

ARTIGO DE REVISÃO

MECANISMO DA FERTILIZAÇÃO¹

Ruth Helena Falesi Palha de Moraes BITTENCOURT²
Moacir Cerqueira da Silva³
Haroldo Francisco Lobato RIBEIRO⁴

RESUMO: A fertilização nos mamíferos representa a fusão de duas células sexuais com a finalidade de criar um indivíduo com o potencial genético derivados dos pais. É a fusão do material genético dos gametas masculino com o feminino. Trata-se de um processo complexo que inicia com a ativação do espermatozóide e termina pela ativação do ovócito mediada pela célula masculina. O processo da fertilização, constantemente estudado, tem sua importância na procura pelo homem de formas de multiplicar a si mesmo e aos animais do qual se alimenta, além daqueles em vias de extinção. A presente revisão bibliográfica visa abordar mecanismos envolvidos no processo, tentando de forma objetiva, agregar definições, desenvolvimentos, interações, mecanismos e aspectos fundamentais para o desencadeamento do processo.

TERMOS PARA INDEXAÇÃO: Fertilização, Revisão Bibliográfica, Processo.

MECHANISMS OF THE FECUNDATION

ABSTRACT: The fecundation in the mammals represents the fusion of two sexual cells with the objective to create an individual with the genetic potential diverted from the parents. It is the fusion of the genetic material of the masculine gamete with the feminine thing. It is a complex process that begins with the activation of the spermatozoon and ends with the activation of the oocyte mediated by the masculine cell. The process of fecundation, constantly studied, has its importance in the search by the man of the forms of multiplying himself and the animals of which it is fed, besides those about to extinction. The present bibliographical revision aims to approach mechanisms involved in the process, trying in an objective way to join definitions, developments, interactions, mechanisms and basic aspects for the starting of the process.

INDEX TERMS: Fertilization, Revision Bibliographical, Process.

¹ Aprovado para publicação em 07.04.2006

² Médica Veterinária, M. Sc. em Ciência Animal, Professora Adjunta do ISPA/UFRA.

³ Médico Veterinário, M. Sc., Professor Adjunto do ISPA/UFRA

⁴ Médico Veterinário, Dr., Professor Associado do ISPA/UFRA

1 INTRODUÇÃO

A fertilização é um processo que se inicia com o contato entre o espermatozóide e o ovócito (óvulo) e finda com a fusão do material genético contido nestes gametas. Nos mamíferos representa o início de uma nova vida, onde duas células sexuais fundem-se para criar um novo indivíduo com potencial genético derivado dos pais, realizando, portanto, uma combinação dos genes derivados dos pais e a criação de novos organismos.

O contato entre as membranas citoplasmáticas do espermatozóide e do ovócito induz, neste último, a reação cortical, ou seja, a exocitose das enzimas contidas nos grânulos corticais localizados na periferia do ovócito. Essas enzimas provocam modificações na zona pelúcida, levando ao seu endurecimento e inativação dos receptores. Estas alterações, denominadas reação zonal, impedem, na maioria das espécies, definitivamente, a penetração de outro espermatozóide (poliespermia) no ovócito. O contato das membranas citoplasmáticas dos gametas induz, ainda, a ativação do ovócito.

Com a fusão das membranas citoplasmáticas, o material contido no espermatozóide é transferido para o ovócito. O material genético do espermatozóide (pró-núcleo masculino) e o do ovócito (pró-núcleo feminino) fundem-se e preparam-se para a primeira clivagem da, agora, denominada célula ovo ou zigoto.

Após a ovulação, o ovócito secundário é captado pela ampola da tuba uterina, o epitélio ciliado e o movimento peristáltico desta, auxiliam na condução do gameta feminino à cavidade uterina.

Após a espermiogênese, os espermatozóides são morfologicamente maduros, mas não têm mobilidade e são incapazes de fertilizar o ovócito, ficando armazenados no epidídimo até atingirem a maturação química, a rigor, os espermatozóides só atingem seu potencial fertilizante quando chegam a cauda do epidídimo, onde sofrerão modificações químicas na membrana plasmática.

Na ejaculação, os espermatozóides passam rapidamente através do ducto deferente e misturam-se às secreções das vesículas seminais e próstata, em seguida, durante a cópula, os espermatozóides são depositados na parte superior da vagina, como por exemplo, na vaca, e ultrapassam as barreiras do trato genital feminino (como pH ácido da vagina, região e muco cervical e istmo da tuba uterina). Durante o período em que os espermatozóides passam pelo trato feminino, ocorrerá o processo de capacitação espermática.

