HSP70) e de proliferação celular em ovários de duas espécies de peixes teleósteos da bacia do rio São Francisco em diferentes condições ambientais [manuscrito] / Hélio Batista dos Santos. – 2008.  
V, 75 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Nilo Bazzoli. Co-orientadora: Elizete Rizzo.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Prochilodus argenteus 2. Leporinus taeniatus – Teses.  
3. Apoptose – Teses. 4. Proteínas de choque térmico – Teses.  
5. Antígeno nuclear de célula em proliferação. 6. Folículos pós-ovulatórios. 7. Folículos atrésicos. 8. São Francisco, Rio. I. Bazzoli, Nilo. II. Rizzo, Elizete. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

**O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Ictiohistologia do Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG.**

**ORIENTADOR:**

PROF. DR. NILO BAZZOLI

**CO-ORIENTADORA:**

PROF. DRA ELIZETE RIZZO

**ESTE TRABALHO TEVE A COLABORAÇÃO DOS SEGUINTE PESQUISADORES:**

Dra. Luciana Moro - UFMG

Dr. Mário Tallarico O. Miranda – IBAMA;

Dr. Yoshimi Sato – CODEVASF;

**APOIO INSTITUCIONAL:**

-Ao convênio CEMIG e Companhia de Desenvolvimento dos Vales do São Francisco e Parnaíba, CEMIG GT-CODEVASF;

-Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA, área de Pesca e Aqüicultura;

-Laboratório de Apoptose do Departamento de Patologia Geral - UFMG;

-Centro de Microscopia Eletrônica do ICB-UFMG;

**APOIO FINANCEIRO:**

-CAPES – Bolsa de Doutorado (Março de 2004 a Fevereiro de 2008);

-CNPq Projeto Universal 479733/01;

-FAPEMIG processo CAG 852/05 Apoptose e expressão de proteínas do choque térmico como biomarcadores de impacto ambiental em ovários de peixes.

**DEDICO ESSA VITÓRIA A DEUS PELA OPORTUNIDADE CONCEDIDA, AS MINHAS FAMÍLIAS DE DIVINÓPOLIS (MÃE, PAI E IRMÃOS) E DE ITAÚNA (JOSÉ AUGUSTO, SUELI E FAMILIARES) E PRINCIPALMENTE À MINHA MÃE E MINHA ESPOSA HELENA EXEMPLOS DE FORÇA, AMOR E CARINHO.**

**MUITO OBRIGADO!!!**

**AOS MEUS ORIENTADORES DR. NILO BAZZOLI E A DRA. ELIZETE RIZZO,  
TODO MEU AGRADECIMENTO PELA ACOLHIDA, CONVIVÊNCIA, CARINHO,  
RESPEITO E ENSINAMENTOS TRANSMITIDOS QUE FORAM ESSENCIAIS PARA MEU  
CRESCIMENTO PESSOAL E PROFISSIONAL.**

**AO PROFESSOR E AMIGO DR. YOSHIMI SATO, MEUS AGRADECIMENTOS  
PELOS ENSINAMENTOS, SUPORTE E AMIZADE TRANSMITIDOS.**

**A MÔNICA PEREIRA RICARDO PELO GRANDE SUPORTE E APRENDIZADO  
DURANTE MINHA PASSAGEM PELO LABORATÓRIO DE ICTIOHISTOLOGIA.**

**MUITO OBRIGADO!!!**

**AO MESTRE, COM CARINHO, QUE ME  
APRESENTOU O MUNDO DA ANATOMIA  
MICROSCÓPICA (CITOLOGIA E HISTOLOGIA)  
E QUE ACREDITOU SEMPRE NO NOSSO  
PROJETO PROFISSIONAL, OBRIGADO MESTRE  
DR. GUALTER FUNK DE QUEIROZ.**

**MUITO OBRIGADO!!**



## **AGRADECIMENTOS**

**A MINHA EQUIPE DE TRABALHO E GRANDES AMIGOS, PELA OPORTUNIDADE DE FAZER PARTE DE SUAS VIDAS: MÔNICA, FABÃO, RALPH, FABRÍCIO, FLÁVIA, ROBERTO, KINULPE, RENATO, RAMON, HEDER, PAULA, PEDRO, CÁSSIA E PAULA.**

**AOS MEUS AMIGOS DA CODEVASF QUE TANTO CONTRIBUÍRAM PARA O DESENVOLVIMENTO DE MINHAS DISSERTAÇÃO E TESE, EM ESPECIAL VANDERLEI (BOCA), LULU, ZÉ GRANDE, DINEI, ÉDSON, CLÁUDIO, KLÉBER E O PROF. YOSHIMI SATO.**

**AOS PROFESSORES DO DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E PATOLOGIA, ESPECIALMENTE AOS PROFESSORES ANTÔNIO CARLOS SANTANA CASTRO, JOSÉ CARLOS NOGUEIRA, HÉLIO CHIARINI-GÁRCIA, GLEYDES GAMBOGI PARREIRA, LUCIANA MORO E ANILTON CÉSAR VASCONCELOS PELA CONVIVÊNCIA E ENSINAMENTOS.**

**À COORDENAÇÃO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR: ELIZABETH SILVA (2002), WALDEREZ ORNELAS (2004), ANNAMARIA RAVARA VAGO (2006) E GREGORY THOMAS KITTEN (2008).**

**AOS FUNCIONÁRIOS DO DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA, EM ESPECIAL À SECRETÁRIA DA PÓS-GRADUAÇÃO IRAÍDES SILVA DE JESUS PELA AJUDA NA RESOLUÇÃO DOS PROBLEMAS ADMINISTRATIVOS E PELA AMIZADE.**

**AOS COLEGAS DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR PELA CONVIVÊNCIA E ENSINAMENTOS.**

**AO PROFESSOR GILSON SOARES, PRESIDENTE DA FUNEDI/UEMG, POR TER ACREDITADO NO MEU POTENCIAL DESDE O INÍCIO.**

**E A TODOS (*ILUSTRES DESCONHECIDOS*) QUE CONTRIBUÍRAM DE FORMA DIRETA OU INDIRETA PARA ESSA VITÓRIA (SÃO MUITOS).**

**MUITO OBRIGADO!!!!!!**

**“EU NÃO ESTOU INTERESSADO EM  
NENHUMA TEORIA E NEM DESSAS COISAS DO  
ORIENTE ROMANCES ABSTRAIS, A MINHA  
ALUCINAÇÃO É SUPORTAR O DIA-A-DIA E  
MEU DELÍRIO É A EXPERIÊNCIA COM COISAS  
REAIS”.**

***BELCHIOR***

## SUMÁRIO

	<b>Pag.</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>iii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>v</b>
<b>LISTA DE TABELA</b> .....	<b>v</b>
<b>I INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>01</b>
<b>II OBJETIVOS</b> .....	<b>13</b>
<b>III ARTIGOS</b> .....	<b>14</b>
<b>ARTIGO 1.</b> SANTOS HB; RIZZO E; BAZZOLI N; SATO Y; MORO L (2005) Ovarian regression and apoptosis in the South American teleost <i>Leporinus taeniatus</i> Lutken (Characiforme, Anostomidae) from the São Francisco Basin. <i>Journal of</i> <i>Fish Biology</i> <b>67:1446-1459</b> . DOI: 10.1111/j.1095- 8649.2005.00854.x.....	<b>15</b>
<b>ARTIGO 2.</b> SANTOS HB; MORO L; SATO Y; BAZZOLI N; RIZZO E (2008) Relationship among follicular apoptosis, integrin $\beta$ 1 and collagen type IV during early ovarian regression in the teleost <i>Prochilodus argenteus</i> after induced spawning. <i>Cell and Tissue Research</i> <b>332:159-170</b> . DOI: 10.1007/s00441-007- 0540-1.....	<b>29</b>
<b>ARTIGO 3.</b> SANTOS HB; THOMÉ RG; ARANTES FP; SATO Y; BAZZOLI N; RIZZO E. Ovarian follicular atresia is mediated by heterophagy, autophagy, and apoptosis in <i>Prochilodus argenteus</i> and <i>Leporinus taeniatus</i> (Teleostei: Characiformes). <i>Theriogenology</i> . DOI: 10.1016/j.theriogenology.2008.06.091.....	<b>41</b>
<b>IV DISCUSSÃO GERAL</b> .....	<b>53</b>
<b>V CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS</b> .....	<b>59</b>
<b>VI REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>60</b>

## RESUMO

A regressão ovariana foi analisada em duas espécies de teleósteos da bacia do rio São Francisco: curimatã-pacu *Prochilodus argenteus* e piau-jejo *Leporinus taeniatus* submetidas à desova induzida por hipofiseação, utilizando extrato bruto de hipófise de carpa. Análises histológicas, ultra-estruturais, reação de TUNEL e eletroforese em gel de agarose identificaram a ocorrência da apoptose folicular durante regressão ovariana. A apoptose das células foliculares aumentou de maneira tempo dependente, atingindo um pico com 3 dias após desova. Análises imunohistoquímicas em ovários demonstraram que a marcação para integrina  $\beta 1$  e colágeno IV diminui significativamente durante a regressão dos folículos pós-ovulatórios. Células foliculares e tecais foram imunoreativas para caspase 3. Para análise da atresia folicular, fêmeas maduras foram estocadas em cativeiro após o período reprodutivo e a regressão ovariana foi acessada pelo índice gonadossomático e a atresia folicular analisada por histologia, ultra-estrutura, reação de TUNEL e imunohistoquímica. Durante a atresia folicular, as células foliculares estão ativamente envolvidas na reabsorção do vitelo. Células foliculares TUNEL-positivas predominaram na fase final de regressão dos folículos atrésicos. Intensas atividades auto e heterofágica foram detectadas nas células foliculares durante atresia folicular avançada e final. Durante a atresia avançada, células foliculares com intensa atividade de reabsorção de vitelo mostraram forte reação imunohistoquímica para HSP70, sugerindo um papel protetor da HSP70 para as células foliculares durante a atresia folicular. Reação imunohistoquímica para PCNA foi detectada na teca indicando que a proliferação celular contribui para a remodelação folicular. Apoptose e autofagia coexistem na atresia folicular de teleósteos para a remoção mais eficiente das células foliculares. Para a identificação de possíveis biomarcadores de impacto ambiental, fêmeas em maturação avançada e desovada de *P. argenteus* foram capturadas em dois trechos do rio São Francisco, à jusante da barragem de Três Marias. Índice gonadossomático, diâmetro de ovócitos vitelogênicos e densidade de folículos pós-ovulatórios foram significativamente mais baixos imediatamente após a barragem de Três Marias. Alta taxa de atresia folicular e reação imunohistoquímica para HSP70 em folículos vitelogênicos foi também detectada nesse trecho de estudo. Reação para PCNA mostrou a proliferação das células foliculares durante o crescimento dos ovócitos. Os resultados indicam o curimatã-pacu *P. argenteus* como um importante bioindicador de impacto ambiental no rio São Francisco enquanto folículos

atrésicos e folículos pós-ovulatórios podem ser utilizados para o monitoramento da atividade reprodutiva, à jusante da barragem de Três Marias.

**Palavras-chave:** *Prochilodus argenteus*, *Leporinus taeniatus*, apoptose, HSP70, PCNA, folículos pós-ovulatórios, folículos atrésicos, rio São Francisco.

## ABSTRACT

The ovarian regression was analyzed in two neotropical freshwater teleosts from the São Francisco River basin, Brazil: *Prochilodus argenteus* and piau-jejo *Leporinus taeniatus*, which were induced to spawn by using carp pituitary extract. Histological, ultrastructural, TUNEL reactions and agarose gel electrophoresis analyses detected the incidence of apoptosis during the ovarian regression. Apoptosis of the follicle cells increased in a time-dependent manner and reached a peak in 3 days postspawning. Immunohistochemistry reactions in ovaries showed that labeling for integrin  $\beta 1$  and collagen type IV decreased significantly during the ovarian regression of the postovulatory follicles. Follicle and theca cells were immunostained for caspase 3. Mature female were stoked in captivity after the reproductive period, then ovarian regression was assessed by gonadosomatic index. Follicular atresia was analyzed by histology, ultrastructure, TUNEL assay and immunohistochemistry. During the follicular atresia, the follicle cells are actively involved in the reabsorption of the yolk. TUNEL assay revealed the DNA fragmentation mainly in late follicular atresia. Intense auto- and heterophagic activity was detected in the follicle cells during advanced and late follicular atresia. Immunohistochemistry for HSP70 stained strongly the follicle cells during the advanced atresia, while they were involved actively in the engulfed of the yolk, suggesting the play role protector of the HSP70 for follicle cells during the follicular atresia. The PCNA was detected by immunohistochemistry in the theca indicating that the cellular proliferation contributes for follicular remodeling. Apoptosis and autophagy coexist during the teleosts follicular atresia in order to achieve a more efficient removal of the dying follicle cells. For identification of the potential biomarkers of environmental impact, mature and spawned females of the *P. argenteus* were captured in two sections of the São Francisco River, downstream from Três Marias Dam. The gonadosomatic index, vitellogenic follicle diameters and postovulatory follicles were significantly lower immediately below the Três Marias Dam. Additionally, higher follicular atresia and immunostaining for HSP70 in vitellogenic follicles were detected in ovaries this river section study. Immunostaining for PCNA showed proliferation of the follicle cells during the oocyte growth. The findings indicated the curimatã-pacu, *P. argenteus* as a powerful bioindicator of environmental impact in the São Francisco River while postovulatory and atretic follicles may be used for monitoring of the reproductive activity, downstream from the Três Marias Dam.

**Keywords:** *Prochilodus argenteus*, *Leporinus taeniatus*, apoptosis, HSP70, PCNA, postovulatory and atretic follicles, São Francisco River.

