

Ativação e fecundação do oócito de mamíferos

Fertilization and Oocyte Activation in Mammalians

FERNANDO A. SOUZA

Médico veterinário, MSc, PhD, Universidade Estadual de Maranhão. Bolsista PNPD, São Luís, Maranhão, Brasil
femedvet@yahoo.com.br

JAIR PÉREZ OSORIO

Médico veterinário e zootecnista, MSc, PhD. Professor associado, Faculdade de Ciências Agropecuárias, Universidade de La Salle, Bogotá, Colômbia
jairperez@unisalle.edu.co

JOSÉ ALBERTO CARDONA ÁLVAREZ

Médico veterinário e Zootecnista, Esp, MSc. Docente, Universidade de Córdoba, Colômbia
cardonalvarez@hotmail.com

RAFAEL JOSÉ OTERO ARROYO

Médico veterinário e zootecnista, MSc, PhD
reproductionmvz@hotmail.com

LILIANA CHACÓN JARAMILLO

Médica veterinária, MSc, PhD. Professora associada, Universidade de La Salle, Bogotá, Colômbia
lchacon@unisalle.edu.co

JOSÉ CARLOS GONZÁLEZ CUELLO

Médico veterinário e zootecnista, especialista em Produção Bovina Tropical. Candidato a Mestrado em Reprodução Animal, Universidade de Córdoba, Colômbia
josegonzalez_22@hotmail.com

RESUMO

O oócito, no momento da ovulação, encontra-se circundado pela zona pelúcida (ZP), e mais externamente pela corona radiata e por células do cumulus oophorus, que são impregnadas com progesterona e são capazes de desencadear o estímulo para a reação acrossomal em uma pequena população de espermatozoides que possuam o receptor para este hormônio. O espermatozoide precisa atravessar o cumulus oophorus e as células foliculares da corona radiata para que possa atingir a ZP e, assim, interagir com o oócito previamente a penetração. A penetração da ZP é um dos processos vitais da fecundação, desta maneira, espermatozoides incapazes de reconhecer e se ligar as glicoproteínas da ZP não obtém êxito na fecundação. O reconhecimento do gameta e as próximas interações são realizadas por ligações (proteína-carboidrato) com os receptores da ZP, que ativam o sinal para a excitose acrossomal por

RECEBIDO: 21/08/2013. APROVADO: 17/01/2014

— Como citar este artigo: Souza, F. A., Pérez, J., Cardona, J. A., Otero, R. J., Chacón, L. & González, J. C. (2014). Ativação e fecundação do oócito de mamíferos. *Revista Ciencia Animal* (7), 43-57.

reações de fosforilação/desfosforilação. A interação entre a estrutura da ZP e o espermatozoide capacitado, conjuntamente à apresentação das cadeias de oligossacarídeos pode iniciar a formação de um complexo receptor multimérico dentro da membrana espermática, mediada por íons cálcio. A esse complexo, são agregadas moléculas sinalizadoras que ativam a cascata da reação acrossômica, levando assim à penetração da zona pelúcida, a fusão com o oócito e, na sequência, a fecundação.

Palavras chave: cálcio, reação acrossômica, zona pelúcida.

ABSTRACT

The oocyte is surrounded by the pellucid zone (PZ) during ovulation and, externally, by the corona radiata and cumulus oophorus cells, which are impregnated with progesterone and are capable of triggering the stimulus for acrosome reaction in a small population of spermatozoa having the receptor for this hormone. The spermatozoon must move through the cumulus oophorus cells and the follicle cells of the corona radiata in order to hit the PZ and, thus, interact with the oocyte prior to penetration. Penetration of the PZ is one the most vital process of fertilization. Spermatozoa incapable of recognizing and linking to glycoprotein of the PZ do not succeed in fertilization. Recognition of the gamete and the following interactions are done by linking (carbohydrate – protein) with PZ receptors. These receptors activate the signal for acrosomal exocytosis by phosphorylation/dephosphorylation reactions. Interaction between the PZ structure and the abled spermatozoa, together with the oligosaccharide chains, can initiate the formation of a multimeric receptor complex in the sperm membrane, mediated by calcium ions. Signaling molecules that activate the acrosome reaction cascade are added to this complex, thus leading to penetration of the pellucid zone, fusion with the oocyte and, as a result, fertilization.

Keywords: Calcium, acrosome reaction, pellucid zone.

Introdução

A interação dos espermatozoides de mamíferos durante a fecundação ocorre sob três níveis distintos: (i) na camada do cumulus; (ii) na zona pelúcida (ZP), que induz a exocitose do conteúdo acrossômico, e (iii) na membrana plasmática do oócito, que inicia com a adesão ao oolema e conclui com a fusão da membrana espermática (Evans, 2002). Para que isto ocorra, o espermatozoide fecundante precisa sofrer um complexo e laborioso processo, uma vez que é incapaz de fecundar o oócito sem que ocorram essas

modificações (Amann & Graham, 1992). Deste modo, precisa permanecer no trato reprodutivo feminino por determinado período e, assim, se tornar capaz de penetrar no oócito (Bedford, 1983).