A interação dos espermatozóides com receptores específicos da zona pelúcida desencadeia a reação acrossômica, criando-se poros que permitem a exocitose de enzimas, as quais irão digerir a zona pelúcida, sendo assim, possível a fusão do espermatozóide com a membrana plasmática do ovócito, despolarizando-a e levando a exocitose de proteases e glicosidases. Estas últimas alteram as glicoproteínas da superfície celular, impedindo a fertilização por outros espermatozóides, a poliespermia.

A importância da fertilização ser constante e profundamente estudada, reside na razão de que o homem procura cada vez mais formas de multiplicar a si e aos animais. A ciência tem se mostrado cada vez

mais rápida nas suas descobertas, entretanto, a ética humana não a acompanha com a mesma rapidez. Nos dias de hoje, depois de alcançada a fertilização “in vitro”, já se estuda o desenvolvimento embrionário e fetal “in vitro”.

Este trabalho de revisão bibliográfica pretende estudar os mecanismos da fertilização, “in vivo”, nos mamíferos domésticos, considerando passo a passo, tentando, de forma objetiva, agregar definições, desenvolvimentos, interações, mecanismos e aspectos fundamentais para o desencadeamento do processo.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A FERTILIZAÇÃO

A fertilização é um processo duplo que, no aspecto embriológico, envolve a ativação do

ovócito (gameta feminino) pelo espermatozóide (gameta masculino) e, no aspecto genético envolve a introdução do material hereditário do pai dentro do ovócito. Na fertilização, duas células, os gametas masculino e feminino, combinam-se para formar uma, o zigoto, e o local de fertilização, em todos os mamíferos domésticos e na maioria dos outros mamíferos, é a junção istmo-ampolar (HAFEZ, 2000).

Cernach (2003) descreve a fertilização como uma série de processos que se inicia com o espermatozóide penetrando na coroa radiata e termina com a fusão dos pró-núcleos masculino e feminino, ou seja, é a união de um ovócito com espermatozóide, dando início a formação de um novo indivíduo e compreende um conjunto de eventos celulares que se inicia com a penetração do ovócito e vai até a singamia (Figura 1).

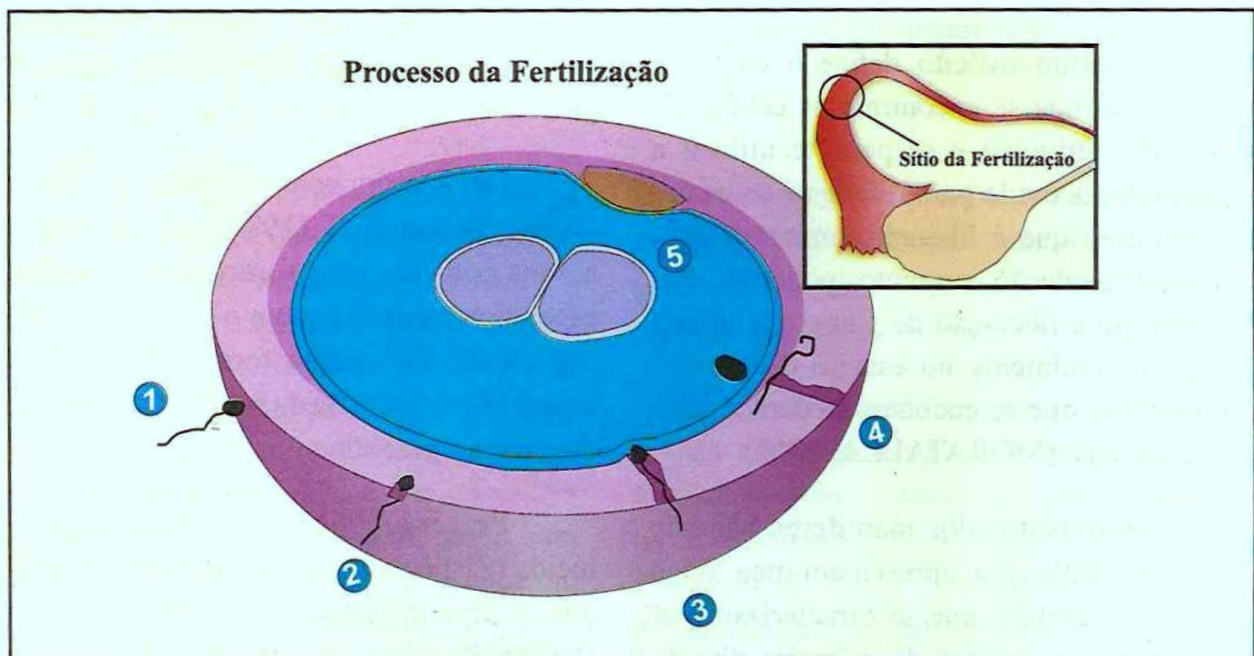


Figura 1 – Processo da Fertilização esquematizado iniciando com a penetração do SPTZ na coroa radiata, terminando com a fusão do pró-núcleo masculino com o feminino.