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pag.</b>
<b>Figura 1.</b> Mapa dos trechos de estudos no rio São Francisco à jusante da barragem de Três Marias e à jusante do rio Abaeté.....	<b>02</b>
<b>Figura 2.</b> Exemplar do curimatã-pacu, <i>Prochilodus argenteus</i> espécie de estudo.	<b>03</b>
<b>Figura 3.</b> Exemplar do piau-jejo, <i>Leporinus taeniatus</i> espécie de estudo.....	<b>03</b>
<b>Figura 4.</b> Esquema mostrando as diferenças entre os dois tipos de morte celular: apoptose e necrose.....	<b>06</b>
<b>Figura 5.</b> Esquema mostrando as rotas apoptóticas intrínseca e extrínseca.....	<b>08</b>
<b>Figura 6.</b> Desenho esquemático representando as relações entre proliferação, diferenciação e morte celular com a matriz extracelular.....	<b>09</b>
<b>Figura 7.</b> Esquema mostrando a relação entre as proteínas do choque térmico com as rotas apoptóticas intrínseca e extrínseca.....	<b>11</b>

## LISTA DE TABELA

	<b>Pag.</b>
<b>Tabela I.</b> Dados abióticos da água e comprimento total, peso corporal e atividade reprodutiva de fêmeas de <i>Prochilodus argenteus</i> em dois trechos do rio São Francisco durante o verão.....	<b>02</b>

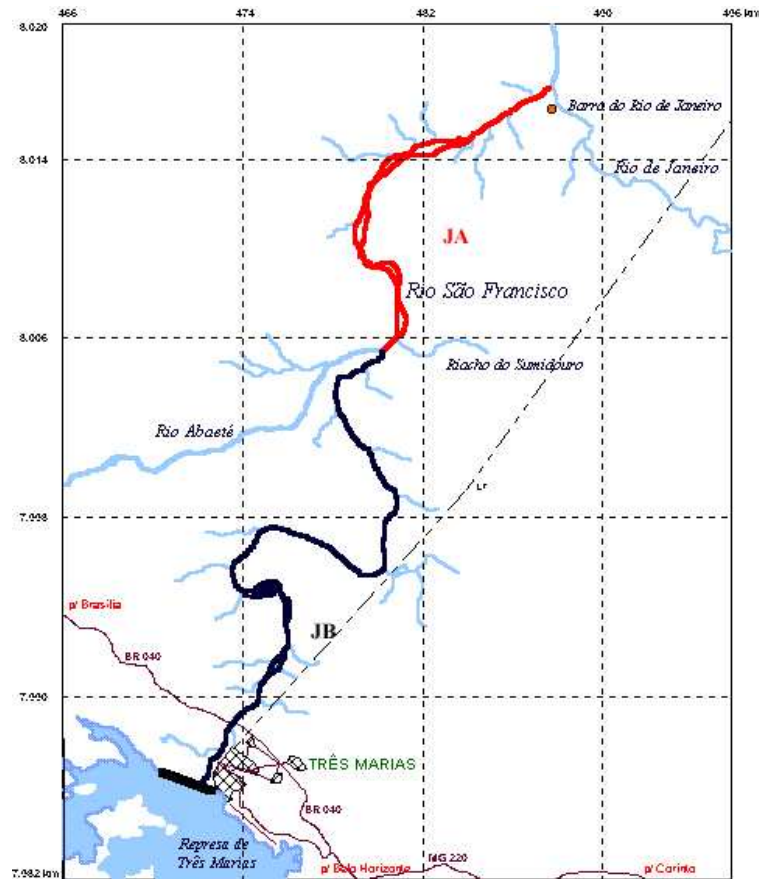


## **1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA**

## 1. INTRODUÇÃO e JUSTIFICATIVA

Fatores físicos e químicos afetam o comportamento e a dinâmica reprodutiva dos peixes de água doce, incluindo temperatura, precipitação pluviométrica, turbidez da água, alimentação, agentes xenobióticos, fotoperíodo, densidade populacional, dentre outros (NAGAHAMA, 1983; JANZ *et al.*, 1997, 2001; SHIMIZU, 2003; MIRANDA *et al.*, 1999; WEBER *et al.*, 2002). Estudos envolvendo os primeiros segmentos de rios abaixo das barragens mostraram que, nesse trecho, a água apresenta condições térmicas e hidrodinâmicas instáveis que afetam negativamente o comportamento reprodutivo dos peixes (BAXTER, 1977). No rio Paraná, o comportamento reprodutivo de peixes migradores foi alterado nos primeiros quilômetros logo após a barragem de Itaipu, onde os peixes não conseguiram desovar e em consequência, apresentaram intenso processo de atresia folicular (AGOSTINHO *et al.*, 1993). No rio São Francisco, peixes migradores de importância econômica, não se reproduzem e apresentam maior incidência de atresia folicular no trecho imediatamente à jusante da barragem de Três Marias (OLIVEIRA-JUNIOR, 2002; SATO *et al.*, 2005).

A usina hidrelétrica de Três Marias foi construída no rio São Francisco para produção de energia elétrica, regularização do rio e controle de cheias. No verão, a água do hipolímnio da represa de Três Marias, que é mais fria e pobre em oxigênio, é lançada no rio São Francisco, a jusante da barragem, inibindo a reprodução das principais espécies de importância econômica nos primeiros 34 km a jusante da barragem (Figura 1, Tabela D). Nesse trecho, o rio apresenta somente pequenos tributários (córregos e riachos) que não modificam o perfil físico-químico da água. O rio Abaeté é o primeiro tributário de médio porte que, desaguando cerca de 34 km após a barragem de Três Marias, minimiza o impacto sobre a reprodução dos peixes. Nesse último trecho, da confluência com o rio Abaeté até a barra do rio de Janeiro, 34 a 54 km da barragem, o rio São Francisco apresenta condições favoráveis à reprodução dos peixes de piracema, incluindo *Prochilodus argenteus*, espécie mais abundante na pesca profissional na região de Três Marias, MG (SATO *et al.*, 2005).



**Figura 1:** Mapa de localização dos trechos em estudo no rio São Francisco: à jusante da barragem de Três Marias (JB) e após a confluência com rio Abaeté (JA).

**Tabela I:** Dados abióticos da água e atividade reprodutiva de *P. argenteus* em dois trechos do rio São Francisco durante o verão.

	JB	JA
Temperatura (°C)	23,4 ± 0,5	25,4 ± 1,0
Oxigênio (mg/L)	3,32 ± 0,85	6,85 ± 0,83
Fluxo de água (m <sup>3</sup> /s)	584,8 ± 73,2	632,8 ± 73,4
Atividade reprodutiva de fêmeas (%)	18	97

JB: após a barragem de Três Marias; JA: após a confluência do rio Abaeté.

Dados de SATO *et al.* (2005).

Espécies de piracema como surubim, matrinhã, dourado, curimatãs e alguns piaus são as mais afetadas pelo barramento dos rios por terem sua rota migratória para desova interrompida (SATO *et al.*, 2005). Nesse contexto, o presente trabalho utilizou dois Characiformes migradores como modelo de estudo: curimatã-pacu *Prochilodus argenteus* (Figura 2) da família Prochilodontidae e piau-jejo, *Leporinus taeniatus* (Figura 3) da

família Anostomidae. Essas espécies apresentam reprodução sazonal sincronizada com a estação chuvosa entre novembro e fevereiro, desova total, ovos livres, desenvolvimento embrionário rápido e ausência de cuidado parental (SATO *et al.*, 2003a). Como esses peixes não se reproduzem espontaneamente em cativeiro, a desova induzida por hipofisacção é necessária para completar seu ciclo reprodutivo (SATO *et al.*, 2003b).



**Figura 2.** Exemplar do curimatã-pacu, *Prochilodus argenteus* AGASSIZ 1829.



**Figura 3.** Exemplar do piau-jejo, *Leporinus taeniatus* LÜTKEN 1875.

## REGRESSÃO DE FOLÍCULOS OVARIANOS

Após desova, ovários de peixes apresentam folículos pós-ovulatórios e atresícos que envolvem progressivamente até a recuperação total dos ovários, os quais voltam a fase de repouso para iniciar um novo ciclo reprodutivo.

Folículos pós-ovulatórios, estruturas remanescentes dos folículos ovarianos que permaneceram nos ovários de peixes após a desova, são formados por camada de células foliculares ou células da granulosa revestindo o lume folicular e teca conjuntiva externamente (DRUMMOND *et al.*, 2000; SANTOS *et al.*, 2005, 2008). Diferente do corpo lúteo dos mamíferos, esses folículos não exibem atividade hormonal, degeneram e são reabsorvidos em poucos dias durante remodelação dos ovários após desova (LANG, 1981a; SAIDAPUR, 1982; SELMAN & WALLACE, 1989).

Durante a regressão ovariana ocorrem modificações morfológicas gradativas nos folículos pós-ovulatórios, como formações de pregas devido ao colapso do envoltório folicular, hipertrofia das células foliculares, espessamento da teca, seguido de involução e reabsorção folicular (LANG, 1981a; SAIDAPUR, 1982; SANTOS *et al.*, 2005). Imediatamente após desova, as células foliculares adquirem características ultra-estruturais de células especializadas em síntese de proteínas, com retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi desenvolvidos (DRUMMOND *et al.*, 2000, SANTOS *et al.*, 2008). Durante involução folicular, células foliculares isoladas degeneram-se e são eliminadas por apoptose (DRUMMOND *et al.*, 2000; WOOD & Van Der KRAAK, 2001; SANTOS *et al.*, 2005, 2008). Células foliculares saudáveis apresentam atividade fagocítica e juntamente com leucócitos são responsáveis pela reabsorção dos corpos apoptóticos (BESSEAU & FALIEUX, 1994, LUTTON & CALLARD, 2006).

Atresia folicular é um processo degenerativo que ocorre em ovários de todos vertebrados, independente da idade, estágio do ciclo reprodutivo e condições do meio ambiente (SAIDAPUR, 1978). Em mamíferos, cerca de 99% dos folículos ovarianos sofrem atresia folicular logo após o nascimento e são reabsorvidos pelos ovários e somente cerca de 1% podem ser ovulados durante a vida reprodutiva (HUGHES & GOROSPE, 1991; HSUEH, *et al.*, 1994). Em teleostes, a atresia folicular é mais freqüente na fase vitelogênica, contudo folículos pré-vitelogênicos podem também tornarem-se atresícos (RIZZO & BAZZOLI, 1995; MIRANDA *et al.*, 1999; HABIBI & ANDREU-VIEYRA, 2007). Vários fatores podem induzir atresia folicular como hipofisectomia, irradiação, aplicação de substância anti-gonadotrófica, estresse térmico, confinamento (SAIDAPUR,

1978; RIZZO & BAZZOLI, 1995; MIRANDA *et al.*, 1999; LINARES-CASENAVE *et al.*, 2002; SATO *et al.*, 2005).

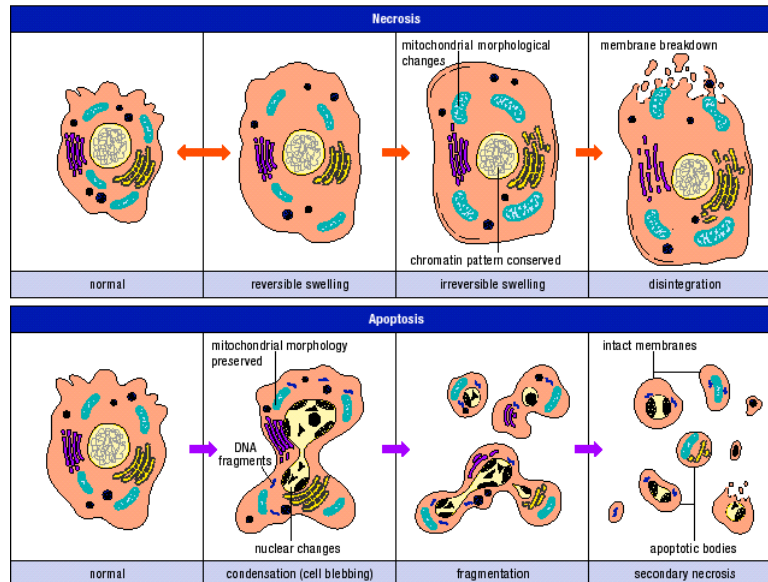
Os eventos morfológicos da atresia de folículos vitelogênicos de teleósteos são similares entre as espécies: retração celular, fragmentação do envelope nuclear e liberação do material genético para o ooplasma, aparecimento de fendas na zona pelúcida e liquefação do vitelo (LANG, 1981b; RIZZO & BAZZOLI, 1995). As células foliculares hipertrofiam-se, sendo responsáveis pela reabsorção do vitelo e zona pelúcida. Em mamíferos, a apoptose é um evento inicial da atresia folicular, sendo responsável pela eliminação das células da granulosa (HUGHES & GOROSPE, 1991; ISHIGURO *et al.*, 1999; HSUEH *et al.*, 1994; NAHUM *et al.*, 1996). Estudos em algumas espécies de peixes teleósteos mostraram que apoptose é um evento tardio da atresia folicular, uma vez que as células foliculares estão ativamente envolvidas na reabsorção do vitelo e remanescentes do ovócito em degeneração (WOOD & Van Der KRAAK, 2003; SANTOS *et al.*, 2005, 2008). O tempo para completa reabsorção dos folículos atresícos de peixes é longo, variando em meses dependendo das condições ambientais e das estratégias reprodutivas das espécies (ROMAGOSA, 1991; RIZZO & BAZZOLI, 1995; MIRANDA *et al.*, 1999; LEONARDO *et al.*, 2006).

#### **MORTE CELULAR PROGRAMADA**

A morte celular programada por apoptose é um processo fisiológico importante para a homeostase do organismo (KERR, *et al.*, 1972). Uma característica marcante da apoptose, é a clivagem do DNA nas regiões internucleosômicas por endonucleases ativadas por íons cálcio e magnésio (GAVRIELI *et al.*, 1992). Várias características morfológicas e fisiológicas diferenciam a apoptose da necrose (**Figura 4**) destacando-se: condensação da cromatina na periferia do envoltório nuclear, perda de adesão ente células e com a matriz extracelular, fragmentação celular com formação de corpos apoptóticos e ausência de resposta inflamatória (WYLLIE *et al.*, 1980; ROBERTSON & ORRENIUS, 2000). Em contraste, a necrose é caracterizada pela quebra aleatória do DNA, alteração de organelas celulares, rompimento da membrana plasmática desencadeando reação inflamatória (THOMPSON, 1995).

Em peixes teleósteos, a apoptose foi relatada no desenvolvimento da retina (CANDAL *et al.*, 2001), no desenvolvimento embrionário de zebrafish (COLE & ROSS, 2001), no epitélio branquial de truta (ROJO *et al.*, 1997), em processos evolucionários,

como a perda da visão em peixes de caverna (JEFFERY, 2001), na diferenciação gonadal em zebrafish (UCHIDA *et al.*, 2002) e na recuperação de ovários após desova (DRUMMOND *et al.*, 2000; SANTOS *et al.*, 2005, 2008; THOMÉ *et al.*, 2006).