Após a deposição do sêmen no aparelho genital feminino pré-ovulação, o espermatozoide precisa ser transportado até o reservatório espermático e manter-se viável no genital feminino até a ovulação ocorrer, e ao mesmo tempo deve ser preparado para fecundação do oócito. Desta maneira, entre os diversos fatores envolvidos na fecundação do oócito, alguns

se destacam: a motilidade espermática, a contração miometrial e a inflamação espontânea uterina pós-cobertura, que são fatores importantes para o transporte e sobrevivência do espermatozoide no trato reprodutivo da fêmea (Troedsson et al., 1998). Esta revisão de literatura tem como objetivo ressaltar e discutir os principais pontos envolvidos na ativação e fecundação do oócito.

Revisão de literatura

Modificações do espermatozoide necessárias à fecundação

O lúmen uterino momentos após a cobertura e/ou inseminação artificial se torna um ambiente desfavorável, devido ao processo inflamatório instalado via o influxo de polimorfos nucleares (PMNs) e ativação do sistema complemento, que é desencadeado pelo sêmen, constituintes do meio diluidor e bactérias (Troedsson et al., 1998).

A cascata do sistema complemento media uma série de reações biológicas que incluem: o aumento da permeabilidade vascular, quimiotaxia, opsonização para fagocitose, ativação da lipase na membrana e lise de micro-organismos e elementos estranhos no sêmen. A ativação dessa cascata resulta na clivagem do fator C5 em C5a e C5b, assim a subunidade C5a média à quimiotaxia dos PMNs que

se ligam aos espermatozoides, bactérias e macromoléculas do sêmen e do meio diluidor (Troedsson et al., 1995). Entretanto, as bases moleculares da ligação do complemento permanecem desconhecidas (Troedsson et al., 1998).

Os espermatozoides presentes no lúmen uterino são envolvidos pelo C5a e em seguida fagocitados pelos PMNs ativado. Os PMNs ativados liberam $\text{PGF}_{2\alpha}$ a partir do metabolismo do ácido aracdônico (via cicloxigenase) proveniente das membranas das células espermáticas fagocitadas (Troedsson et al., 1998). A $\text{PGF}_{2\alpha}$, além de atuar como um mediador inflamatório, é um potente agente tônico do miométrio. Deste modo, as contrações uterinas induzidas pela $\text{PGF}_{2\alpha}$ atuam na remoção física do fluido e dos produtos liberados durante o processo inflamatório (Troedsson et al., 2005; Fiala et al., 2006).

O plasma seminal, presumivelmente, é importante no transporte e sobrevivência espermática no útero, uma vez que possui efeitos inibitórios sobre a quimiotaxia de PMNs e a fagocitose, além de conter ocitocina e prostaglandina que são agentes miotônicos (Katila, 2001). Em equinos, o aumento do transporte espermático, do fluxo sanguíneo no útero e na tuba uterina, têm sido associados à presença do plasma seminal. Embora tenha sido sugerido que os componentes do plasma seminal influenciem o transporte

espermático em várias espécies, em equinos as informações permanecem limitadas. Baseado em estudos conduzidos com suínos, acredita-se que a presença de estrógeno no plasma seminal de garranhões tenha efeitos positivos sobre o transporte espermático e a fecundação (Claus & Schams, 1990).

Os espermatozoides no aparelho reprodutivo da fêmea necessitam atingir a tuba uterina dentro de poucas horas para que possam evitar a fagocitose pelos PMNs, que estarão presentes no lúmen uterino 30 minutos após a cobertura ou inseminação, obtendo número máximo de fagócitos entre 8 e 24 horas após. Estudo em equinos registrou grande número de espermatozoides presentes na tuba uterina 4 horas após o serviço (Fiala et al., 2006). Os espermatozoides que alcançam a tuba uterina podem permanecer armazenados neste local em estado funcional por horas durante dias, embora, na espécie equina, a capacitação e a fecundação não requeiram este evento para que possam ocorrer normalmente, a preservação de na tuba uterina é de valia em serviços realizados pré-ovulação (Troedsson et al., 1998).

Na égua, o principal reservatório espermático é a tuba uterina, mais especificamente, a região caudal do istmo, local este onde também ocorre a capacitação espermática (Delpech & Thibault, 1993). Durante a passagem pelo trato repro-

duutivo, com a subsequente chegada à tuba uterina, os espermatozoides sofrem modificações nos componentes da membrana espermática, que provocam a destabilização da bicamada fosfolipídica. Consequentemente, ocorrerá fusão das membranas plasmática e acrossômica externa, iniciando a reação acrossômica (Amann & Graham, 1992; Bazer et al., 1995) e a hiperativação da motilidade espermática (Bedford, 1983; Delpech & Thibault, 1993).