Fonte: Modificado de Burks e Saling, (1992).

A fertilização começa com a ativação do espermatozóide e termina pela ativação do ovócito mediada pela célula masculina (BURKS; SALING, 1992). O ovócito é capaz de ser fecundado imediatamente após ser liberado do ovário, entretanto o espermatozóide tem que passar por uma série de processos de maturação depois de ser produzido no testículo (MORATALLA, 2002).

Segundo Flores (2000), a espermatogênese e a ovogênese preparam o espermatozóide e o ovócito para a fertilização, entretanto, a capacitação final ocorre no trato genital feminino, para que o ovócito sofra a maturação meiótica e o espermatozóide seja capacitado.

2.2 O OVÓCITO

O termo ovócito define a etapa de meiose em que se encontram as células da linhagem feminina e se permite utilizar a terminologia óvulo para referir-se ao gameta feminino que é liberado durante a ovulação. A ovulação, portanto, pode ser descrita como a liberação do gameta feminino (óvulo), geralmente no estágio de ovócito secundário, que se encontra preparado para a fecundação (MORATALLA, 2002).

Os ovócitos dos mamíferos não são somente células que apresentam uma longa vida, mas também que se caracterizam por interromper a prófase da primeira divisão meiótica, estágio diplóteno, da vida fetal durante a maturação (BYSKOV et al., 2000)

O crescimento do ovócito caracteriza-se pela ampliação do citoplasma por acúmulo de grânulos de deutoplasma (vitelo) de diferentes tamanhos; pelo desenvolvimento de uma membrana ovular (zona pelúcida) e; pela proliferação mitótica do epitélio celular e tecido adjacente. A maturação dos ovócitos, em mamíferos, compreende dois estágios, (a) um período de crescimento e (b) um período final de preparo nuclear e citoplasmático, que é pré-requisito para a fertilização e desenvolvimento normal (HAFEZ, 2000).

Sinowatz, Kolle e Topfer-Petersen et al. (2001) descrevem a zona pelúcida como uma matriz extracelular transparente que envolve o ovócito e o embrião primitivo. A zona pelúcida, na maioria dos mamíferos, possui uma composição básica de glicoproteínas sulfatadas, com pelo menos três famílias, a ZP1, ZP2 e ZP3 com pesos moleculares que variam com as espécies (GONZÁLEZ, 2002).

De acordo com Florman e Storey (1982), Berger et al. (1989) e Urch (1991), a zona pelúcida possui receptores espécie-específico para união com o espermatozóide capacitado, da mesma forma em que está envolvida na indução da reação acrossômica do gameta masculino.

Berger (1996) referiu que a zona pelúcida (ZP) é a primeira camada do ovócito que o espermatozóide encontra durante a fertilização "in vivo" em muitas espécies, conforme mostra a Figura 2. Além da zona pelúcida, que rodeia os ovócitos dos mamíferos, existe ainda o *cumulus oophorus*,

composto por células e por uma matriz, cujo componente principal é o ácido hialurônico (GONZÁLEZ, 2002). O *cumulus* é rapidamente removido do ovócito de bovinos após

a ovulação e em observações realizadas em ovócitos recentemente ovulados de porcas sugerem sua permanência por tempo limitado (BERGER, 1996).