**Figura 4.** Esquema mostrando as mudanças morfológicas de uma célula em apoptose ou necrose (<https://isobm.org/Pics/necrosis.gif>).

Existem fatores intrínsecos e extrínsecos que atuam promovendo a sobrevivência ou a morte celular no organismo (CHUN & HSUEH, 1998; JOHNSON, 2003). Citocinas, como interleucina-3, interleucina-5 e fator estimulador de colônia de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) induzem a sinalização da via anti-apoptótica em eosinófilos de mamíferos. Por outro lado, fator de crescimento transformante beta (TGF- $\beta$ ) inibe a via anti-apoptótica nestas células (SIMON & ALAM, 1999). Fatores ambientais, como estresse térmico, induzem apoptose no sistema imune de aves (GUIMARÃES *et al.*, 2003). Fatores intra-ovarianos de sobrevivência, como estrógeno, activinas e citocinas (interleucina-1 $\beta$ ) suprimem a apoptose em folículos ovarianos de ratas. Em contraste, fatores atretogênicos que induzem atresia folicular como andrógenos, radicais livres e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) desencadeiam a morte celular programada nestes folículos (KAIPIA & HSUEH, 1997; CHUN & HSUEH, 1998; YU HSU & HSUEH, 1998; HUSSEIN, 2005). Em camundongos, a alta expressão de proteoglicanas da membrana plasmática pode estar relacionada com apoptose das células foliculares de folículos atrécicos (ISHIGURO *et al.*, 1999). Em teleósteos, a supressão da apoptose em

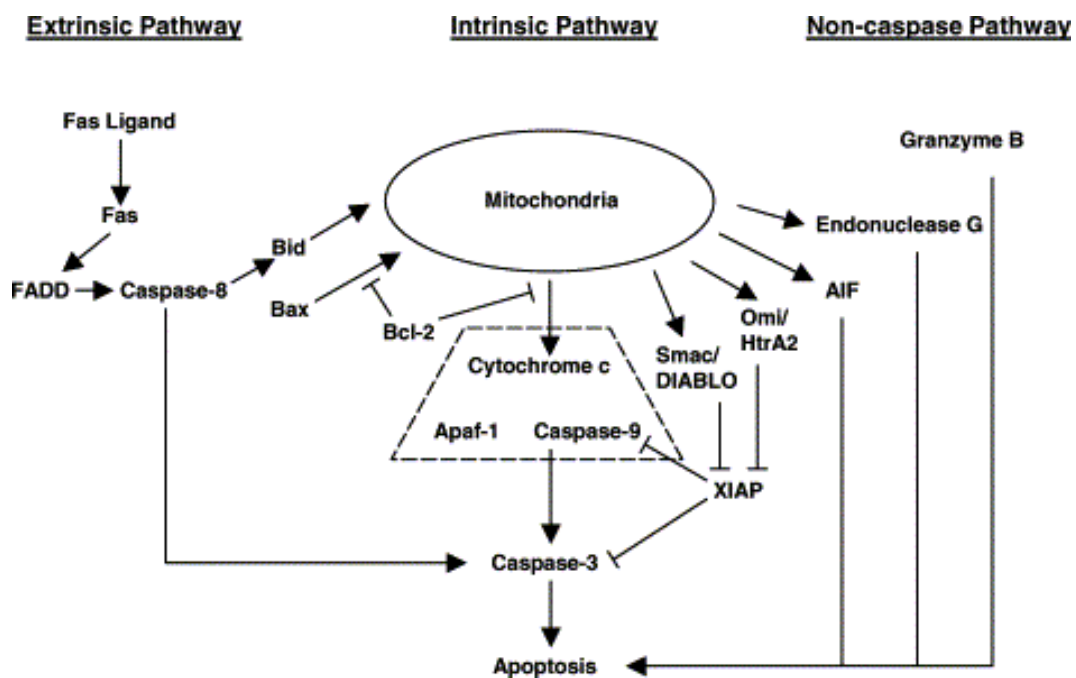
folículos ovarianos cultivados foi descrita utilizando gonadotrofina hipofisária, fator de crescimento epidermal (EGF) e 17 $\beta$ -estradiol (JANZ & Van Der KRAAK, 1997).

Os eventos moleculares que coordenam a apoptose foram conservados durante a evolução, estando presentes desde vermes até seres humanos (THOMPSON, 1995). A apoptose é regulada por duas vias principais (**Figura 5**): a via intrínseca tem como agente principal a mitocôndria e a via extrínseca dependente de receptores de membrana plasmática (ZHANG *et al.*, 2003). Além disso, os genes da família B-Cell lymphoma-2 (Bcl-2), estão envolvidos na modulação da apoptose. Assim, Bcl-2, bem como seu homólogo estrutural, Bcl-xl, promovem a inibição da apoptose. Em contraste, outros membros da família Bcl-2, como Bcl xs, Bax, Bak, Bid e Bad, desencadeiam a apoptose, sendo denominados agentes pró-apoptóticos (WOOLVERIDGE *et al.*, 1999; HSU & HSUEH, 2000; MATTSON, 2000, ZIMMERMANN *et al.*, 2001; HUETTENBRENNER *et al.*, 2003; KRATZ *et al.*, 2006). Na via intrínseca, membros pró-apoptóticos da família Bcl-2 (Bax e Bad) são responsáveis pelo aumento da permeabilidade mitocondrial, ocasionando aumento de cálcio e liberação de citocromo *c* no citoplasma. O citocromo *c* associará com Apaf-1 (apoptotic protease activation factor-1) e pro-caspase 9 para a formação do apoptossomo, complexo que ativa a caspase 9, que por sua vez ativará caspase 3 levando a apoptose (MATTSON, 2000; ZHANG *et al.*, 2003). Além disso, a via Fas (via extrínseca) consiste na ligação de uma proteína transmembrana (Fas L) ao receptor Fas (Fas R) na superfície celular conduzindo a ativação de caspases, as quais promovem a apoptose (WOOLVERIDGE *et al.*, 1999; RIEUX-LAUCAT *et al.*, 2003; EIMON *et al.*, 2006).

Estudos recentes revelaram a existência de mecanismos de morte celular programada, alternativos e independentes de caspases (LEIST & JÄÄTTELÄ, 2001, LIEBERMAN 2003, LIEBERMAN & FAN, 2003). Em condições de estresse ou dano celular, incluindo restrição calórica e alterações hormonais, a autofagia desempenha importante papel no manejo bioenergético, degradação e reciclagem de organelas, o qual pode levar à recuperação celular, apoptose (tipo I), morte autofágica (tipo II) ou necrose (ASSUNÇÃO GUIMARÃES & LINDEN, 2004). A inter-relação entre os vários processos de morte celular é complexa, uma vez que, em alguns casos a autofagia constitui uma forma de adaptação ao estresse suprimindo a apoptose enquanto em outros casos a autofagia constitui uma via alternativa de eliminação celular. (BURSH, 2001; LOCKSHIN & ZAKERI, 2004; PENALOZA *et al.*, 2006). O acúmulo de vacúolos autofágicos no



citoplasma representa a principal característica na morte autofágica (LOCKSHIN & ZAKERI, 2004; DUERRSCHMIDT *et al.*, 2006). Células em autofagia apresentam além dos vacúolos autofágicos, nucleoplasma e citoplasma ligeiramente elétron-denso, embora a estrutura nuclear mostra-se íntegra (BURSH, 2001). Adicionalmente, a membrana plasmática perde especializações tais como microvilosidades e complexos juncionais, podendo ainda ocorrer formação de projeções citoplasmática (ASSUNÇÃO GUIMARÃES & LINDEN, 2004).

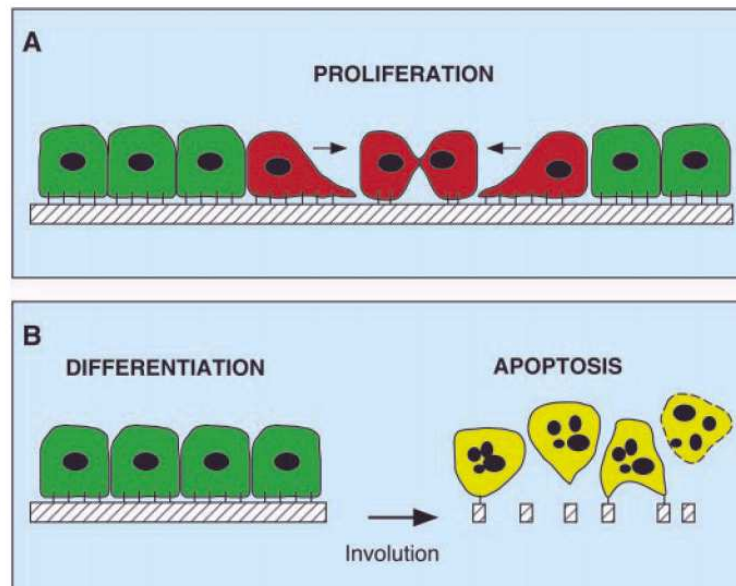


**Figura 5.** Esquema mostrando as rotas apoptóticas intrínseca (via mitocondrial) e extrínseca (via Fas) ativadoras de caspases (ZHANG *et al.*, 2003).

#### MOLÉCULAS DE ADESÃO E MATRIZ EXTRACELULAR

Moléculas de adesão e remodelação da matriz extracelular estão associadas a vários eventos fisiológicos tais como desenvolvimento embrionário, morfogênese e reprodução (CÈRDA *et al.*, 1999; MATSUI *et al.*, 2000; RODGERS *et al.*, 2003). A matriz extracelular é um dos fatores de grande importância para homeostase tissular, principalmente como agente anti-apoptótico (**Figura 6**) para vários tipos celulares (TIBÉRIO *et al.*, 2002; PINKSE *et al.*, 2004). Estudos envolvendo o papel das moléculas de adesão e remodelação da matriz extracelular durante involução dos ovários pós-desova têm sido pouco investigados em peixes teleósteos. Entretanto, em mamíferos esses mecanismos já estão bem estabelecidos, principalmente na luteólise e atresia folicular

(HONDA *et al.*, 1997; YAMADA *et al.*, 1999; MAKRIGIANNAKIS *et al.*, 1999, 2000; ROLAKI *et al.*, 2005).



**Figura 6.** Esquema mostrando a relação da matriz extracelular com a proliferação, diferenciação e morte celular nos seres multicelulares (GIANCOTTI & RUOSLAHTI, 1999).

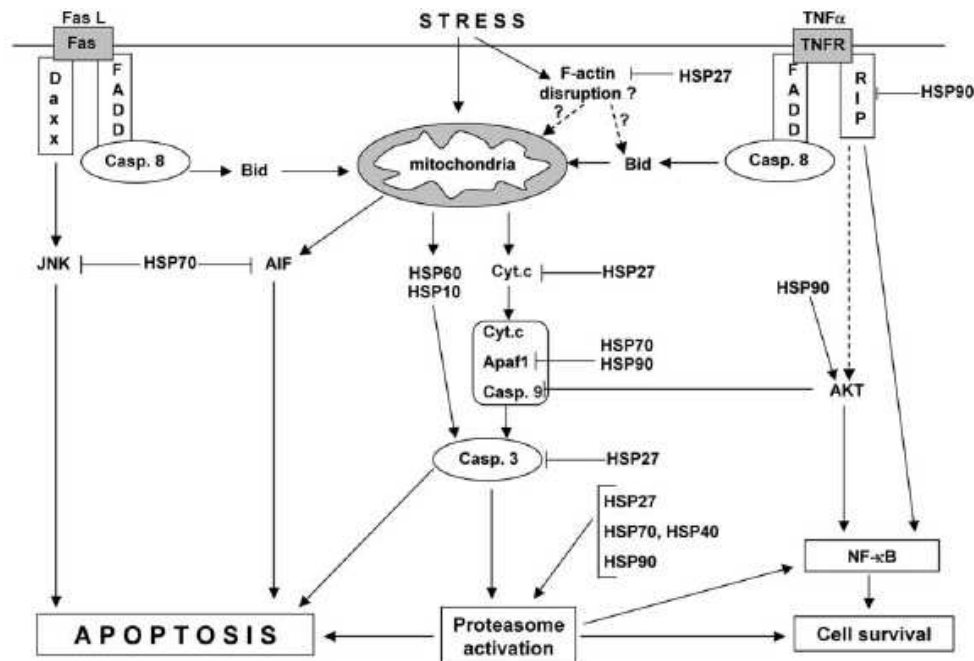
As interações célula-célula e célula-matriz extracelular são mediadas por diferentes tipos de moléculas de adesão tais como integrinas, caderinas, membros da família de imunoglobulinas e selectinas. As integrinas, grande família de proteínas transmembranas atuam na ancoragem e comunicação celular, ocorrendo desde esponjas até mamíferos (Van der FLIER & SONNENBERG, 2001). As integrinas são heterodímeros compostos por duas subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  e estão relacionadas com a proliferação, diferenciação e morte celular (HYNES, 1992; BURKE, 1999; GIANCOTTI & RUOSLAHTI, 1999; HUGHES, 2001). A anoiquia proveniente da perda da adesão célula-matriz está diretamente relacionada à ausência de certas subunidades de integrina, dentre elas  $\alpha 5$  e  $\beta 1$  (GROSSMANN, 2002; MARTIN & VUORI, 2004; ZHAN *et al.*, 2004). Estudos *in vitro* mostraram a importância de integrinas  $\alpha 5/\beta 1$  como fator de sobrevivência celular via regulação de membros anti-apoptóticos da família Bcl-2 (ZHANG *et al.*, 1995; MARTIN & VUORI, 2004). Em ovários, a diminuição ou ausência de subunidades de integrinas  $\alpha 6$  e  $\beta 1$  foi associada com o aumento da apoptose da granulosa dos folículos atresicos de primatas (GIEBEL *et al.*, 1996, GIEBEL & RUNE, 1997). Estudos *in vitro* mostraram que a interação entre integrina  $\alpha 6/\beta 1$  e lamininas aumentou a sobrevivência e proliferação de células da granulosa em ovelhas (Le BELEGO *et al.*, 2002; Le BELEGO *et al.*, 2005).