Para preservar a membrana plasmática íntegra durante o transporte pelo aparelho genital feminino, proteínas do plasma seminal se aderem à mesma, formando assim uma capa de glicoproteínas. Os espermatozoides, ao passarem do plasma seminal para os fluidos do genital feminino, terão removidas ou modificadas a capa de glicoproteínas (Gadella et al., 2001). Desta forma, ocorre alteração do fluxo iônico transmembrana, exposição dos sítios de receptores da membrana espermática e remoção dos componentes que recobrem a cauda, evitando inibidores da hiperativação da motilidade. Alterações semelhantes ocorrem nas porções caudal e rostral da cabeça do espermatozoide, precedendo a reação acrossômica, e nas peças intermediária e principal, antecedendo a hipermotilidade (Amann & Graham, 1992).

As mudanças nos componentes da membrana espermática seguem-se progressi-

vamente com: perda de proteínas, redução do peso molecular e da proporção de colesterol/fosfolípido, além de aumentar a mobilidade lateral de lipídios e proteínas. A redução das proporções de colesterol/fosfolípidios na membrana plasmática e na membrana acrossomal incrementa a fluidez, através do fluxo de colesterol por transferência para moléculas de albuminas e lipoproteínas de alta densidade presentes na tuba uterina (Amann & Graham, 1992; Delpech & Thibault, 1993).

O colesterol tem importante função na estabilização das membranas biológicas, e sua remoção, desestabiliza a membrana e promove a reorganização dos componentes da bicamada, incluindo redistribuição de proteínas integrais (Amann & Graham, 1992). Há evidências de que o bicarbonato também pode facilitar a desorganização da membrana, principalmente na região apical da cabeça do espermatozoide (Gadella et al., 2001). A desestabilização por afetar a porção lipídica da membrana altera a permeabilidade iônica, particularmente ao cálcio e as propriedades fusogênicas, as quais são importantes para a reação acrossômica (Amann & Graham, 1992).

A capacitação nas células espermáticas dos mamíferos *in vivo*, aparentemente, é dependente, não somente do cálcio (Ca^{2+}), mas também do bicarbonato, uma vez que supostamente, está pre-

sente em níveis mais elevados na tuba uterina (20 mM) do que no fluido espermático (<1 mM) (Colenbrander et al., 2002). Esta molécula estimula a forma solúvel da adenilciclase (AC), abundante nos espermatozoides, resultando assim no aumento dos níveis de adenosina monofosfato cíclico (AMPC) que ativa a proteína quinase A (PKA) que, por sua vez, induz a fosforilação de resíduos de tirosina (Gadella et al., 2001). Esta fosforilação media uma variedade de funções celulares, como regulação do crescimento, controle de ciclos celulares, regulação de íons, formação do citoesqueleto, além de ser um componente essencial da capacitação espermática por ativar proteínas da membrana plasmática relacionadas com a ligação na zona pelúcida (Visconti & Kopf, 1998).

A atividade metabólica normal dos espermatozoides sob condições aeróbicas gera radicais livres como: ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e óxido nítrico (NO_2). Os radicais livres em altas concentrações são prejudiciais ao espermatozoide (Ball et al., 2002); entretanto, em baixas concentrações, eles desempenham funções essenciais para a hiperativação, capacitação espermática e reação acrossômica, iniciados pela fosforilação de resíduos de tirosina (Lamirande et al., 1997).

De acordo com Gadella e Colenbrander (2003) a hipermotilidade, induzida

pelo bicarbonato, leva a fosforilação de resíduos de tirosina na cauda caracterizado por aumento da amplitude do batimento flagelar, proporcionado pela maior flexibilidade na peça intermediária e mudança no padrão de motilidade, de progressivo para circular, devido a não rotação da cabeça espermática (Bedford, 1983; Delpech & Thibault, 1993).

Os processos de hiperativação e capacitação espermática envolvem mecanismos distintos (Amann & Graham, 1992). A liberação de colesterol e a redistribuição de proteínas na membrana plasmática permitem a abertura dos canais de cálcio e, conseqüentemente, o aumento dos níveis de cálcio intracelular. Contudo, há evidências de que a hiperativação seja relacionada aos níveis de AMPc, cálcio dependente, ou seja, o aumento desta molécula precede o início da motilidade hiperativada (Delpech & Thibault, 1993). Bedford (1983) sugere que a hiperativação espermática maximiza a probabilidade de contato dos espermatozoides presentes na ampola com o oócito, facilitam o transporte espermático do istmo para a ampola e a penetração no oócito.

Juntamente com a hiperativação, o espermatozoide precisa passar pelo processo de capacitação e reação acrossômica (fusão das membranas), que corresponde a uma série de modificações no acrossoma, necessárias para a passagem pela

parede do oócito (Amann & Graham, 1992; Bazer et al., 1995).

A capacitação previne a ativação prematura do acrossoma, até que o espermatozoide atinja o local de fecundação do oócito na ampola da tuba uterina (Bazer et al., 1995) e não precocemente durante a passagem do espermatozoide no aparelho genital feminino nas porções anteriores (Amann & Graham, 1992). Embora a duração do processo de capacitação *in vitro* tenha sido estabelecida para várias espécies, o tempo requerido para a capacitação *in vivo* não é conhecido para todas (Amann & Graham, 1992). Acredita-se que seja dependente da relação estrógeno/progesterona (Delpech & Thibault, 1993).