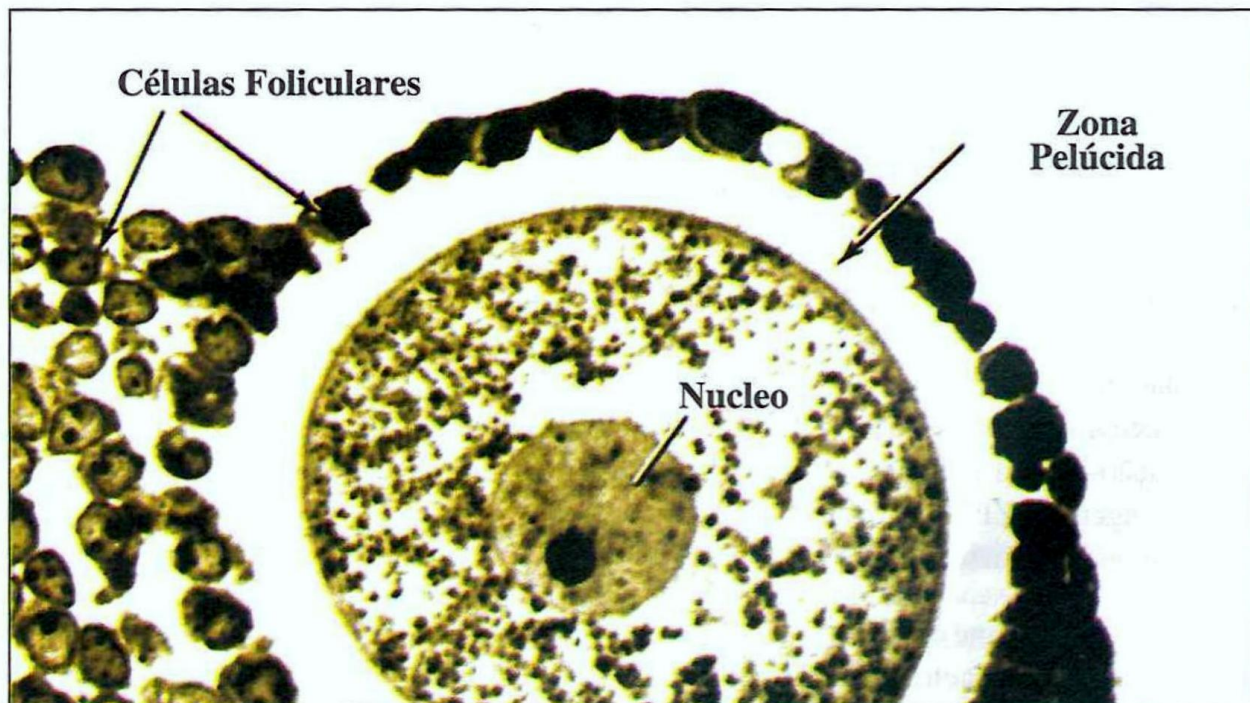


Figura 2 – Ovócito não ovulado mostrando a ZP como a primeira camada encontrada pelos espermatozoides durante a fertilização.

Fonte: Florman e Storey (1982)

A zona pelúcida representa diversas funções importantes dentro de uma seqüência orquestrada de interações entre os gametas masculino e feminino (BLEIL; WASSARMAN, 1980; SINOWATZ; KÖLLE; TOPFER-PETERSEN, 2001; SINOWATZ, 2003). Segundo Hunter (2003), uma das funções da zona pelúcida, e que considera de extrema importância, é o bloqueio para a entrada de vários espermatozoides no óvulo por ocasião da fertilização.

Para Berger (1996), os peptídeos ZPA, ZPB e ZPC são modificados por glicosilação heterogênea e em alguns casos por divisão ou

clivagem peptídica, a seqüência homológica conhecida de moléculas individuais entre porcos e bovinos, cães, gatos e humanos e coelhos encontram-se entre 70 a 85%.

A interação do espermatozoide com a zona pelúcida, tanto antes quanto após a fertilização é crucial para a fertilidade, pois um único espermatozoide precisa penetrar a zona e ser capaz de fundir-se com o ovo, ativando-o, enquanto que os espermatozoides restantes deverão ser excluídos (HUNTER, 2003).

Kopf (1990) e Wassarman (1990) descreveram que após a fertilização a ZP3

sofre alterações bioquímicas e transforma-se em ZP3f, que perde a habilidade ligante e a capacidade de induzir a reação acrossômica, contribuindo assim, para o bloqueio à poliespermia. Kopf (1990) e Hatanaka et al. (1992), relataram a ZP1 como tendo a função de manter a estrutura da zona pelúcida ligando os heterodímeros de ZP2 e ZP3.

Cummins (2003) refere a zona pelúcida, que rodeia o ovócito ovulado de ratos, contendo três glicoproteínas, duas das quais, ZP2 e ZP3, são apontadas como receptoras espermáticas e que após a fertilização a zona pelúcida, é modificada pela clivagem da ZP2, impedindo a ligação dos demais espermatozóides.

O óvulo resume o processo da meiose da prófase I da primeira divisão meiótica assim que começa a maturar, durante a foliculogênese. O óvulo encontra-se na metáfase II da segunda divisão meiótica quando ovulado, na maioria das espécies. Entretanto, óvulos de cadelas, éguas e raposas encontram-se na primeira divisão meiótica no momento da ovulação. A maturação do óvulo e a meiose não estão completas até que a fecundação seja realizada, quando o óvulo torna-se um zigoto (HAFEZ, 2000)

De acordo com Cernach (2003), o ovócito é captado pelas tubas uterinas, quando eliminado do ovário, envolvido pela zona pelúcida e pelas células da coroa radiata. O epitélio da trompa é ciliado e o movimento dos cílios, em direção à cavidade uterina, ajuda a conduzir o gameta

feminino além do movimento peristáltico da tuba. O ovócito é transportado mais lentamente através da região da ampola e mais rapidamente através da região do istmo e parede uterina.