O colágeno tipo IV é um dos componentes da lâmina basal que está envolvido, via integrinas, na adesão e sobrevivência celular. Estudos *in vitro* com fibroblastos cultivados em meio rico com colágeno IV mostraram baixa taxa de apoptose quando comparado com o controle (RUHL *et al.*, 1999). Estes mesmos autores observaram diminuição da apoptose em fibroblastos devido ao fator anti-apoptótico do colágeno IV via regulação de agentes pró-apoptóticos da família Bcl-2. Em peixes teleósteos, poucos trabalhos analisaram a importância da matriz extracelular e das moléculas de adesão no desenvolvimento folicular (CÈRDA *et al.*, 1999; MATSUI *et al.*, 2000; OGIWARA *et al.*, 2005) ou na remodelação ovariana após desova (SANTOS *et al.*, 2008).

### **HSP70, PCNA, APOPTOSE E REPRODUÇÃO**

Proteínas do choque térmico (HSPs) são altamente conservadas durante a evolução e funcionam como chaperonas moleculares que interferem na síntese protéica permitindo que as proteínas organizem-se de forma correta e/ou atuam promovendo o desdobramento de proteínas que se organizaram de maneira incorreta (BASU *et al.*, 2002; SREEDHAR & CSERMELY, 2004). As HSPs são expressas de forma constitutiva, contudo, estresse do meio ambiente como mudanças bruscas de temperatura e xenobióticos podem aumentar sua expressão (IWAMA *et al.*, 1998, 2004; FEDER & HOFMANN, 1999; PARCELLIER *et al.*, 2003). As HSPs são divididas em dois grupos: as de grande peso molecular (HSP60, HSP70 e HSP90) e as de menor peso molecular como a HSP 27, onde as de grande peso molecular são ATP dependentes. As HSPs podem atuar tanto na repressão quanto na promoção da apoptose associando-se com componentes chaves da rota apoptótica (PARCELLIER *et al.*, 2003). A HSP70 previne apoptose tanto dependente quanto independente de caspases. HSP70 liga-se ao Apaf-1 promovendo sua inibição, portanto, a ativação de caspase 9 e subseqüentemente, a ativação de caspase 3 torna-se inviável (**Figura 7**). Além disso, ela pode ligar-se ao AIF (apoptosis inducing factor) impedindo sua ação (PARCELLIER *et al.*, 2003).

O envolvimento da apoptose na reprodução de mamíferos foi documentada em estudos realizados principalmente com ratos: células germinativas do epitélio seminífero de ratos após a depleção de andrógeno (WOOLVERIDGE *et al.*, 1999), células do *cummulus oophorus* após a ovulação (SZOLTYS *et al.*, 2000) e na atresia folicular (HUGHES & GOROSPE, 1991). A apoptose está também envolvida no processo de regressão dos folículos pós-ovulatórios e dos folículos atrésicos de galinhas (TILLY *et al.*, 1991; SUNDARESAN *et al.*, 2008).



**Figura 7.** Esquema mostrando a relação entre as proteínas do choque térmico com as rotas apoptóticas intrínseca e extrínseca (PARCELLIER *et al.*, 2003).

Em teleósteos, a apoptose pode ocorrer nos diferentes estádios de desenvolvimento dos folículos ovarianos, tendo importância na seleção e recrutamento de grupos de folículos para a vitelogênese (JANZ & Van Der KRAAK, 1997). Estudos histológicos e ultra-estruturais revelaram apoptose em células foliculares de folículos pós-ovulatórios de lambaris, *Astyanax bimaculatus lacustris* (DRUMMOND *et al.*, 2000) e *L. taeniatus* (SANTOS *et al.*, 2005). Reação TUNEL-positiva nas células foliculares foi detectada em *L. taeniatus*, *Prochilodus costatus* e *P. argenteus* (SANTOS *et al.*, 2005, 2008; THOMÉ *et al.*, 2006) e em *Oncorhynchus mykiss* (WOOD & Van Der KRAAK, 2002). O padrão em escada do DNA apoptótico foi detectado durante regressão dos ovários de *P. argenteus* após desova através de eletroforese em gel de agarose (SANTOS *et al.*, 2008).

A resposta ao estresse é mediada pelos sistemas nervoso e endócrino com mobilização de energia e funções compensatórias para o organismo retornar a homeostase. A apoptose é iniciada não apenas por estímulos fisiológicos, mas também por várias substâncias tóxicas presentes no meio ambiente. Em peixes teleósteos, aumento significativo da apoptose foi utilizado como bioindicador de ambientes aquáticos impactados expostos a diferentes tipos de xenobióticos que prejudicam desde a função

hepática até a taxa reprodutiva do peixe (JANZ *et al.*, 1997, 2001; PIECHOTTA *et al.*, 1999; WEBER *et al.*, 2001, 2002). Estudos com ovários de peixes teleósteos mostraram aumento de HSP70 e da apoptose em um trecho do rio Mattagami, Canadá, onde as condições ambientais eram desfavoráveis para reprodução, devido a poluentes provenientes do processamento da celulose, sugerindo que HSP70 está associada a proteção celular (JANZ *et al.*, 1997, 2001). Outros autores, também relataram correlação entre HSP70 e apoptose em peixes submetidos experimentalmente a agentes tóxicos (WEBER & JANZ, 2001). Além disso, o aumento da expressão de HSP70 foi descrito em *Trematomus bernacchii* peixe teleósteo da Antártida, submetido a aumento de temperatura (4°C) em relação aos controles (- 1,96°C) não aclimatados (CARPENTER & HOFMANN, 2000). Estudos experimentais têm sugerido a utilização da expressão de HSP70 em gônadas de peixes teleósteos como biomarcador de ambiente aquático impactado (CARNEVALI & MARADONNA, 2003; YOO & JANZ, 2003; MIGLIARINI *et al.*, 2005).

O antígeno de proliferação celular (PCNA) é um importante regulador do ciclo celular e está altamente conservado durante a evolução. O PCNA atua como co-fator para DNA polimerase Delta na fase S do ciclo celular e está envolvida também no reparo do DNA durante a sua síntese (BRAVO & McDONALD-BRAVO, 1987). O PCNA começa a acumular-se na fase G1 da interfase, atingindo nível máximo durante a fase S e diminuindo durante a fase G2 e na mitose (KURKI *et al.*, 1988). O padrão de expressão de PCNA tem sido utilizado como ferramenta para o estudo de proliferação celular principalmente em ovários de mamíferos na foliculogênese e atresia folicular (ISOBE & YOSHIMURA 2000; HUTT *et al.*, 2006; TOMÁNEK & CHRONOWSKA, 2006). Entretanto, poucos trabalhos utilizaram PCNA como marcador de proliferação celular em ovários de teleósteos (KORFSMEIER, 2002) e, atualmente, nenhum trabalho foi desenvolvido em condições de regressão ovariana e de impacto ambiental.

## **2. OBJETIVOS**

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve por objetivo analisar a apoptose e detectar proteínas do choque térmico (HSP70) e de proliferação celular (PCNA) em ovários de peixes teleósteos, com vistas à sua utilização em projetos de monitoramento de impacto ambiental.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

-Analisar a dinâmica da reabsorção dos folículos pos-ovulatórios e atrésicos em *Leporinus taeniatus*, como modelo para estudo da apoptose das células foliculares durante a regressão ovariana;

-Investigar a regressão ovariana inicial em *Prochilodus argenteus* após desova induzida, com especial consideração a: 1) se apoptose contribui para a regressão do folículo pos-ovulatório e 2) se integrina B1 e colágeno tipo IV estão relacionados com a apoptose das células foliculares em folículos pos-ovulatórios;

-Avaliar a contribuição da apoptose durante atresia folicular e determinar a expressão de PCNA e HSP70 por imunohistoquímica em duas espécies de teleósteos da bacia do rio São Francisco: curimatã-pacu *Prochilodus argenteus* e piau-jejo *Leporinus taeniatus*;

### **3. ARTIGOS**



### 3. ARTIGOS

**ARTIGO 1.** SANTOS HB; RIZZO E; BAZZOLI N; SATO Y; MORO L (2005) Ovarian regression and apoptosis in the South American teleost *Leporinus taeniatus* Lutken (Characiformes, Anostomidae) from the São Francisco Basin. *Journal of Fish Biology* **67:1446-1459**. DOI: 10.1111/j.1095-8649.2005.00854.x.

**ARTIGO 2.** SANTOS HB; MORO L; SATO Y; BAZZOLI N; RIZZO E (2008) Relationship among follicular apoptosis, integrin  $\beta$ 1 and collagen type IV during early ovarian regression in the teleost *Prochilodus argenteus* after induced spawning. *Cell and Tissue Research* **332:159-170**. DOI: 10.1007/s00441-007-0540-1.

**ARTIGO 3.** SANTOS HB; THOMÉ RG; ARANTES FP; SATO Y; BAZZOLI N; RIZZO E Follicular atresia is mediated by apoptosis and autophagy in *Prochilodus argenteus* and *Leporinus taeniatus* (Teleostei: Characiformes). *Theriogenology*. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2008.06.091.







## **4. DISCUSSÃO GERAL**

#### 4. DISCUSSÃO GERAL

O presente trabalho foi realizado em 4 etapas. Inicialmente, avaliou-se a participação da apoptose na regressão folicular em ovários de peixes submetidos à desova induzida por hipofiseção. Em seguida, analisou-se a relação entre apoptose das células foliculares e alterações da membrana basal, colágeno IV e integrina  $\beta 1$  em folículos pós-ovulatórios. Posteriormente, estudamos a relação entre apoptose e HSP70 durante a regressão de folículos atresícos. Finalmente, investigamos a ocorrência de folículos pós-ovulatórios, folículos atresícos e a marcação para HSP70, caspase 3 e PCNA em ovários de peixes submetidos a estresse ambiental no rio São Francisco, região de Três Marias.

Em peixes, a apoptose tem sido estudada em alguns modelos biológicos incluindo desenvolvimento da retina, do sistema nervoso (CANDAL *et al.*, 2001; COLE & ROSS, 2001), brânquais (ROJO *et al.*, 1997), perda da visão em peixes de caverna (JEFFERY, 2001), diferenciação gonadal (UCHIDA, *et al.*, 2002) e espermatogênese (PRISCO *et al.*, 2003; CORRIERO *et al.*, 2007), foliculogênese (WOOD & Van Der KRAAK, 2001). No presente estudo, nós utilizamos como modelo experimental ovários em regressão após o período reprodutivo. Nessa fase, ocorre involução e degeneração de folículos pós-ovulatórios e folículos atresícos e os ovários remodelam sua estrutura para reiniciar um novo ciclo reprodutivo. Os folículos pós-ovulatórios são reabsorvidos rapidamente, ao passo que, os folículos atresícos necessitam de meses para serem removidos dos ovários (MIRANDA *et al.*, 1999; DRUMMOND *et al.*, 2000). Desde que os ovários de peixes sofrem extensivas remodelações durante o ciclo reprodutivo, então eles representam um excelente modelo para investigação dos eventos de proliferação e morte celular tanto quanto das relações da apoptose com moléculas de adesão, da matriz extracelular e fatores de crescimento em vertebrados não mamíferos.

Uma das características marcantes da apoptose é a fragmentação do DNA nas regiões internucleossômicas resultando em múltiplos de 180-200 pares de bases e padrão em escada na eletroforese em gel de agarose (KERR *et al.*, 1972). No nosso Laboratório, a apoptose foi identificada inicialmente por histologia e microscopia eletrônica (DRUMMOND *et al.*, 2000), em seguida através da reação de TUNEL *in situ* (SANTOS *et al.*, 2005) e confirmada posteriormente pelo gel de agarose (SANTOS *et al.*, 2008). Estes achados confirmam o envolvimento da apoptose na dinâmica ovariana pós-desova de peixes como também relatado para outros vertebrados.

Os folículos pós-ovulatórios são bioindicadores do sucesso reprodutivo também utilizados para determinar a frequência e tempo de desova em populações de peixes selvagens (STEQUERT *et al.*, 2003; SATO *et al.*, 2005). Os eventos morfológicos da regressão de folículos pós-ovulatórios são similares entre espécies incluindo *L. taeniatus* e *P. argenteus* (presente estudo), *A. bimaculatus* (DRUMMOND *et al.*, 2000) e *P. costatus* (THOMÉ *et al.*, 2006). A relação entre apoptose, atresia folicular e luteólise tem sido bem investigada em mamíferos (LUZ *et al.*, 2006; ROLAKI *et al.*, 2005). Em aves, a apoptose da granulosa exerce importante papel no recrutamento de folículos ovarianos para ovulação e na regressão dos folículos atrésicos e folículos pós-ovulatórios (TILLY *et al.*, 1991; MURDOCH *et al.*, 2005; SUNDARESAN *et al.*, 2008). Recentemente, analisando a regressão de ovários de duas espécies de peixes mantidas em confinamento, verificamos que, diferentemente dos mamíferos, a apoptose que é um evento tardio da atresia folicular, sugerindo que outros mecanismos incluindo a autofagia podem ser responsáveis pela eliminação dos folículos atrésicos (SANTOS *et al.*, submetido).

Em *P. argenteus*, o índice apoptótico das células foliculares atingiu seu pico máximo no 3º dia e diminuiu em seguida até o 5º dia pós-desova (SANTOS *et al.*, 2008). Achados similares foram também detectados em *L. taeniatus* (SANTOS *et al.*, 2005) e em *P. costatus* (THOMÉ *et al.*, 2006). Alta taxa de apoptose foi também detectada no 2º e 3º dia de regressão da glândula mamária pós-lactação em camundongo, diminuindo até o 8º dia de regressão (FAURE *et al.*, 2000). Em teleósteos, a apoptose pode ser desencadeada por estímulos fisiológicos e patológicos tais como impacto ambiental, alterações endócrinas, xenobióticos e ausência de fatores de crescimentos (JANZ *et al.*, 1997, 2001; LINARES-CASENAVE *et al.*, 2002; WEBER *et al.*, 2002; DREVNICK *et al.*, 2006). Em ovários de mamíferos, fatores de crescimentos tais como fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento de fibroblasto (FGF) ligam-se à matriz extracelular promovendo a sobrevivência dos folículos ovarianos (CHUN & HSUEH, 1998; RODGERS *et al.*, 2003). Na truta *Oncorhynchus mykiss*, tratamento de folículos ovarianos cultivados com EGF, gonadotrofinas e 17  $\beta$ -estradiol promoveu a supressão da apoptose das células da granulosa (JANZ & Van Der KRAAK, 1997). Em *Pagrus major*, fator de crescimento semelhante a insulina (IGF-I) mostrou-se aumentado durante a foliculogênese e diminuiu no período após desova (KAGAWA *et al.*, 1995). O papel dos fatores de crescimento e esteróides sexuais necessita ainda ser investigada na dinâmica da regressão ovariana pós-desova.