Próximo ao momento da ovulação, os espermatozoides capacitados são então liberados do epitélio da tuba uterina e deslocam-se até o local da fecundação. A tuba e o próprio oócito parecem coordenar a função espermática e a interação gamética (Topfer-Petersen et al., 2000).

Ativação do oócito

O oócito, no momento da ovulação, encontra-se circundado pela zona pelúcida e mais externamente pela corona radiata e células do cumulus oophorus que são impregnadas por progesterona, capazes de desencadear o estímulo fisiológico da reação acrossomal em uma peque-

na população de espermatozoides que possuam o receptor para este hormônio (Meizel & Turner, 1996).

O espermatozoide precisa atravessar tanto o cumulus oophorus como as células foliculares da corona radiata para que ele possa atingir a zona pelúcida (ZP), e interagir com o oócito previamente a penetração (Osman et al., 1989).

A proteína espermática de superfície (PH-20) com hialuronidase ativa é considerada como responsável pela passagem do espermatozoide através da camada do cumulus. Esta informação está suportada por estudos conduzidos com anticorpos contra PH-20, que eliminou a hialuronidase ativa e preveniu a penetração espermática através da ZP. Contudo, a hialuronidase ativa não é requerida para a ligação do espermatozoide à ZP. Assim tem sido sugerido que o terminal-C da PH-20 pode funcionar como um domínio de adesão e mediar a ligação (Myles et al., 1997).

Após a passagem pelo cumulus, a ZP provê uma barreira para ligação do espermatozoide capacitado, levando assim à indução da exocitose celular (reação acrossômica), permitindo, então, a penetração e fusão ao oolema e em seguida o enrijecimento da ZP para prevenção da polispermia. A função da ZP tem sido reconhecida há tempos, porém só recentemente a ação foi atribuída a gli-

coproteínas específicas (D’Cruz, 1996; Wassarman et al. 2004).

A ZP do oócito de mamíferos é composta por três glicoproteínas, denominadas de ZP1, ZP2 e ZP3, que interagem por ligações do tipo não-covalentes. A ZP2 e a ZP3 estão presentes em quantidades equimolar semelhante, e são mais abundantes do que a ZP1 (Wassarman et al. 2004). Cada um dos tipos de glicoproteínas consiste de uma cadeia comum de polipeptídeo, que é heterogeneamente glicosilado com o oligossacarídeo ligado a asparagina-(N) que se liga a serina/treonina-(O), e sendo modificados por sulfatação, sialilação entre outras subdivisões (Gupta et al., 2004).

A ZP3 é a responsável pela ligação espermática primária à ZP e pela indução da reação acrossômica, enquanto a ZP2 participa na ligação espermática secundária à ZP (Lasserre et al., 2003). A ligação do espermatozoide ao oócito é espécie-específica, e é mediada por oligossacarídeos ligados a ZP3. Os peptídeos da ZP, apesar de específicos para a espécie, têm várias regiões identificadas que incluem uma sequência de sinais de terminal-N, um grande domínio da ZP, um consenso do local da clivagem pela furina (CFCS) e uma região transmembrana hidrofóbica próxima ao terminal-C (Wassarman et al., 2004).

Há um polipeptídeo entre o terminal-C do domínio da ZP e o CFCS, uma região

de ZP3 denominado de local combinado para o espermatozoide. Esta região possui resíduos glicosilados de serina (Ser) para que o espermatozoide, com acrosoma intacto, possa se ligar durante a fecundação (Gupta et al., 2004). A ZP3 de camundongos tem cinco resíduos de Ser nesta região (-Ser-Asn-Ser-Ser-Ser-), mas somente duas dessas, Ser-332 e a Ser-334, aparentemente, apresentam ligação com oligossacarídeo O-ligado, que é reconhecido pelo espermatozoide. Embora a estrutura desses oligossacarídeos não tenha sido determinada, evidências sugerem que vários açúcares incluindo galactose, fucose e glucosamina-acetil-N, podem estar envolvidos no reconhecimento pelo espermatozoide. É notável que, embora a Ser-332 e a Ser-334 tenham sido conservadas na ZP3 de camundongos e humanos, esta região tem sofrido consideráveis mudanças durante a evolução. Tendo sido sugerido como coadjuvante para a seleção Darwiniana positiva, e em parte, podendo ser responsável por manter a fecundação espécie-específica (Wassarman et al., 2004).