2.3 O ESPERMATOZÓIDE

Durante o processo da espermatogênese, as espermatogônias, células primitivas da linhagem germinal, darão origem aos espermatozóides, passando por estágios intermediários. O espermátócito primário experimenta a primeira das divisões meióticas, dando origem aos espermátócitos secundários, os quais sofrerão uma segunda divisão meiótica, originando as espermátides. A espermátide é uma célula haplóide que sofre diferenciação terminal até espermatozóide, caracterizado como uma célula haplóide madura e diferenciada (MORATALLA, 2002).

Os espermatozóides (Figura 3) são formados dentro dos túbulos seminíferos e, quando completamente formados, apresentam-se, como células alongadas constituídas de: (a) uma cabeça cuja porção anterior é recoberta pelo acrossomo, membrana que possui aproximadamente dez enzimas, as quais são liberadas durante a reação acrossômica (R.A.), pré-requisito para que o espermatozóide penetre a zona pelúcida, esta reação ocorre após a capacitação; (b) uma peça intermediária que une a cabeça à cauda e (c) cauda (HAFEZ, 2000).

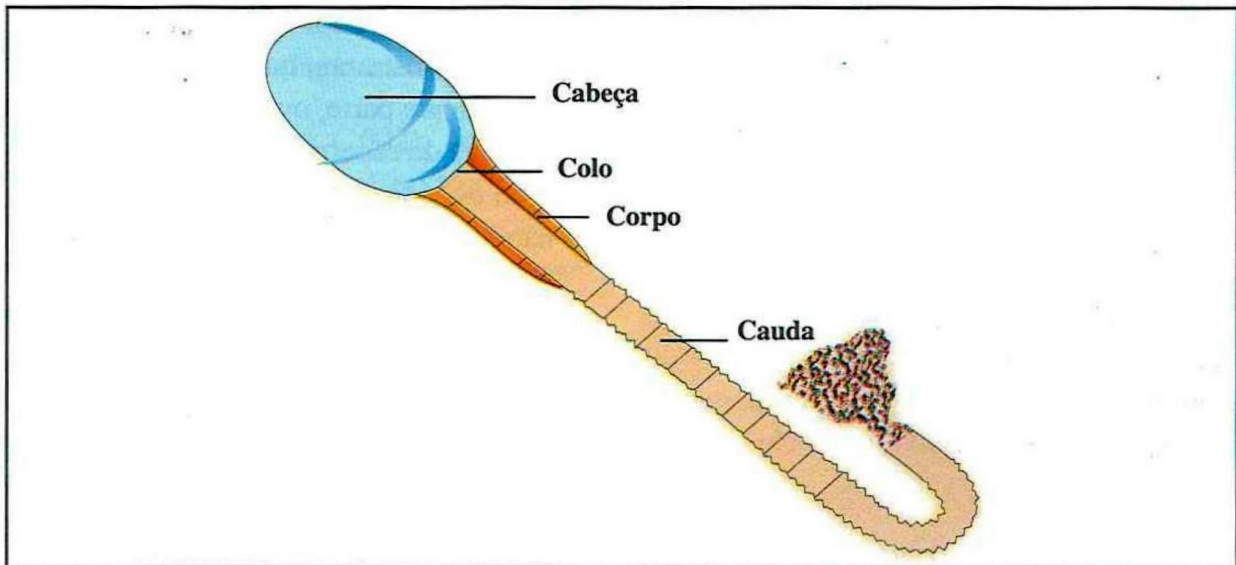


Figura 3 – Desenho esquemático de um espermatozoide

Fonte: Modificado de Wilde (2001)

Mudanças químicas na membrana conferem à cabeça do espermatozoide a habilidade para aderir-se à zona pelúcida. Uma importante mudança, que ocorre durante a maturação espermática no epidídimo, é sua habilidade para locomover-se com movimentos ativos e progressivos. Entretanto, é na membrana plasmática que ocorrem as maiores mudanças durante a maturação e, após a maturação, macromoléculas de origem epididimária são adsorvidas ou integradas na membrana plasmática, dentre estas macromoléculas estão as glicoproteínas as quais são alteradas por enzimas reguladoras da glicosilação, como a galactosil-transferase e a sialil-transferase (GONZÁLEZ, 2002).

A maturação espermática ocorre nas vias eferentes do trato genital masculino e envolve alterações relacionadas com a aquisição da capacidade de movimentar-se, alterações tanto na membrana plasmática

quanto na estrutura das organelas celulares e na estabilização da cromatina e dos componentes do flagelo (MORATALLA, 2002).