No presente trabalho, observou-se uma relação entre apoptose das células foliculares, alterações da membrana basal e marcação para integrina  $\beta 1$  e colágeno IV durante a involução dos folículos pós-ovulatórios de *P. argenteus* (SANTOS *et al.*, 2008). A membrana basal atuou como fator de sobrevivência para células epiteliais de glândula mamária de camundongos em cultura, uma vez que a perda de adesão célula a membrana basal desencadeou a morte celular (PULLAN *et al.*, 1996). Adicionalmente, em folículos atrésicos de mamíferos, a apoptose ocorreu inicialmente na camada de células da granulosa distal à membrana basal e a laminina pode estar exercendo um efeito protetor contra a apoptose da granulosa (AMSTERDAM *et al.*, 1998; Le BELLEGO *et al.*, 2005). Estudos *in vitro* demonstraram que a camada granulosa humana secreta colágeno IV, o qual regula a diferenciação celular via integrina  $\alpha 2\beta 1$  durante a formação do corpo lúteo (YAMADA *et al.*, 1999). Em ovários de primatas, a diminuição ou ausência de integrina  $\alpha 6\beta 1$  mostrou-se associada com o aumento da apoptose das células da granulosa em folículos atrésicos (GIEBEL *et al.*, 1996; GIEBEL & RUNE, 1997). Além disso, cultura de células da granulosa em meio rico em laminina induz a proliferação e o aumento da sobrevivência celular, sendo os eventos mediados por integrina  $\alpha 6\beta 1$  (Le BELLEGO *et al.*, 2005). Em conjunto, estes resultados indicam que moléculas de adesão e da membrana basal são importantes para a sobrevivência das células foliculares ou da granulosa em vertebrados, incluindo peixes.

A caspase 3 é a principal protease executora do programa apoptótico, a qual ativa endonucleases e é também responsável pela quebra de muitas proteínas estruturais citoplasmática conduzindo a alterações morfológicas típicas da apoptose (HUENTTERBRENNER *et al.*, 2003). Entretanto, existem também outras rotas apoptóticas independente de caspase tais como fator mitocondrial indutor da apoptose (AIF) e proteases não caspases tais como catepsinas, granzimas e endonuclease G, as quais podem induzir a apoptose dependente ou independente de caspases (ZHANG *et al.*, 2003). A caspase 3 é expressa em células luteínicas e tecais de corpo lúteo e também em células da granulosa de folículos atrésicos em mamíferos (HUSSEIN, 2005; LUZ *et al.*, 2006) e em folículos pós-ovulatórios em aves (SUNDARESAN *et al.*, 2008). Em *P. argenteus*, a imunoreatividade para caspase 3 foi identificada principalmente nas células foliculares dos folículos pós-ovulatórios durante a regressão pós-desova induzida (SANTOS *et al.*, 2008). Por outro lado, células foliculares dos folículos atrésicos não foram marcadas para caspase 3 durante a maior parte da regressão folicular, o que sugere que outras proteases podem ser ativadas. Membros da família de proteínas Bcl-2 controlam a rota apoptótica intrínseca e



estudos com zebrafish (*Danio rerio*) indicaram uma surpreendente similaridade com os membros da família Bcl-2 de mamíferos (KRATZ *et al.*, 2006). Enquanto os componentes da rota apoptótica intrínseca aparentemente existe em todos os metazoários, os componentes da rota apoptótica extrínseca são mais recentes no processo evolucionário, os quais promovem a apoptose em resposta a membros da superfamília dos receptores de necrose tumoral (TNF) (MARTIN & VUORI, 2004). A rota apoptótica extrínseca é desencadeada pelos ligantes Fas, os quais cooperam com a rota apoptótica intrínseca para acionar a apoptose tecidual durante a embriogênese de zebrafish (EIMON *et al.*, 2006). Embora as rotas da apoptose atuem em ovários de teleósteos, ainda não foram determinados os membros pró e anti-apoptóticos que regulam as vias de morte celular durante a regressão pós-ovulatória.

No presente trabalho, reação imunohistoquímica para PCNA foi detectada principalmente nas células tecais dos folículos atrésicos, ao passo que, células foliculares foram raramente marcadas (SANTOS *et al.*, 2008). Esses resultados sugerem baixa ou ausência de atividade mitótica nas células foliculares, uma vez que estas células hipertrofiam apresentando atividade fagocítica para reabsorção do vitelo e remanescente do ovócito durante a atresia folicular. O antígeno de proliferação celular (PCNA) tem sido utilizado como marcador de proliferação em ovários dos mamíferos (ISOBE & YOSHIMURA, 2000; HUTT *et al.*, 2006) e na espermatogênese de teleósteos (CORRIERO *et al.*, 2007), mas poucos estudos têm utilizado esta técnica em ovários de peixes (ORTEGO *et al.*, 1994; KORFSMEIER, 2002). Em zebrafish, a imunomarcação para PCNA aumentou durante a ovogênese, onde a reatividade ocorreu principalmente nas células foliculares durante a incorporação do vitelo (KORFSMEIER, 2002). Em mamíferos, a imunomarcação para PCNA reduziu nas células da granulosa e da teca durante a atresia folicular (FERANIL *et al.*, 2004; TOMÁNEK & CHRONOWSKA, 2006).

A relação entre HSP70 e apoptose foi reportada em alguns modelos incluindo ovários de *Cotostomus commersonii*, intestino posterior de *Salmo salar* (JANZ *et al.*, 1997, 2001; BAKKE-McKELLEP *et al.*, 2007) e na atresia folicular de duas espécies de peixes (presente trabalho). A imunoreatividade para HSP70 foi localizada nas células foliculares principalmente durante a atresia folicular avançada em ambas espécies do presente estudo (SANTOS *et al.*, submetido). Células intersticiais e ovócitos foram também reativos para HSP70 como também demonstrado durante a maturação ovariana em ouriço do mar (GERACI *et al.*, 2003). A forte marcação para HSP70 na atresia avançada observada no

presente estudo sugere um efeito protetor contra a apoptose folicular, com aumento da sobrevivência celular quando as células foliculares estão ativamente envolvidas na remoção do vitelo. Adicionalmente, a diminuição da marcação para HSP70 e o aumento da apoptose nas células foliculares contribui para a eliminação das células foliculares na fase final da atresia folicular.

A morte celular autofágica tem sido considerada com uma via alternativa de morte celular programada (tipo II) distinta da apoptose (BURSCH, 2001; LOCKSHIN & ZAKERI, 2004). Vacúolos autofágicos abundantes com organelas em degeneração precedendo o colapso nuclear são características da morte celular autofágica, que envolve proteases não caspases como as catepsinas responsáveis pela degradação e *turnover* de proteínas e organelas celulares (ASSUNÇÃO GUIMARÃES & LINDEN, 2004). No presente estudo, vacúolos autofágicos com organelas em degeneração foram abundantes nas células foliculares principalmente durante atresia avançada para ambas as espécies. Estas características sugerem que autofagia além de contribuir para o homeostase folicular nas fases iniciais da atresia pode ser responsável pela redução da massa celular na fase avançada da regressão folicular, antecedendo a apoptose que ocorre na atresia final. Similarmente, a autofagia contribui para uma eliminação mais eficiente de células em degeneração durante a ovogênese de insetos (NEZIS *et al.*, 2006; VELENTZAS *et al.*, 2007), na atresia folicular em aves (KOVACS *et al.*, 1992; D'HERDE *et al.*, 1996) e nas células da granulosa em humanos (DUERRSCHMIDT *et al.*, 2006). Alternativamente, alguns autores consideram a autofagia como uma estratégia de sobrevivência celular para obtenção de energia na ausência de nutrientes ou mecanismo de redução do volume celular em células destinadas a morte (LEVINE & YUAN, 2005). Portanto, autofagia e apoptose podem estar coexistindo durante a atresia folicular em teleósteos, tais como ocorre em ovários de inseto e aves. Entretanto, investigações são ainda necessárias para elucidar os mecanismos de atresia folicular em ovários de teleósteos.

Em relação ao estudo realizado no rio São Francisco (SANTOS *et al.*, em preparação), os parâmetros analisados no presente trabalho tais como folículos atrésicos, folículos pós-ovulatórios, HSP70, PCNA e apoptose, têm aplicabilidade em estudos de impacto ambiental em populações de peixes selvagens. O monitoramento da atividade reprodutiva de peixes nativos da bacia do rio São Francisco tem se mostrado essencial uma vez que a ictiofauna têm sido exposta frequentemente a diferentes tipos de agentes estressantes incluindo a construção de barragens e dejetos das atividades agroindustriais como tem ocorrido na região de Três Marias. Então, marcadores moleculares sensíveis que

afetam a função celular, incluindo os utilizados no presente trabalho, podem ter alguma utilidade em um futuro breve. A variabilidade genética de *P. argenteus* (HATANAKA *et al.*, 2006) pode justificar a sua capacidade de adaptação frente ao impacto da barragem de Três Marias e a sua utilização como provável espécie bioindicadora na bacia do rio São Francisco.

## **5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS DE ESTUDO**

## 5. CONCLUSÕES e PERSPECTIVAS DE ESTUDO

- A apoptose contribui para a regressão de folículos ovarianos de peixes após desova;
- Apoptose das células foliculares em folículos pós-ovulatórios de *P. argenteus* é dependente de caspases;
- A integridade da membrana basal, integrina  $\beta 1$  e colágeno IV é importante para a sobrevivência das células foliculares;
- Células foliculares proliferam durante o crescimento dos ovócitos de peixes;
- A proliferação da teca ocorre durante regressão dos folículos pós-ovulatórios e atrésicos;
- A autofagia e a apoptose participam sinergicamente da atresia folicular de peixes;
- HSP70 contribui para a proteção das células foliculares durante a maior parte da atresia folicular;
- O curimatã-pacu *P. argenteus* mostrou-se como um bom modelo para estudos de impacto ambiental na bacia do rio São Francisco.

### PERSPECTIVAS DE ESTUDO

Os peixes são bons modelos de estudo dos mecanismos de apoptose, em especial os ovários após desova que apresentam numerosos folículos em regressão. Assim estudos envolvendo fatores de crescimento durante desenvolvimento e regressão ovariana são promissores. Além disso, outros biomarcadores como as metalotioneínas são importantes nos estudos de contaminação ambiental por resíduos de metais pesados, em particular na região de Três Marias. Técnicas bioquímicas e de biologia molecular são excelentes métodos quantitativos que podem complementar os resultados da morfologia nos estudos de impacto ambiental.

## **6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

**6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- ABDELWAHID, E.; ERIKSSON, M.; PELLINIEMI, L.J.; JOKINEN, E.. Heat shock proteins, HSP25 and HSP70, and apoptosis in developing endocardial cushion of the mouse heart. *Histochemistry and Cell Biology*, v. 115, p. 95-104, 2001.
- AGOSTINHO, A.A.; MENDES, V.P.; SUZUKI, H.T.; CANZI, C.. Avaliação da atividade reprodutiva da comunidade de peixes dos primeiros quilômetros a jusante do reservatório de Itaipu. *Revista Unimar*, p. 175-189, 1993.
- AMSTERDAM, A.; DANTES, A.; HOSOKAWA, K.; SCHERE-LEVY, C.P.; KOTSUJI, F.; AHARONI, D.. Steroid regulation during apoptosis of ovarian follicular cells. *Steroids*, v. 63, p. 314-318, 1998.
- ANTONSSON, B.. Bax and other pro-apoptotic Bcl-2 family “killer-proteins” and their victim, the mitochondrion. *Cell and Tissue Research*, v. 306, p. 347-361, 2001.
- ASSUNÇÃO GUIMARÃES, C.; LINDEN, R.. Programmed cell death Apoptosis and alternative deathstyles. *European Journal of Biochemistry*, v. 271, p. 1638-1650, 2004.
- BAKKE-MCKELLEP, A.M.; PENN, M.H.; SALAS, P.M.; REFSTIE, S.; SPERSTAD, S.; LANDSVERK, T.; RINGØ, E.; KROGDAHL, A.. Effects of dietary soyabean meal, inulin and oxytetracycline on intestinal microbiota and epithelial cell stress, apoptosis and proliferation in the teleost Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *The British Journal of Nutrition*, v. 97, p. 699-713, 2007.
- BANGS, P.; FRANC, N.; WHITE, K.. Molecular mechanisms of cell death and phagocytosis in *Drosophila*. *Cell Death and Differentiation*, v. 7, p. 1027-1034, 2000.
- BASU, N.; TODGHAM, A.E.; ACKERMAN, P.A.; BIBEAU, M.R.; NAKANO, K.; SCHULTE, P.M.; IWAMA, G.K.. Heat shock protein genes and their functional significance in fish. *Gene*, v. 295, p. 173-183, 2002.
- BAXTER, R.M.. Environmental effects of dams and impoundments. *Annual Review of Ecology and Systematics*, v. 8, p. 255-283, 1977.
- BERKHOLTZ, C.B.; LAI, BE.; WOODRUFF, T.K.; SHEA, L.D.. Distribution of extracellular matrix protein type I collagen, type IV collagen, fibronectin, and laminin in mouse folliculogenesis. *Histochemistry and Cell Biology*, v. 126, p. 583-592, 2006.
- BESSEAU, L.; FALIEX, E.. Resorption of unemitted gametes in *Lithognathus mormyrus* (Sparidae, Teleostei): a possible synergic action of somatic and immune cells. *Cell and Tissue Research*, v. 276, p. 123-132, 1994.
- BLAZER, V.S.. Histopathological assessment of gonadal tissue in wild fishes. *Fish Physiology and Biochemistry*, v. 26, p. 85-101, 2002.