Em contraste, a informação disponível acerca da composição da ZP e do seu papel durante a fecundação, a caracterização molecular e bioquímica das proteínas espermáticas envolvidas na ligação da ZP, precisa ser mais bem estudada. Em humanos, várias proteínas têm sido propostas como participantes da ligação primária e secundária da ZP. Dentre es-

tas estão o antígeno FA-1, receptor zona quinase (ZRK), P34H, lectina-manose, hexosaminidase (Hex, E.C.3.2.1.52), um antígeno reconhecido pelo anticorpo mitocondrial 4A8, selectinas, proteína YLP12, proteínas reativas anti-SLIP, SOB3, PH20, SP10 e pro-acrosina. A codificação da sequência de algumas dessas proteínas tem sido relatada. Contudo, ainda, não foi realizada comprovação se são essenciais ou não à interação oócito-espermatozoide (Lasserre et al., 2003).

Mudanças oocitárias à fecundação

A penetração da zona pelúcida é um dos processos vitais durante a fecundação. Desta maneira, espermatozoides incapazes de reconhecer e se ligar a essas glicoproteínas, falham em fecundar o oócito. O reconhecimento do gameta e as próximas interações são realizados por interações proteína-carboidrato dos receptores da zona pelúcida, que ativam o sinal da cascata, a qual inicia a exocitose acrossomal por reações de fosforilação/desfosforilação (Topfer-Petersen et al., 2000).

A interação entre a estrutura da ZP e o espermatozoide capacitado, bem como a apresentação conjunta das cadeias de oligossacarídeos, pode iniciar a formação de um complexo receptor multimérico dentro da membrana espermática, mediada por íons cálcio. A esse complexo, é agre-

gado moléculas sinalizadoras que ativam a cascata da reação acrossômica, levando assim a penetração da zona pelúcida e a fusão com o oócito (Topfer-Petersen et al., 2000; Ben-Yosef & Shalgi, 2001).

A fusão de membranas é um dos eventos chave na diversidade dos fenômenos celulares, tais como transporte entre organelas, na endocitose e exocitose, miogênese, infecção viral e fecundação. Desta forma, pode-se pressupor que a especificidade da fusão de membranas sugere o envolvimento de moduladores específicos que regulam o reconhecimento das membranas envolvidas (Evans, 2002).

A adesão da membrana plasmática do espermatozoide ao oolema, desencadeia uma fusão destas estruturas que é similar à resposta que ocorre em linfócitos após ativação na presença de antígenos. Sugere-se que princípios similares podem ser extrapolados aos eventos de fusão na fecundação. Baseado nestes fatos, têm sido desenvolvidos estudos na tentativa de elucidar a contribuição das várias moléculas de adesão celular na fusão do espermatozoide com o oócito (D'Cruz, 1996; Evans, 2002).

Tem sido postulado que a ligação do espermatozoide à integrina do oócito é um pré-requisito para a adesão e na sequência para a fusão das membranas espermática e do oócito. A integrina do

tipo $\beta 1$ tem sido especialmente implicada como sendo requerida para a fusão do espermatozoide (He et al., 2003). O conceito de que uma integrina no oócito seja requerida para a fusão de membranas originou-se com a identificação de uma proteína espermática de superfície, a fertilina, originalmente descrita como PH-30 (Myles, 1993). Essa proteína inicialmente foi correlacionada com a fusão de gametas, baseado em estudos de inibição com anticorpos (He et al., 2003).

Estudos têm registrado evidências que sustentam a hipótese que a integrina na superfície do oócito pode ser o receptor para a molécula de superfície do espermatozoide, responsável pela fusão. As integrinas são classificadas como moléculas de adesão que ligam células à matriz extracelular ou a outras células. São formadas por duas subunidades heterodímeras (α e β) com múltiplos subtipos, tanto α (120-180 kDa) quanto β (90-110 kDa), sendo que essas subunidades podem se associarem em várias combinações para formarem famílias de moléculas (Myles, 1993).

A fertilina é a proteína da superfície espermática que corresponde ao sítio de ligação das integrinas do oócito, e assim como as integrinas, é um heterodímero composto por subunidades α e β , e ambas pertencentes às desintegrinas e metaloproteínases (ADAM), família das proteínas da membrana plasmática (Pri-

makoff & Myles, 2002). Baseado no fato que a desintegrina solúvel encontrada no veneno de serpentes liga-se a integrina $\alpha\text{IIb}\beta_3$, foi proposto que o domínio da desintegrina da fertilina espermática pode ligar-se a integrina do oócito (He et al., 2003). Várias integrinas do oócito têm sido reportadas (Evans, 2002), com ações, sobre a fertilina, e também associadas a CD9 em várias células (He et al., 2003).

A CD9 pertence à superfamília da tetraspanina (TM4SF), proteínas integrais da membrana plasmática. Essas proteínas possuem quatro domínios transmembrana, duas alças extracelulares e três segmentos citoplasmáticos curtos. Atuam como “moléculas facilitadoras” por conduzirem e estabilizarem complexos moleculares. As tetraspaninas têm sido associadas fisicamente com os membros da família das integrinas, com a classe do complexo de histocompatibilidade principal, dentre outras. Embora o preciso mecanismo de ação permaneça incerto, a tetraspanina (CD9), interage com as integrinas $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$ e $\alpha\text{IIb}\beta_3$, sugerindo que sua ação na sinalização, migração e adesão à matriz extracelular dos substratos é por intermédio destas integrinas (Chen et al., 1999).