De acordo com Suarez e Ho (2003), a hiperativação é um movimento padrão observado no espermatozoide no momento e no local da fertilização em mamíferos. Trata-se de um aspecto crítico para o sucesso da fertilização, pois aumenta a habilidade do espermatozoide para se desligar da parede do oviduto, favorecendo a sua migração através do aumento da amplitude fragelar e usualmente, com ritmo assimétrico no lúmen, culminando a penetração na zona pelúcida do ovócito.

Os movimentos hiperativados dos espermatozoides foram inicialmente estudados por Yanagimachi em 1969, quando observou, “in vitro”, que o espermatozoide tornava-se extremamente ativo e que ganhava habilidade para fertilizar o ovócito.

Ele propôs que os movimentos vigorosos tinham uma função vital sobre a penetração na zona pelúcida.

Hiperativação é um processo difícil de ser definido precisamente pelas características físicas do padrão e mobilidade, entretanto sabe-se que a forma de movimentação do espermatozóide varia de acordo com a espécie e com o ambiente no qual o espermatozóide se movimenta (SUAREZ; HO, 2003).

Yanagimachi (1994) definiu motilidade ativada como o espermatozóide dentro do epidídimo sendo inerte e que quando liberados no plasma seminal, "in vivo", ou em meio fisiológico "in vitro", os espermatozóides adquirem a capacidade de se movimentar vigorosamente seguindo uma trajetória virtualmente contínua.

Ho e Suarez (2001) definiram a motilidade hiperativada, observando espermatozóides recuperados da ampola do oviduto por hora da fertilização, com um padrão de mobilidade que assemelha-se a um nado, onde a cauda ou flagelo do espermatozóide hiperativado dá voltas vigorosas e seus batimentos são usualmente assimétricos, resultando em um espermatozóide hiperativado com "nados" vigorosamente em círculos, quando observados ao microscópio e, referiram, que nos bovinos, os espermatozóides totalmente hiperativados completam um ciclo dentro de dois movimentos flagelar demonstrando a aparência de um oito.

Stauss, Votta e Suarez (1995), utilizando "in vitro" vários métodos para impedir a hiperativação em espermatozóides de

hamster, embora sem inibir a reação acrosomal, demonstraram que a hipermotilidade era em grande parte, o maior sucesso para a penetração do espermatozóide na zona pelúcida do ovócito, quando comparava-se com os não hiperativados.

Jansen (1978) e Suarez et al. (1992) e Suarez, Brookman e Lefebvre (1997) destacaram a importância da hipermotilidade quando da entrada do espermatozóide no oviduto e o muco existente no órgão. Suarez et al. (1992) observaram "in vitro", que espermatozóides de javali que não apresentavam hipermotilidade, quando encontravam o muco espesso presente no sistema genital feminino, fracassavam na penetração.

De acordo com Suarez et al (1991) e Suarez e Dai (1992), o *cumulus oophorus* tem ação semelhante à do muco dificultando a passagem do espermatozóide, referiram, ainda, que o muco aumenta a viscosidade e a elasticidade do meio aquoso no qual o espermatozóide "nada" e, observando "in vitro", espermatozóides de ratos e de hamsters, hiperativados e não hiperativados, verificaram que os hipermotivados penetravam a substância viscoelástica mais efetivamente que aqueles que não foram hiperativados e concluíram que os espermatozóides hiperativados são mais capacitados para atravessar o muco do oviduto e a matriz do *cumulus oophorus* "in vivo".

Suarez e Ho (2003) referem que espermatozóides de animais de grande porte não foram estudados dentro do oviduto, entretanto, sabe-se que eles encontram um

ambiente semelhante aquele observado em experimentos realizados com ratos.

Segundo Suarez (2002), em muitas espécies domésticas, um reservatório e espermatozóides é encontrado dentro do istmo no oviduto e que nesse local os espermatozóides são preservados assegurando que eles sejam hiperativados para fertilizar o ovócito.

Ignotz et al. (2001) relataram a dificuldade que os espermatozóides de bovinos enfrentam para fecundar o óvulo, visto que, os espermatozóides ejaculados no trato genital se ligam à moléculas de carboidratos identificadas como PDC-190, também conhecidas como BSP-A1/A2, proteínas secretadas pelas vesículas seminais, e que uma modificação ou perda da PDC-190 da superfície do espermatozóide, aparentemente, liberará o espermatozóide do epitélio e que a hiperatividade irá auxiliar a sua liberação e passagem.

De Mott e Suarez (1992), examinaram o movimento de espermatozóides de ratos dentro do oviduto e referiram que somente os espermatozóides hiperutilizados conseguem se liberar do epitélio e relataram que a hiperutilidade, semelhante a atração pelos oligossacarídeos, auxilia a liberação do espermatozóide do epitélio do oviduto.