- BRAVO, R.; MCDONALD-BRAVO, H.. Existence of two populations of cyclin proliferating cell nuclear antigen during the cell-cycle-association with DNA-replication sites. *The Journal of Cell Biology*, v. 105, p. 1549-1554, 1987.
- BROMLEY, P. J.; RAVIER, C.; WITTHAMES, P. R.. The influence of feeding regime on sexual maturation, fecundity and atresia in first-time spawning turbot. *Journal of Fish Biology*, v. 56, p. 264-278, 2000.
- BURKE, R.D.. Invertebrate integrins: structure, function, and evolution. *International Review of Cytology*, v. 191, p. 257-284, 1999.
- BURSCH, W.. The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death. *Cell Death and Differentiation*, v. 8, p. 569-581, 2001.
- CANDAL, E.; ANADÓN, R.; CARUNCHO, H.; RODRÍGUEZ-MOLDES, I. Proliferation, cell death and reelin expression during development of the retina in teleost, common, trout (*Salmo trutta fario*). *International Journal of Development Biology*, v. 45, p. 69-70, 2001.
- CARNEVALI, O.; MARADONNA, F.. Exposure to xenobiotic compounds: looking for new biomarkers. *General and Comparative Endocrinology*, v. 131, p. 203-209, 2003.
- CARPENTER, C.M.; HOFFMAN, G.E.. Expression of 70kda heat shock proteins in Antarctic and New Zealand notothenioid fish. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part A, v. 125, p. 229-238, 2000.
- CÈRDA, J.; REIDENBACH, S.; PRATZEL, S.; FRANKE, W.W.. Cadherin-catenin complexes during zebrafish oogenesis: heterotypic junctions between oocytes and follicle cells. *Biology of Reproduction*, v. 61, p. 692-704, 1999.
- CHUN, S-Y.; HSUEH, A.J.W. Paracrine mechanisms of ovarian follicle apoptosis. *Journal of Reproductive Immunology*, v. 39, p. 63-75, 1998.
- COLE, L.K.; ROSS, L.S.; Apoptosis in the developing zebrafish embryo. *Developmental Biology*, v. 240, p. 123-142, 2001.
- CORRIERO, A.; DESANTIS, S.; BRIDGES, C.R.; KIME, D.E.; MEGALOFONO, P.; SANTAMARIA, N.; CIRILLO, F.; VENTRIGLIA, G.; DI SUMMA, A.; DEFLORIO, M.; CAMPOBASSO, F.; DE METRIO, G.. Germ cell proliferation and apoptosis during different phases of swordfish (*Xiphias gladius* L.) spermatogenic cycle. *Journal of Fish Biology*, v. 70, p. 83-99, 2007.
- COWARD, K.; BROMAGE, N.R.; Histological classification oocyte growth and the dynamics of ovarian recrudescence in *Tilapia zilli*. *Journal of Fish Biology*, v. 53, p. 285-302, 1998.
- CURRY, T.E.; OSTEEN, K.G.. The matrix metalloproteinase system: changes, regulation, and impact throughout the ovarian and uterine reproductive cycle. *Endocrine reviews* v. 24, p. 428-465, 2003.



- D'HERDE, K.; DE PREST, B.; ROELS, F.. Subtypes of active cell death in the granulosa of ovarian atretic follicles in the quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Reproduction, Nutrition, Development*, v. 36, p. 175-189, 1996.
- DREVNICK, P.E.; SANDHEINRICH, M.B.; ORIS, J.T.. Increased ovarian follicular apoptosis in fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to dietary methylmercury. *Aquatic Toxicology*, v. 79, p. 49-54, 2006.
- DRUMMOND, C.D.; BAZZOLI, N.; RIZZO, E.; SATO, Y. Postovulatory follicle: a model for experimental studies of programmed cell Death or apoptosis in teleosts. *Journal of Experimental Zoology*, v. 287, p. 176-182, 2000.
- DUERRSCHMIDT, N.; ZABIRNYK, O.; NOWICKI, M.; RICKEN, A.; HMEIDAN, F.A.; BLUMENAUER, V.; BORLAK, J.; SPANEL-BOROWSKI, K.. Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1-mediated autophagy in human granulosa cells as an alternative of programmed cell death. *Endocrinology*, v. 147, p. 3851-3860, 2006.
- DUQUE, A.B.; TAPHORN D.C.; WINEMILLER K.O. Ecology of the coporo, *Prochilodus mariae* (Characiformes, Prochilodontidae), and status of annual migrations in western Venezuela. *Environmental Biology of Fishes*, v. 53, p. 33-46, 1998.
- EIMON, P.M.; KRATZ, E.; VARFOLOMEEV, E.; HYMOWITZ, S.G.; STERN H.; ZHA, J.; ASHKENAZI, A.. Delineation of the cell-extrinsic apoptosis pathway in the zebrafish. *Cell Death and Differentiation*, v. 13, p. 1619-1630, 2006.
- FAURE, E.; HEISTERKAMP, N.; GROFFEN, J.; KAARTINEN, V.. Differential expression of TGF- $\beta$  isoforms during postlactational mammary gland involution. *Cell and Tissue Research*, v. 300, p. 89-95, 2000.
- FEDER, M.E.; HOFMANN, G.E.. Heat-shock proteins, molecular chaperones and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annual Reviews of Physiology*, v. 61, p. 243-282, 1999.
- FERANIL, J.B.; ISOBE, N.; NAKAO, T.. Cell proliferation in the atretic follicles of buffalo and cattle ovary. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 39, p. 405-409, 2004.
- GAYTÁN, F.; MORALES, C.; BELLIDO, C.; AGUILAR, E.; SÁNCHEZ-CRIADO, J.E.. Ovarian follicle macrophages: is follicular atresia in the immature rat a macrophage-mediated event? *Biology of Reproduction*, v.58, p.52-59, 1998.
- GAVRIELI, Y.; SHERMAN, Y.; Ben-SASSON, S.A.. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *Journal of Cell Biology*, v. 493-501, 1992.
- GERACI, F.; AGUELI, C.; GIUDICE, G.; SCONZO, G.. Localization of HSP70, Cdc2, and cyclin B in sea urchin oocytes in non-stressed conditions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 310, p. 748-753, 2003.

- GIANCOTTI, F.G.; RUOSLAHTI, E.. Integrin signaling. *Science*, v. 285, p. 1028-1032, 1999.
- GIEBEL, J.; DE SOUZA, P.; RUNE, G.M.. Expression of integrins in marmoset (*Callithrix jacchus*) ovary during folliculogenesis. *Tissue and Cell*, v. 28, p. 379-385, 1996.
- GIEBEL, J.; RUNE, G.M.. Relationship between expression of integrins and granulosa cell apoptosis in ovarian follicles of marmoset (*Callithrix jacchus*). *Tissue and Cell*, v. 29, p. 525-531, 1997.
- GILCREASE, M.Z.. Integrin signaling in epithelial cells. *Cancer Letters*, v. 247, p. 1-25, 2007.
- GOODLETT, C.R.; HORN, K.H.. Mechanisms of alcohol-induced damage to the developing nervous system. *Alcohol Research and Health*, v. 25, p. 175-184, 2001.
- GRIER, H.J.; URIBE, M.C.; PARENTI, L.R.. Germinal epithelium, folliculogenesis, and postovulatory follicles in ovaries of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1972) (Teleostei, Protacanthopterygii, Salmoniformes). *Journal of Morphology*, v. 268, p. 293-310, 2007.
- GROSSMANN, J.. Molecular mechanisms of “detachment-induced apoptosis-Anoikis”. *Apoptosis*, v. 7, p. 247-260, 2002.
- GRUBERT, M.A. RITAR, A.J.. The effect of temperature and conditioning interval on the spawning success of wild-caught blacklip (*Haliotis rubra*, Leach 1814) and greenlip (*H. laevigata*, Donovan 1808) abalone. *Aquaculture Research*, v. 36, p. 654-665, 2005.
- GUIMARÃES, E.B.; VASCONCELOS, A.C.; MARTINS, N.R.S.; OLIVEIRA, R.F.M.; MORO, L.; NUNES, J.E.S.; SANTOS, F.G.A.. Porcentagem de parênquima e índice apoptótico da bolsa cloacal em frangos de corte em ambiente de conforto e estresse térmico. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 55, p. 178-186, 2003.
- HABIBI, H.R.; ANDREU-VIEYRA, C.V. Hormonal regulation of follicular atresia in teleost fish. In *The fish oocyte: from basic studies to biotechnology applications* (BABIN, P.J.; CERDÀ, J.; LUBZENS, E., eds), pp. 235-253, 2007. Springer.
- HATANAKA, T.; HENRIQUE-SILVA, F.; GALETTI, P.M., JR. Population substructuring in a migratory freshwater fish *Prochilodus argenteus* (Characiformes, Prochilodontidae) from the Sao Francisco River. *Genetica*, v. 126, p. 153-159, 2006.
- HONDA, T.; FUJIWARA, H.; YAMADA, S.; FUJITA, K.; NAKAMURA, K.; NAKAYAMA, T.; HIGUCHI, T.; UEDA, M.; MAEDA, M.; MORI, T.. Integrin  $\alpha 5$  is expressed on human luteinizing granulosa cells during corpus luteum formation, and

- its expression is enhanced by human chorionic gonadotropin *in vitro*. *Molecular Human Reproduction*, v. 3, p. 979-984, 1997.
- HSU, S.Y.; & HSUEH, A.J.W.. Tissue-specific Bcl<sub>2</sub> proteins partners in apoptosis: an ovarian paradigm. *Physiological Reviews*, v. 80 p.593-614, 2000.
- HSUEH, A.J.W.; BILLIG, H.; TSAFRIRI, A. Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocrine Reviews*, v. 15, p.707-724, 1994.
- HUETTENBRENNER, S.; MAIER, S.; LEISSER, C.; POLGAR, D.; STRSSER, S.; GRUSCH, M.; KRUPITZA, G.. The evolution of cell death programs as prerequisites of multicellularity. *Mutation Research*, v. 7705, p. 1-15, 2003.
- HUGHES, F.M.; GOROSPE, W.C. Biochemical identification of apoptosis (programmed cell death) in granulosa cells evidence for a potential mechanism underlying follicular atresia. *Journal of Endocrinology*, v. 129, 2415-2422, 1991.
- HUGHES, A.L.. Evolution of the integrin  $\alpha$  and  $\beta$  protein families. *Journal of Molecular Evolution*, v. 52, p. 63-72, 2001.
- HUSSEIN, M.R.; Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. *Human Reproduction Update*, v. 11 p. 162-178, 2005.
- HUTT, K.J.; MCLAUGHLIN, E.A.; HOLLAND, M.K.. Primordial follicle activation and follicular development in the juvenile rabbit ovary. *Cell and Tissue Research*, v. 326, p. 809-822, 2006.
- HUYNH, M-LN.; MALCOLM, K.C.; KOTARU, C.; JOHN, A.; TILSTRA, J.A.; WESTCOTT, J.Y.; FADOK, V.A.; WENZEL, SE.. Defective apoptotic cell phagocytosis attenuates prostaglandin E2 and 15-hydroxyeicosatetraenoic acid in severe asthma alveolar macrophages. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 172, p. 972-979, 2005.
- HYNES, R.O.. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*, v. 69, p. 11-25, 1992.
- IRVING-RODGERS, H.F.; RODGERS, R.J.. Extracellular matrix in ovarian follicular development and disease. *Cell and Tissue Research*, v. 322, p. 89-98, 2005.
- ISAAC-NAHUM, V.J., CARDOSO, R.D., SERVO, G.; ROSSI-WONGTSCHOWSKI, C. L.B.. Aspect of the spawning biology of the Brazilian sardine, *Sardinella brasiliensis* (Steindachner, 1879), (Clupeidae). *Journal of Fish Biology*, v. 32, p. 383-396, 1988.
- ISHIGURO, K.; KOJIMA, T.; TAGUCHI, O.; SAITO, H.; MURAMATSU, T.; KADOMATSU, K. Syndecan-4 expression is associated with follicular atresia in mouse ovary. *Histochemistry Cell Biology*, v.112, p. 25-33, 1999.
- ISOBE, N.; YOSHIMURA, Y.. Immunocytochemical study of cell proliferation in the cystic ovarian follicles in cows. *Theriogenology*, v. 54, p. 1159-1169, 2000.

- IWAMA, G.K.; THOMAS, P.T.; FORSYTH, R.B.; VIJAYAN, M.M.. Heat shock protein expression in fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, v. 8, 35-56, 1998.
- IWAMA, G.K.; AFONSO, L.O.; TODGHAM, A.; ACKERMAN, P.; NAKANO, K.. Are HSPs suitable for indicating stressed states in fish? *The Journal of Experimental Biology*, v. 207, p. 15-19, 2004.
- JANZ, D.M.; Van Der KRAAK, G.. Suppression of apoptosis by gonadotropin, 17 $\beta$ -estradiol, and epidermal growth factor in rainbow trout preovulatory ovarian follicles. *General and Comparative Endocrinology*, v. 105, p. 186-193, 1997.
- JANZ, D.M.; McMASTER, M.E.; MUNKITTRICK, K.R.; Van Der KRAAK, G. Elevated ovarian follicular apoptosis and heat shock protein-70 expression in white sucker exposed to bleached kraft pulp mill effluent. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 147, p. 391-398, 1997.
- JANZ, D.M.; McMASTER, M.E.; WEBER, L.P.; MUNKITTRICK, K.R.; KRAAK, G.V.D.. Recovery of ovary size, follicle cell apoptosis, and HSP70 expression in fish exposed to bleached pulp mill effluent. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, v. 58, p. 620-625, 2001.
- JEFFRERY, W.. Cavefish as a model system in evolutionary developmental biology. *Developmental Biology*, v. 231, p. 1-12, 2001.
- JOHNSON, A. L.. Intracellular mechanisms regulating cell survival in ovarian follicles. *Animal Reproduction Science*, v. 78, p. 185-201, 2003.
- JOHNSON, A. L.; BRIDGHAM, J. T.; WITTY, J. P.; TILLY, J. L.. Susceptibility of avian ovarian granulosa cells to apoptosis is dependent upon stage of follicular development and is related to endogenous levels of Bcl-x long gene expression. *Endocrinology*, v. 137, p. 2059-2066, 1996.
- KAGAWA, H.; MORIYAMA, S.; KAWAUCHI, H.. Immunocytochemical localization of IGF-I in the ovary of the red seabream, *Pagrus major*. *General and Comparative Endocrinology*, v. 99, p. 307-315, 1995.
- KAIPIA, A.; HSUEH, J.W. Regulation of ovarian follicle atresia. *Annual Review of Physiology*, v. 59, p. 349-363, 1997.
- KAMANGA, L.J.; KAUNDA, E.; MTIMUNI, J.P.; MALUWA, A.O.; MFITILODZE, W.M.. Effect of temperature on oocyte development of *Oreochromis karongae* (Trewavas, 1941). *Journal of Applied Ichthyology*, v. 20, p. 139-145, 2004.
- KERR, J.F.R.; WILLIE, A.H.; CURRIE, A.R. Apoptosis: basis biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, v. 26, p. 239-257, 1972.