Após o espermatozoide realizar os processos de adesão, penetração e passagem pela ZP (via liberação de acrosina) para o espaço perivitelino (EPV), ele pode interagir com as micro vilosidades do

oolema, se ligar, fundir e, a seguir, ser engolfado pelo oócito, onde o núcleo do espermatozoide é descondensado (ooplasma) e, mais tarde, transformado no pró-núcleo masculino. A partir desse momento, a reação cortical é iniciada, a segunda divisão meiótica é retomada, há um aumento da atividade metabólica, remodelagem do citoesqueleto, formação do pró-núcleo feminino unificação genômica, síntese de DNA e a primeira divisão mitótica (Meng & Wolf, 1997; Kaji & Kudo, 2004).

De todas as reações que se iniciam com a ativação do oócito, a ativação dos grânulos corticais (reação cortical IRCI) é considerada de maior relevância por impedir a polispermia. Esses grânulos são organelas especializadas no citoplasma do oócito que permanecem em íntimo contato com a membrana plasmática. Primeiramente, aparecem durante o crescimento do oócito como produto do complexo de Golgi contendo várias enzimas hidrolíticas. A RC envolve a fusão dos grânulos corticais, a membrana plasmática, com concomitante exocitose do conteúdo dos grânulos dentro do EPV em resposta a fecundação. A exocitose provavelmente é precedida por sinais de transdução, similarmente ao que ocorre em células somáticas (Wassarman et al., 2004). As enzimas dos grânulos corticais, após liberação no EPV, adentram na ZP, altamente porosa, e, modificam as glicoproteínas (ZP2 e ZP3), então

se estabelece a reação de zona, que é caracterizada por diminuição da solubilidade da ZP e perda da receptividade aos espermatozoides livres, devido à proteólise de parte da ZP2 e oligossacarídeos O-ligados da ZP3, pela ação das glicosidases provenientes dos grânulos (Liu et al., 1997).

Em algumas espécies como o ouriço-do-mar e a rã, a ligação do espermatozoide promove a despolarização imediata da membrana do oócito, e assim impede a entrada de mais espermatozoides. Na maioria dos animais estudados, a ligação do espermatozoide induz uma grande e transiente elevação das concentrações citoplasmáticas do íon cálcio no oócito, que se inicia no local da penetração e move-se por todo o oócito em forma de onda (Ben-Yosef e Shalgi, 2001). Embora o mecanismo pelo qual o espermatozoide induza as ondas de cálcio seja questionável, foi estabelecido que a onda de elevação do cálcio é que induz a fusão das vesículas corticais com a membrana plasmática, resultando assim na elevação do envelope de fecundação, formação de uma barreira à penetração de outros espermatozoides (Hable & Kropf, 2000).

Essa onda transiente de cálcio é requerida não somente para ativar a reação cortical, mas também para reativação da meiose, na formação pró-nuclear, iniciação da síntese de DNA e progres-

são normal da clivagem embrionária. Em adição, recentes estudos demonstram que a frequência e a amplitude da onda de cálcio podem ter impacto nos estádios de desenvolvimento pré e pós-implantação. O mecanismo exato pelo qual o espermatozoide inicia a oscilação da concentração de cálcio no oócito não é completamente conhecido, porém sabe-se que envolve a produção de inositol 1, 4, 5-trifosfato (IP3), e estes por sua vez se ligam aos receptores no retículo endoplasmático (principal estoque intracelular íons cálcio), permite-se desta forma o efluxo de íons cálcio para o citosol (Ben-Yosef & Shalgi, 2001; Bedford et al., 2004).

Tem sido postulado classicamente que a produção de IP3 se inicia através da proteína G ou pela sinalização da tirosina quinase ligada aos receptores no oolema. Entretanto, estudo divergente sugere que o espermatozoide seja o iniciador da produção de IP3, uma vez que a fusão espermatozoide-oócito precede o início transiente de íons cálcio, ocorrendo o pico de cálcio a seguir, após breve atraso, o que torna condizente as evidências da teoria sobre do fator espermático como sendo o responsável pela iniciação da oscilação de cálcio em mamíferos (Bedford et al., 2004).

A primeira onda transiente de íons cálcio é seguida por uma série de ondas de baixa frequência e alta amplitude.

A oscilação de íons cálcio é observada em oócitos de todos os mamíferos estudados, embora as características seja espécie-específica. Em roedores e humanos, as oscilações são de alta frequência, com intervalos regulares de 2 a 4 minutos de pico a pico. Com o progresso da fecundação, a dimensão do pico e a frequência do Ca^{2+} diminuem, enquanto a amplitude aumenta até o término da oscilação do cálcio, que culmina com o início da interfase e da formação do pró-núcleo (horas após a entrada do espermatozoide). A oscilação do íon cálcio requer um contínuo influxo do mesmo para preencher os estoques do retículo endoplasmático. Embora uma simples elevação dos níveis de cálcio seja suficiente para produzir a ativação oocitária, a oscilação pode ser necessária para o desenvolvimento de eventos adicionais (Ben-Yosef & Shalgi, 2001).