Segundo Roncoletta (2000), o espermatozóide utiliza mecanismos alternativos para manutenção de sua viabilidade frente aos processos testiculares e posteriores a este órgão. São eles a maturação epididimária, a interação espermatozóide com o plasma seminal na ejaculação, na capacitação e

reação acrossomal no trato genital feminino e na fertilização (fusão das membranas).

2.4 A CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA

As mudanças fisiológicas que levam os espermatozóides a estarem competentes para a fertilização são coletivamente denominadas de capacitação espermática. Os espermatozóides maturados no epidídimo são capazes de movimentação ativa, mas não possuem capacidade imediata de fertilização (YANAGIMACHI, 1994; FLESCHE; GADELLA, 2000).

Os espermatozóides permanecem necessariamente no trato reprodutivo da fêmea antes de tornarem-se capazes de atrair e penetrar o óvulo, esse processo foi denominado Capacitação Espermática (HAFEZ, 2000).

De acordo com Roldan e Gomendio (1992), Gordon (1994) e Pérez⁵ et al. (1996 apud SOUZA, 2003), a capacitação espermática está relacionada a mudanças fisiológicas e bioquímicas da membrana plasmática dos espermatozóides para que ocorram interações entre eles e os ovócitos. Segundo Flesch e Gadella (2000), a capacitação espermática irá induzir mudanças na membrana plasmática do espermatozóide, que resultarão em um aumento da sua afinidade pela zona pelúcida, propiciando a fertilização.

⁵ PÉREZ, L. J.; VALCÁRCEL, A.; DELAS HERAS, M. A. et al. Evidence that frozen/thawed ram spermatozoa show accelerated capacitation in vitro as assessed by chlortetracycline assay. *Theriogenology*, Stoneham, v. 46, p. 131-140, 1996.

O local onde se inicia e termina a capacitação espermática pode variar de acordo com a espécie. Nas espécies onde o sêmen é depositado intra-útero durante a cobertura, os espermatozoides encontram-se totalmente ou em sua maioria capacitados nas partes iniciais da região ístmica do oviduto, local em que os espermatozoides fertilizadores estão armazenados (YANAGIMACHI, 1994; FLESCHE; GADELLA 2000).

Faltam esclarecimentos sobre os fatores que determinam a capacitação no trato genital feminino, mas tem sido proposto que algumas substâncias, como as catecolaminas, glicosaminoglicanos, taurina, β -amilase, β -glucuronidase, anidrase carbônica, arilsulfatase, entre outras, participam ativamente (GONZÁLEZ, 2002)

Yanagimachi (1994) referiu que nos ruminantes, onde os espermatozoides são depositados na vagina, a capacitação espermática pode ter início enquanto os espermatozoides passam através do muco cervical.

Nos mamíferos, os espermatozoides devem ser capacitados para fertilizar um ovócito, estando competentes para fertilizar quando passam pelo trato genital feminino, por uma série de reações fisiológicas relacionadas com alterações na concentração espermática, nos íons intracelulares, na fluidez da membrana plasmática, no metabolismo e na motilidade (VISCONTI et al., 1995).

Os mecanismos de capacitação são pouco conhecidos, entretanto, sabe-se que

ocorrem alterações bioquímicas e estruturais que conduzem à eliminação de componentes aderidos à membrana do espermatozoide, modificação na composição lipídica da membrana espermática, aumento da permeabilidade aos íons cálcio (Ca^{++}), alterações no pH interno e um aumento da permeabilidade e do metabolismo celular (PALMA, 2001). Flores (2000), referem que a capacitação dos espermatozoides inclui o aumento das concentrações de cálcio, alterações no pH e fosforilação de proteínas tirosina quinases (PTK), dependente do AMP cíclico.

Flesch e Gadella (2000) citam o bicarbonato, a albumina, o íon cálcio e os glicosaminoglicanos desempenhando papel de desencadeadores do processo de capacitação espermática.

Harrison (1996) e Flesch e Gadella (2000) consideram o bicarbonato como o principal componente desencadeador da capacitação, ativando diretamente uma adenilato ciclase espermatozoide específica a qual se ligará à proteína quinase A (PKA) que, via fosforilação proteína da tirosina, ativa direta ou indiretamente o deslocamento de fosfolípidos levando a uma alteração da assimetria da membrana, resultando em células espermáticas capacitadas.

Roncoletta (2000) relatou que as interações ao nível uterino enquadram eventos de membrana espermática associados a adesão dos HDLs (lipoproteínas de alta densidade) presentes no trato reprodutor feminino, mediando a troca do colesterol e fosfolípidos na membrana plasmática do espermatozoide, conferindo alteração na

permeabilidade das membranas, facilitando, desta forma, a entrada de cálcio, por ativação da fosfolipase A, desencadeando o processo de capacitação espermática e posteriormente a reação acrossomal.