- KERR, J.F.; GOBE, G.C.; WINTERFORD, C.M.; HARMON, B.V.. Anatomical methods in cell death. *Methods in Cell Biology*, v. 46, p. 1-27, 1995.
- KHANDOKER, M.A.; IMAI, K.; TAKAHASHI, T.; HASHIZUME, K.. Role of gelatinase on follicular atresia in the bovine ovary. *Biology of Reproduction*, v.65, p. 726-732, 2001.
- KIM, E.K.; PARK, J.D.; SHIM, S.Y.; KIM, H.S.; KIM, B.I.; CHOI, J.H.; KIM, J.E.. Effect of chronic hypoxia on proliferation, apoptosis, and HSP70 expression in mouse bronchiolar epithelial cells. *Physiological Research*, v. 55, p. 405-411, 2006.
- KITANA, N.; WON, S.J.; CALLARD, I.P.. Reproductive deficits in male freshwater turtle *Chrysemys picta* from Cape Cod, Massachusetts. *Biology of Reproduction*, v. 76, p. 346-352, 2007.
- KORFSMEIER, K.H.. PCNA in the ovary of zebrafish (*Brachydanio rerio*, Ham.-Buch.). *Acta Histochemica*, v. 104, p. 73-76, 2002.
- KOVACS, J.; FORGÓ, V.; PÉCZELY, P.. The fine structure of the follicular cells in growing and atretic ovarian follicles of the domestic goose. *Cell and Tissue Research*, v. 267, p. 561-569, 1992.
- KRATZ, E.; EIMON, P.M.; MUKHYALA, K.; STERN, H.; ZHA, J.; STRASSER, A.; HART, R.; ASHKENAZI, A.. Functional characterization of the *Bcl-2* gene family in the zebrafish. *Cell Death and Differentiation*, v. 13, p. 1631-1640, 2006.
- KURKI, P.; OGATA, K.; TAN, E.M.. Monoclonal-antibodies to proliferating cell nuclear antigen (PCNA) cyclin as probes for proliferating cells by immunofluorescence microscopy and flow-cytometry. *Journal of Immunological Methods*, v. 109, p. 49-59, 1988.
- LANG, I. Electron microscopic and histochemical study of the postovulatory follicles of *Perca fluviatilis* L. (Teleostei). *General and Comparative Endocrinology*, v. 45, p. 219-233, 1981a.
- LANG, I. Electron microscopic and histochemical investigations of the atretic oocyte of *Perca fluviatilis* L. (Teleostei). *Cell and Tissue Research*, v. 220, p. 201-212, 1981b.
- Le BELEGO, F.; PISSELET, C.; HUET, C.; MONGET, P.; MONNIAUX, D.. Laminin- $\alpha 6\beta 1$  integrin interaction enhances survival and proliferation and modulates steroidogenesis of ovine granulosa cells. *Journal of Endocrinology*, v. 172, p. 45-59, 2002.
- Le BELEGO, F.; FABRE, S.; PISSELET, C.; MONNIAUX, D.. Cytoskeleton reorganization mediates  $\alpha 6\beta 1$  integrin-associated actions of laminin on proliferation and survival, but not on steroidogenesis of ovine granulosa cells. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v. 3, p.19-35, 2005.

- LEIST, M.; JÄÄTTELÄ, M. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 2, p. 589-598, 2001.
- LEONARDO, A.F.G.; ROMAGOSA, E.; BATLOUNI, S.R.. Occurrence and significance of ovarian and follicular regression in cachara *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus, 1766): a histology approach. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 58, p. 831-840, 2006.
- LEVINE, B.; YUAN, J.. Autophagy in cell death: an innocent convict? *The Journal of Clinical Investigation*, v. 115, p. 2679-2688, 2005.
- LIEBERMAN, J. The ABCS of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nature Reviews Immunology*, v. 3, p. 361-370, 2003.
- LIEBERMAN, J.; FAN, Z. Nuclear war: the granzyme A-bomb. *Current Opinion in Immunology*, v. 15, p. 553-559, 2003.
- LINARES-CASENAVE, J.; VAN EENENNAAM, J.P.; DOROSHOV, S.I.. Ultrastructural and histological observations on temperature-induced follicular ovarian atresia in the white sturgeon. *Journal of Applied Ichthyology*, v. 18, p. 382-390, 2002.
- LOCKSHIN, R.A.; ZAKERI, Z.. Apoptosis, autophagy, and more. *The international Journal of Biochemistry and Cell Biology*, v. 36, p. 2405-2419, 2004.
- LOUMBOURDIS, N.S.. Hepatotoxic and nephrotoxic effects of cadmium in the frog *Rana ridibunda*. *Archives of Toxicology*, v. 79, p. 434-440, 2005.
- LUTTON, B.; CALLARD, I. Evolution of reproductive-immune interactions. *International Comparative Biology*, v.46, p. 1060-1071, 2006.
- LUZ, M.R.; CESÁRIO, M.D.; BINELLI, M.; LOPES, M.D.. Canine corpus luteum regression: apoptosis and caspase-3 activity. *Theriogenology*, v. 66, p. 1448-1453, 2006.
- MAKRIGIANNAKIS, A.; COUKOS, G.; CHRISTOFIDOU-SOLOMIDOU, M.; GOUR, B.J.; RADICE, G.L.; BLASCHUK, O.; COUTIFARIS, C.. N-cadherin-mediated human granulosa cell adhesion prevents apoptosis. *American Journal of Pathology*, v. 154, p. 1391-1406, 1999.
- MAKRIGIANNAKIS, A.; COUKOS, G.; BLASCHUK, O.; COUTIFARIS, C.. Follicular atresia and luteolysis evidence of a role for N-Cadherin. *Annals New York Academy of Sciences*, v. 900, p. 46-55, 2000.
- MARTIN, S.S.; VUORI, K.. Regulation of Bcl-2 proteins during anoikis and amorphosis. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1692, p. 145-157, 2004.

- MATSUI, H.; OGIWARA, K.; OHKURA, R.; YAMASHITA, M.; TAKAHASHI, T.. Expression of gelatinases A and B in the ovary of the medaka fish *Oryzias latipes*. *European Journal of Biochemistry*, v. 267, p.4658-4667, 2000.
- MATTSON, M.P. Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v.1, p. 120-128, 2000.
- MIRANDA, A.C.L.; BAZZOLI, N.; RIZZO, E.; SATO, Y. Ovarian follicular atresia in two teleost species: a histological and ultrastructural study. *Tissue and Cell*, v.31, p. 480-488, 1999.
- MIGLIARINI, B.; CAMPISIS, A.M.; MARADONNA, F.; TRUZZI, C.; ANNIBALDI, A.; SCARPONI, G.; CARNEVALI, O.. Effects of cadmium exposure on testis apoptosis in marine teleost *Gobius niger*. *General and Comparative Endocrinology*, v. 142, p. 241-247, 2005.
- MORO, L.; MARTINS, A.S.; ALVES, C.M.; SANTOS, F.G.A.; NUNES, J.E.S.; CARNEIRO, R.A.; CARVALHO, R.; VASCONCELOS, A.C.. Apoptosis in canine distemper. *Archives of Virology*, v. 148, p. 153-164, 2003.
- MOSSER, D.D.; CARON, A.W.; BOURGET, L.; DENIS-LAROSE, C.; MASSIE, B.. Role of the human heat shock protein HSP70 in protection against stress-induced apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*, v. 17, p. 5317-5327, 1997.
- MURDOCH, W.J.; VAN KIRK, E.A.; ALEXANDER, B.M.. DNA damages in ovarian surface epithelial cells of ovulatory hens. *Experimental Biology and Medicine* (Maywood), v. 230, p. 429-433, 2005.
- NAKASHIMA, S.; IWAMATSU, T.. Ultrastructural changes in micropylar cells and formation of the micropyle during oogenesis in the medaka *Oryzias latipes*. *Journal of Morphology*, v. 202, p. 339-349, 1989.
- NAGAHAMA, Y.. The functional morphology of teleost gonads. In: *Fish Physiology*, V. IX: Reproduction, part A. (HOAR, W.S., RANDALL, D.J., DONALDSON, E.M., Eds.). p. 223-276, 1983. New York, Academic Press.
- NAHUM, R.; BEYTH, Y.; CHUN, S-Y.; HSUEH, A. J.W.; TSAFRIRI, A. Early onset of deoxyribonucleic acid fragmentation during atresia of preovulatory ovarian follicles in rats. *Biology of Reproduction*, v. 55, p. 1075-1080, 1996.
- NEZIS, I.P.; STRAVOPODIS, D.J.; PAPASSIDERI, I.; NICLOUD-ROBERT, M.; MARGARITIS, L.H.. Dynamics of apoptosis in the ovarian follicle cells during the late stages of *Drosophila* oogenesis. *Cell and Tissue Research*, v. 307, p. 401-409, 2002.
- NEZIS, I.P.; STRAVOPODIS, D.J.; MARGARITIS, L.H.; PAPASSIDERI, I.S.. Programmed cell death of follicular epithelium during the late developmental stages of oogenesis in the fruit flies *Bactrocera oleae* and *Ceratitidis capitata* (Diptera,

- Tephritidae) is mediated by autophagy. *Development, Growth and Differentiation*, v. 48, p. 189-198, 2006.
- OGIWARA, K.; TAKANO, N.; SHINOHARA, M.; MURAKAMI, M.; TAKAHASHI, T.. Gelatinase A and membrane-type matrix metalloproteinases 1 and 2 are responsible for follicle rupture during ovulation in the medaka. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 102, p. 8442-8447, 2005.
- ORTEGO, L.S.; HAWKINS, W.E.; WALKER, W.W.; KROL, R.M.; BENSON, W.H.. Detection of proliferating cell nuclear antigen in tissues of three small fish species. *Biotechnic and Histochemistry*, v. 69, p. 317-323, 1994.
- OLIVEIRA-JUNIOR, Ramon Lamar. *Análise comparativa da reprodução do mandi-amarelo, *Pimelodus maculatus*, Lacépède, 1803 (Pisces, Pimelodidae), em dois trechos do rio São Francisco*. 2002. 43f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) – Instituto de Ciências Biológicas – Departamento de Morfologia – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais.
- PARCELLIER, A.; GURBUXANI, S.; SCHMITT, E.; SOLARY, E.; GARRIDO, C. Heat shock proteins, cellular chaperones that modulate mitochondrial cell death pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications* v.304, p. 505-512, 2003.
- PARKINSON, D.; PHILIPPART, J.C.; BARAS, E.. A preliminary investigation of spawning migrations of grayling in a small stream as determined by radio-tracking. *Journal of Fish Biology*, v. 55, p. 172-182, 1999.
- PELICICE, F.M.; AGOSTINHO, A.A.. Fish-passage facilities as ecological traps in large neotropical rivers. *Conservation Biology*, v. 22, p. 180-188, 2008.
- PENALOZA, C.; LIN, L.; LOCKSHIN, R.A.; ZAKERI, Z.. Cell death in development: shaping the embryo. *Histochemistry and Cell Biology*, v. 126, p. 149-158, 2006.
- PIECHOTTA, G.; LACORN, M.; LANG, T.; KAMMANN, U.; SIMAT, T.; JENKE, H-S.; STEINHART, H.. Apoptosis in Dab (*Limanda limanda*) as possible new biomarker for anthropogenic stress, *Ecotoxicology and Environment Safety*, v. 42, p. 50-56, 1999.
- PINKSE, G.G.M.; VOORHOEVE, M.P.; NOTEBORN, M.; TERPSTRA, O.T.; BRUIJN, J.A.; HEER, E.. Hepatocyte survival depends on  $\beta$ 1-integrin-mediated attachment of hepatocytes to hepatic extracellular matrix. *Liver International*, v. 24, p. 218-226, 2004.
- PRISCO, M.; LIGUORO, A.; COMITATO, R.; CARDONE, A.; D'ONGHIA, B.; RICCHIARI, L.; ANGELINI, F.; ANDREUCCI, P.. Apoptosis during spermatogenesis in the spotted ray *Torpedo marmorata*. *Molecular Reproduction and Development* v. 64, p. 341-348, 2003.



- PULLAN, S.; WILSON, J.; METCALFE, A.; EDWARDS, G.M.; GOBERDHAN, N.; TILLY, J.; HICKMAN, J.A.; DIVE, C.; STREULI, C.H.. Requirement of basement membrane for the suppression of programmed cell death in mammary epithelium. *Journal of Cell Science*, v. 109, p. 631-642, 1996.
- RIEUX-LAUCAT, F.; FISCHER, A.; Le DEIST, F.. Cell-death signaling human disease. *Current Opinion in Immunology*, v. 15, p. 325-331, 2003.
- RIZZO, E.; BAZZOLI, N.. Oogenesis, oocyte surface and micropylar apparatus of *Prochilodus affinis* Reinhardt, 1874 (Pisces, Characiformes). *European Archives of Biology*, v. 104, p. 1-6, 1993.
- RIZZO, E.; BAZZOLI, N. Follicular atresia in curimatá-pioa *Prochilodus affinis* Reinhardt, 1874 (Pisces, Characiformes). *Revista Brasileira de Biologia*, v. 55, p.697-703, 1995.
- RIZZO, E.; SATO, Y.; BARRETO, B. P.; GODINHO, H. P.. Adhesiveness and surface patterns of eggs in neotropical freshwater teleosts. *Journal of Fish Biology*, v. 61, p. 615-632, 2002.
- RIZZO, E.; GODINHO, H.P.; SATO, Y.. Short-term storage of oocytes from the neotropical teleost fish *Prochilodus marggravii*. *Theriogenology*, v. 60, p. 1059-1070, 2003.
- ROBERTSON, J.D.; ORRENIUS, S.. Molecular mechanisms of apoptosis induced by cytotoxic chemicals. *Critical Reviews in Toxicology*, v. 30, p. 609-627, 2000.
- RODGERS, R.J.; IRVING-RODGERS, H.F.; RUSSELL, D.L.. Extracellular matrix of the developing ovarian follicle. *Reproduction*, v. 126, p. 415-424, 2003.
- ROJO, M. C.; BLÁNQUEZ, M. J.; GONZÁLEZ, M. E. Ultrastructural evidence for apoptosis of pavement cells, chloridae cells, and hatching gland cells in the developing brachial area of the trout *Salmo trutta*. *Journal of Zoology, London*, v. 243, p. 637-651, 1997.
- ROLAKI, A.; DRAKAKIS, P.; MILINGOS, S.; LOUTRADIS, D.; MAKRIGIANNAKIS, A.. Novel trends in follicular development, atresia and corpus luteum regression: role for apoptosis. *Reproduction BioMedicine Online*, v. 11, p. 93-103, 2005.
- ROMAGOSA, Elizabeth. *Mudanças morfológicas (microscopia de luz e eletrônica) das gônadas de pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg) durante o ciclo reprodutivo, em condições de confinamento*. 1991. 177f. Dissertação (Mestrado em Zoologia) - Universidade Estadual Paulista UNESP, Rio Claro.
- RUHL, M.; SAHIN, E.; JOHANNSEN, M.; SOMASUNDARAM, R.; MANSKI, D.; RIECKEN, E.O.; SCHUPPAN, D.. Soluble collagen IV drives serum-starved fibroblasts through S phase and prevents apoptosis via down-regulation of bax. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 274, p. 34361-34368, 1999.