Atualmente, é sabido que o cálcio é requerido na fecundação para a ativação do oócito, porém não foi estabelecido como os espermatozoides promovem as mudanças de íons cálcio em oócitos, nem como a mudança nos diferentes padrões afetam o desenvolvimento embrionário. Permanece incerto o mecanismo de desencadeamento da maturação do oócito mediada pelo cálcio, embora o impedimento de sua mudança intracelular possa inibir a maturação meiótica em estádios específicos (Homas et al., 1993).

Considerações finais

O oócito e os espermatozoides de mamíferos passam por complexos eventos durante o decorrer da fecundação, sendo que alguns eventos ocorrem em ambos os gametas, como a fusão das membranas (reação acrossômica, reação cortical e fusão espermatozoide-oócito) e os que acontecem envolvendo a proteólise da ZP (penetração da ZP e reação da ZP). Os três primeiros processos utilizam sinais intracelulares do oócito ou do espermatozoide, posteriormente os dois processos subsequentes utilizam enzimas presentes em organelas especializadas, semelhantes a lisossomos, nos espermatozoides (acrossoma) ou no oócito (grânulos corticais) para modificar as glicoproteínas da ZP. Tendo, tanto o espermatozoide quanto o oócito, adesão de moléculas presentes na superfície que suporta a interação, espécie-específica, entre gametas que precede a fusão. Desta forma, apesar da considerável diferença, o espermatozoide e o oócito usam mecanismos análogos para alcançar o objetivo de comum que é a fecundação.

Referências

- Amann R. P, & Graham, J. K. (1992). Spermatozoal function. In McKinnon, A. O., & Voss, J. L. *Equine Reproduction* (pp. 717-718). Philadelphia: Lea & Febiger.

- Ball, B. A., Baumber, J., & Sabeur, K. (2002). Role of reactive oxygen species on normal and abnormal function of equine spermatozoa. *Theriogenology*, 58 (2-4), 299-300.
- Bazer, F. W., Geisert, R. D., & Zavy, M. T. (1995). Fertilização, clivagem e implantação. In Hafez, E. S. E. (6. ed.). *Reprodução Animal* (pp. 191-193). São Paulo: Manole.
- Bedford, J. M. (1983). Significance of the need for sperm capacitation before fertilization in eutherian mammals. *Biology of Reproduction*, 28 (1), 108-120.
- Bedford, S. J., Hinrichs, M. K. K., & Fissore, R. A. (2004). Patterns of intracellular calcium oscillations in horse oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection: possible explanations for the low success of this assisted reproduction technique in the horse. *Biology of Reproduction*, 70 (4), 936-944.
- Ben-Yosef, D., & Shalgi, R. (2001). Oocyte activation: lessons from human infertility. *Trends in Molecular Medicine*, 7 (4), 163-169.
- Chen, M. S, Tung, K. S. K, Coonrod, S. A., Takahashi, Y., Bigler, D., Chang, A., Tamashita, Y., Kincade, P. W., Herr J. C., & White, J. M. (1999). Role of the integrin-associated protein CD9 in binding between sperm ADAM 2 and the egg integrin $\alpha 6 \beta 1$: Implications for murine fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96 (21), 11830-11835.
- Claus, R. & Schams, D. (1990). Influence of mating and intrauterine oestradiol infusion on peripheral oxytocin concentrations in pigs. *Journal of Endocrinology*, 126 (3), 361-365.
- Colenbrander, B., Brouwers J. F. H. M., Neild, D. M., Stout T. A. E., Silva, P. da, & Gadella, B. M. (2002). Capacitation dependent lipid rearrangements in the plasma membrane of equine sperm. *Theriogenology*, 58 (2-4), 341-345.
- D'cruz, O. J. (1996). Adhesion molecules in human sperm-oocyte interaction: relevance to infertility. *Frontiers in Bioscience*, 1, 61-176.
- Delpuch, S. & Thibault, C. (1993). Acquisition of sperm fertilizing ability: epididymal maturation, accessory glands and capacitation. In Thibault, C., Levasseur, M. C., & Hunter, R. H. *Reproduction in mammals and man* (pp. 268-278). Paris: Ellipses.
- Evans, J. P. (2002). The molecular basis of sperm-oocyte membrane interactions during mammalian fertilization. *Human Reproduction Update*, 8 (4), 297-311.
- Fiala, S. M., Pimentel, C. A., Mattos, A. L. G., Gregory, R. M., & Mattos, R. C. (2006). Effect of sperm numbers and concentration on sperm transport and uterine inflammatory response in the mare. *Theriogenology*, 67 (3), 556-562.
- Gadella, B. M., & Colenbrander, B. (2003). Bicarbonate dependent capacitation of mammalian sperm cells: a comparative overview. In *Proceedings of a workshop*

- on transporting gametes and embryos (pp. 43-48). Brewster: R & W Publications.
- Gadella, B. M., Rathi, R., Brouwers, J. F. H. M., Stout, T. A. E., & Colenbrander, B. (2001). Capacitation and acrosome reaction in equine sperm. *Animal Reproduction Science*, 68 (3-4), 249-265.
- Gupta, S. K., Srivastava, N., Choudhury, S., Rath, A., Sivapurapu, N., Gahlay, G. K., & Batra, D. (2004). Update on zona pellucida glycoproteins based contraceptive vaccine. *Journal of Reproductive Immunology*, 62 (1-2), 79-89.
- Hable, W. E., & Kropf, D. L. (2000). Sperm entry induces polarity in fucoid zygotes. *Current Opinion in Plant Biology*, 3 (3), 174.
- He, Z. Y., Brakebusch, C., Fässler, R., Kreidberg, J. A., Primakoff, P. & Myles, D. G. (2003). None of the integrins known to be present on the mouse egg or to be ADAM receptors are essential for sperm-egg binding and fusion. *Developmental Biology*, 254 (2), 226-237.
- Homa, S. T., Carroll, J., & Swann, K. (1993). Fertilization and early embryology: The role of calcium in mammalian oocyte maturation and egg activation. *Human Reproduction*, 8 (8), 1274-1281. Recuperado de <http://humrep.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/8/8/1274>.
- Kaji, K., & Kudo, A. (2004). The mechanism of sperm-oocyte fusion in mammals. *Reproduction*, 127 (4), 423-429.
- Katila, T. (2001). Sperm-uterine interactions: a review. *Animal Reproduction Science*, 68 (3-4), 267-272.
- Lamirande, E. de, Jiang, H., Zini, A., Kodama, H. E., & Gagnon, C. (1997). Reactive oxygen species and sperm physiology. *Reviews of Reproduction*, 2, 48-54.
- Lasserre, A., González-Echeverría, F., Moules, C., Tezón, J. G., Miranda, P. V., & Vazquez-Levin, M. H. (2003). Identification of human sperm proteins involved in the interaction with homologous zona pellucida. *Fertility and Sterility*, 79 (Suppl. 3), 1606-1615.
- Liu, C., Litscher, E. S., Wassarman, P. M. (1997). Zona pellucida glycoprotein mZP3 bioactivity is not dependent on the extent of glycosylation of its polypeptide or on sulfation and sialylation of its oligosaccharides. *Journal of Cell Science*, 110 (6), 745-752.
- Meizel, S., & Turner, K. O. (1996). Chloride efflux during the progesterone-initiated human sperm acrosome reaction is inhibited by lavendustin A, a tyrosine kinase inhibitor. *Journal of Andrology*, 17 (4), 327-30.
- Meng, L., & Wolf, D. P. (1997). Sperm-induced oocyte activation in the rhesus monkey: nuclear and cytoplasmic changes following intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction*, 12 (5), 1062-1068.
- Myles, D. G. (1993). Molecular mechanisms of sperm-egg membrane binding and fusion in mammals. *Developmental Biology*, 158 (1), 35-45.
- Myles, D. G., & Primakoff, P. (1997). Why did the sperm cross the cumulus? To get to the oocyte. Functions of the sperm

- surface proteins PH-20 and fertilin in arriving at, and fusing with, the egg. *Biology of Reproduction*, 56 (2), 320-327.
- Osman, R. A., Andria, M. L., Jones, A. D., & Meizel, S. (1989). Steroid induced exocytosis: the human sperm acrosome reaction. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 160 (2), 828-833.
- Primakoff, P., & Myles, D. G. (2002). Penetration, adhesion, and fusion in mammalian sperm-egg interaction. *Science*, 296 (5576), 2183-2185.
- Topfer-Petersen, E., Petrounkina, A. M., & Ekhlesi-Hundrieser, M. (2000). Oocyte-sperm interactions. *Animal Reproduction Science*, 60-61, 653-662.
- Troedsson, M. H. T., Crabo, B. G., Ibrahim, N. M., Scott, M., & Ing, M. (1995). Mating-induced endometritis: mechanisms, clinical importance and consequences. *Proceedings American Association of Equine Practitioners*, 41, 11-12.
- Troedsson, M. H. T., Liu, I. K. M., & Crabo, B. G. (1998). Sperm transport and survival in the mare. *Theriogenology*, 49 (5), 905-915.
- Troedsson, M. H. T., Desvousges, A., Alghamdi, A. S., Dahms, B., Dow, C. A., Hayna, J., Valesco, R., Collahan, P. T., Macpherson, M. L., Pozor, M., & Buhi, W. C. (2005). Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. *Animal Reproduction Science*, 89 (1-4), 171-186.
- Visconti, P. E., & Kopf, G. S. (1998). Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biology of Reproduction*, 59 (1), 1-6.
- Wassarman, P. M., Jovine, L., Litscher, E. S., Qi, H., & Williams, Z. (2004). Egg-sperm interactions at fertilization in mammals. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 115S (Suppl. 1), S57-S60.