- SALVETTI, N.R.; GIMENO, E.J.; LORENTE, J.A.; ORTEGA, H.H.. Expression of cytoskeletal proteins in the follicular wall of induced ovarian cysts. *Cells Tissues Organs*, v. 178, p. 117-125, 2004.
- SANTOS, H.B.; RIZZO, E.; BAZZOLI, N.; SATO, Y.; MORO, L.. Ovarian regression and apoptosis in the South American teleost *Leporinus taeniatus* Lutken (Characiformes, Anostomidae) from the São Francisco Basin. *Journal of Fish Biology*, v. 67, p. 1446-1459, 2005.
- SANTOS, H.B.; SATO, Y.; MORO, L.; BAZZOLI, N.; RIZZO, E.. Relationship among follicular apoptosis, integrin  $\beta_1$  and collagen type IV during early ovarian regression in the teleost *Prochilodus argenteus* after induced spawning. *Cell and Tissue Research*, v. 332, p. 159-170, 2008.
- SAIDAPUR, K.S. Follicular atresia in the ovaries of nonmammalian vertebrates. *International Review of Cytology*, v. 54, p. 225-244, 1978.
- SAIDAPUR, K.S. Structure and function of postovulatory follicles (corpora lutea) in the ovaries of nonmammalian vertebrates. *International Review of Cytology*, v. 75, p. 243-285, 1982.
- SATO, Y.; CARDOSO, E.L.; GODINHO, A.L.; GODINHO, H.P. Hypofisation parameters of the fish *Prochilodus marggravii* obtained in routine hatchery station conditions. *Revista Brasileira de Biologia*, v. 56, p. 59-64, 1996.
- SATO, Y.; & GODINHO, H.P.. Peixes da bacia do rio São Francisco. In: Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais, (LOWE McCONNEL, R.H. ed) Parte V: Brasil. p. 401-413, 1999. EDUSP. São Paulo.
- SATO, Y.; FENERICH-VERANI, N.; NUÑER, A. P. O.; GODINHO, H. P.; VERANI, J. R. Padrões reprodutivos de peixes da bacia do São Francisco. In *Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais* (GODINHO, H. P.; GODINHO, A. L., eds), pp. 224–268, 2003a.. Belo Horizonte: PUC Minas.
- SATO, Y.; FENERICH-VERANI, N.; GODINHO, H. P.. Reprodução induzida de peixes da bacia do São Francisco. In *Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais* (GODINHO, H. P.; GODINHO, A. L., eds), pp. 275–289, 2003b. Belo Horizonte: PUC Minas.
- SATO, Y.; GODINHO, H.P.. Migratory fishes of the São Francisco River. In: *Migratory fishes of South America* (CAROLSFELD, J.; HARVEY, B.; ROSS, C.; BAER, A. eds), pp. 195-232, 2003. IDRC and World Bank, Victoria Canada.
- SATO, Y.; BAZZOLI, N.; RIZZO, E.; BOSCHI, M.B. ; MIRANDA, M.O.T.. Influence of the Abaeté River on the reproductive success of the neotropical migratory teleost *Prochilodus argenteus* in the São Francisco River, downstream from the Três Marias dam, Southeastern Brazil. *River Research and Applications*, v. 21, p. 939-950, 2005.

- SELMAN, K.; WALLACE, R.A. Review cellular aspects of oocyte growth in teleost. *Zoological Science*, v. 6, p. 211-231, 1989.
- SHIMIZU, A. Effect of photoperiod and temperature on gonadal activity and plasma steroid levels in a eared stain of the mimmichog (*Fundulus heteroclitus*) during different phases of its annual reproductive cycle. *General Comparative Endocrinology*, 131: 310 – 324, 2003.
- SIMON, H-U.; ALAM, R. Regulation of eosinophil apoptosis: transduction of survival and death signals. *International Archives of Allergy and Immunology*, v. 118, p.7-14, 1999.
- SOVERCHIA, L.; CAROTTI, M.; ANDREU-VIEYRA, C.; MOSCONI, G.; CANNELLA, N.; HABIBI, H.; POLZONETTI-MAGNI, A.M.. Role of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in the regulation of gonadal differentiation in the gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Molecular Reproduction and Development*, v. 74, p. 57-67, 2007.
- SREEDHAR, A.S.; CSERMELY, P.. Heat shock proteins in the regulation of apoptosis: new strategies in tumor therapy a comprehensive review. *Pharmacology and Therapeutics*, v. 101, p. 227-257, 2004.
- STEQUERT, B.; MENARD, F.; MARCHAL, E.. Reproductive biology of *Vinciguerria nimbaria* in the equatorial waters of the eastern Atlantic Ocean. *Journal of Fish Biology*, v. 62, p. 1116–1136, 2003.
- SUNDARESAN, N.R.; SAXENA, V.K.; SASTRY, K.V.H.; ANISH, D.; SAXENA, M.; NAGARAJAN, K.; AHMED, K.A.. Nitric oxide: a possible mediator of ovulation and postovulatory follicle regression in chicken. *Animal Reproduction Science*, v. 101, p. 351-357, 2007.
- SUNDARESAN, N.R. SAXENA, V.K. SASTRY, K.V. ANISH, D. MARCUS LEO, M. D. KANTARAJA, C. SAXENA, M. AHMED, K.A. Caspase-mediated apoptosis in chicken postovulatory follicle regression. *Veterinary Research Communications*, v. 32, p. 13-19, 2008.
- SUQUET, M.; NORMANT, Y.; GAIGNON, J.L.; QUÉMÉNER, L.; FAUVEL, C.. Effect of water temperature on individual reproductive activity of Pollack (*Pollachius pollachius*). *Aquaculture*, v. 243, p. 113-120, 2005.
- SZOLTYS, M.; TABAROWSKI, Z.; PAWLIK, A. Apoptosis of postovulatory cummulus granulosa cells of the rat. *Anatomy Embryology*, v. 202, p. 523-529, 2000.
- THOMÉ, R.G.; SANTOS, H.B.; ARANTES, F.P.; PRADO, P.S.; DOMINGOS, F.F.T.; SATO, Y.; BAZZOLI, N.; RIZZO, E.. Regression of post-ovulatory follicles in *Prochilodus costatus* Valenciennes, 1850 (Characiformes, Prochilodontidae). *Brazilian Journal of Morphological Science*, v. 23, p. 495-500, 2006.

- THOMPSON, C.B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, v. 267, p. 1456-1462, 1995.
- TIBERIO, R.; MARCONI, A.; FILA, C.; FUMELLI, C.; PIGNATTI, M.; KRAJEWSKI, S.; GIANNETTI, A.; REED, J.C.; PINCELLI, C.; Keratinocytes enriched for stem cells are protected from anoikis via an integrin signaling pathway in a Bcl<sub>2</sub> dependent manner. *FEBS Letters*, v. 524, p. 139-144, 2002.
- TILLY, J.L.; KOWALSKI, K.I.; JOHNSON, A.L.; HSUEH, A. J.W. Involvement apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression. *Journal of Endocrinology*, v. 129, p. 2799-2801, 1991.
- TOMÁNEK, M.; CHRONOWSKA, E.. Immunohistochemical localization of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in the pig ovary. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, v. 44, p. 269-274, 2006.
- TVEITEN, H.; SCOTT, A.P.; JOHNSEN, H.K.. Plasma-sulfated C21-steroids increase during the periovulatory period in female common wolfish and are influenced by temperature during vitellogenesis. *General Comparative and Endocrinology*, v. 117, p. 464-473, 2000.
- TYLER, C.R.; SUMPTER, J.P.. Oocyte growth and development in teleost. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, v. 6, p. 287-318, 1996.
- TYURINA, Y.Y.; SHVEDOVA, A.A.; KAWAI, K.; TYURIN, V.A.; KOMMINENI, C.; QUINN, P.J.; SHOR, N.F.; FABISIAK, J.P.; KAGAN, V.E.. Phospholipid signaling in apoptosis: peroxidation and externalization of phosphatidylserine. *Toxicology*, v. 148, p. 93-101, 2000.
- UCHIDA, D.; YAMASHITA, M.; KITANO, T.; IGUCHI, T. Oocyte apoptosis during the transition from ovary-like tissue to testes during sex differentiation of juvenile zebrafish. *The Journal of Experimental Biology*, v. 205, p. 711-718, 2002.
- Van Der FLIER, A.; SONNENBERG, A.. Function and interactions of integrins. *Cell and Tissue Research*, v. 305, p. 285-298, 2001.
- VELENTZAS, A.D.; NEZIS, I.P.; STRAVOPODIS, D.J.; PAPASSIDERI, I.S.; MARGARITIS, L.H.. Mechanisms of programmed cell death during oogenesis in *Drosophila virilis*. *Cell and Tissue Research*, v. 327, p. 399-414, 2007.
- WEBER, L.P.; JANZ, D.M. Effect of β-naphthoflavone and dimethylbenz[a]anthracene on apoptosis and HSP70 expression in juvenile channel catfish (*Ictalurus punctatus*) ovary. *Aquatic Toxicology*, v. 54, p. 39-50, 2001.
- WEBER, L.P.; KIPARISSIS, Y.; HWANG, G.S.; NIIMI, A.J.; JANZ, D.M.; METCALFE, C.D. Increased cellular apoptosis after chronic aqueous exposure to nonylphenol and quercetin in adult medaka (*Oryzias latipes*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, v. 131, p. 51-59, 2002.

- WILLIAMS, K.; SCHWARTZ, A.; COREY, S.; ORANDLE, M.; KENNEDY, W.; THOMPSON, B.; ALVAREZ, X.; BROWN, C.; GARTNER, S.; LACKNER, A.. Proliferating cellular nuclear antigen expression as a marker of perivascular macrophages in simian immunodeficiency virus encephalitis. *American Journal of Pathology*, v. 161, p. 575-585, 2002.
- WOOD, A.W.; Van Der KRAAK, G.. Apoptosis and ovarian function: novel perspectives from the teleosts. *Biology of Reproduction*, v. 64, p. 264-271, 2001.
- WOOD, A.W.; Van Der KRAAK, G.. Inhibition of apoptosis in vitellogenic ovarian follicles of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by salmon gonadotrophin, epidermal growth factor, and 17 $\beta$ -estradiol. *Molecular Reproduction and Development*, v. 61, p. 511-518, 2002.
- WOOD, A.W.; Van Der KRAAK, G. Yolk proteolysis in rainbow trout oocytes after serum-free culture: evidence for a novel biochemical mechanism of atresia in oviparous vertebrates. *Molecular Reproduction and Development*, v. 65, p. 219-227, 2003.
- WOOLVERIDGE, I.; BOER-BROUWER, M.; TAYLOR, M.F.; TEERDS, K.J.; WU, F.C.W.; MORRIS, I.D. Apoptosis in the Rat Spermatogenic Epithelium following androgen withdrawal: changes in apoptosis-related genes. *Biology of Reproduction*, v. 60, p. 461-478, 1999.
- WOYNAROVICH, E.; HORVÁTH, L.. The artificial propagation of warm-water finfishes - a manual for extension. FAO Fisheries Technical Paper, 1980.
- WYLLIE, A.H.; KERR, J.F.R.; CURRIE, A.R. Cell Death: the significance of apoptosis. *International Review of Cytology*, v. 68, p. 251-306, 1980.
- YAMADA, S.; FUJIWARA, H.; HONDA, T.; HIGUCHI, T.; NAKAYAMA, T.; INOUE, T.; MAEDA, M.; FUJII, S.. Human granulosa cells express integrin  $\alpha_2$  and collagen type IV: possible involvement of collagen type IV in granulosa cells luteinization. *Molecular Human Reproduction*, v. 5, p. 607-617, 1999.
- YOO, J.L.; JANZ, D.M.. Tissue-specific HSP70 levels and reproductive physiological responses in fish inhabiting a metal-contaminated Creek. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 45, p. 110-120, 2003.
- YU HSU, S.; HSUEH, A.J.W.. Intracellular mechanisms of ovarian cell apoptosis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 145, p. 21-25, 1998.
- ZHAN, M.; ZHAO, H.; HAN, Z.C.. Signalling mechanisms of anoikis. *Histology and Histopathology*, v. 19, p. 973-983, 2004.
- ZHANG, J-H.; ZHANG, Y.; HERMAN, B.. Caspases, apoptosis and aging. *Ageing Research Reviews*, v. 2, p. 357-366, 2003.

ZHANG, Z.; VUORI, K.; REED, J.C.; RUOSLAHTI, E.. The  $\alpha 5\beta 1$  integrin supports survival of cells on fibronectin and up-regulates Bcl<sub>2</sub> expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 92, p. 6161-6165, 1995.

ZIMMERMANN, K.C.; BONZON, C.; GREEN, D.R. The machinery of programmed cell death. *Pharmacology and Therapeutics*, v. 92, p. 57-70, 2001.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)