A albumina está relacionada à extração do colesterol da membrana plasmática que irá ocorrer em áreas restritas da membrana, havendo, devido a isto, um deslocamento dos fosfolipídeos, levando a um rearranjo de sua arquitetura (YANAGIMACHI, 1994; FLESCHE; GADELLA, 2000). Segundo Palma (2001), a extração do colesterol desencadeia a capacitação.

O plasma seminal de bovinos (BSP) contém em maior quantidade uma família de proteínas, secretadas pela vesícula seminal denominadas BSP-A1, BSP-A2, BSP-A3 e BSP-30k-Da. Essas proteínas se unem aos fosfolipídios colina da membrana espermática, recobrando a membrana do espermatozóide e interagindo com a HDL, resultando na captação do colesterol e dos fosfolipídios, induzindo uma alteração na sua relação provocando a capacitação (PALMA, 2001).

O íon cálcio (Ca^{++}) extracelular é de extrema importância para o processo de capacitação, visto que o processo depende de alterações da permeabilidade da membrana ligadas ao transporte dos íons Ca^{++} . A modulação do íon Ca^{++} é fundamental para os espermatozóides adquirirem a capacidade de

fertilização tendo esse processo três aspectos fundamentais: (1) a presença de uma ATPase capaz de bombear o Ca^{++} para fora da célula; (2) o processo de troca do Ca^{++} (exterior) com sódio (Na^+) para o interior e; (3) canais de sódio que facilitarão a rapidez de fluxo (FRASER, 1994).

Em relatos de Ferrari⁶ e Züge⁷ (1997, 1999 apud SOUZA 2003), os glicosaminoglicanos (GAG) poderiam atuar sobre a capacitação removendo os fatores descapacitantes ou por modificações diretas na membrana plasmática, induzindo um aumento na captação de cálcio ou pela ativação da proteína quinase dependente da adenosina monofosfato cíclico (AMPC).

Sousa (2003) relatou que durante as duas primeiras horas de capacitação *in vitro* o ingresso inicial de Ca^{++} no espermatozóide é utilizado para chegar a um receptáculo localizado no acrossomo e que esse armazenamento é crítico para que se cumpra a capacitação.

2.5 A REAÇÃO ACROSSÔMICA (R.A.)

A reação acrossômica pode ser definida como a fusão da membrana plasmática do espermatozóide com a membrana do acrossomo e seu desaparecimento gradativo (CERNACH, 2003).

A reação acrossômica ocorre após a capacitação nos espermatozóides vivos e

⁶ FERRARI, S. *Meios de capacitação espermática na espécie ovina (Ovis aries, Linnaeus, 1758): reação acrossômica e penetração in vitro em oócitos zona-free de hamster*. 1997. 71f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 1997.

⁷ ZÜGE, R. M. *Avaliação do sêmen de búfalos congelados em diluidores Tes, Tris e Glicerina-gema, através do teste de penetração em oócitos zona free de hamster*. 1999. 32f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 1999.

móveis em condições fisiológicas, sendo um pré-requisito para o espermatozóide penetrar a zona pelúcida. Após a reação espermática, a membrana plasmática torna-se contínua com a membrana acrossômica externa até o limite do segmento equatorial que não está envolvido na reação (COLE; CUPPS, 1984; HAFEZ, 2000).

De acordo com Smith et al. (1985), a membrana plasmática funciona, dentre outras, como barreira de permeabilidade, capaz de separar altas concentrações extracelulares de íons, como o Ca^{++} , de concentrações intracelulares muito mais baixas.

De acordo com Moratalla (2002), a reação acrossômica do espermatozóide é um processo de secreção das enzimas contidas no acrossomo, sendo considerada um processo crucial, uma vez que é essencial para que o espermatozóide possa penetrar os envoltórios do ovócito e ser capaz de fundir-se com a membrana plasmática do ovócito.

A ruptura da membrana acrossômica leva a uma série de reações mediadas pelo cálcio no interior do espermatozóide, levando a entrada de sódio e cálcio, saindo prótons e íons potássio, tendo sido observado, também, a presença de uma chave de um oligossacarídeo para iniciar a reação, fazendo que se estenda o filamento acrossômico. Antes que ocorra a reação acrossômica, existe uma proteína reguladora que impedirá a polimerização da actina e também a ativação de uma dineína que

irá favorecer a motilidade do espermatozóide (FLORES 2000).

Thomas e Meizel (1989) referiram a glicoproteína ZP3 como iniciadora da exocitose, comportando-se como ligadora do espermatozóide. Por outro lado, foi demonstrado que a progesterona, presente na matriz do *cumulus oophorus*, estimula a exocitose.

Segundo Wilde (2000), a idéia de que a ZP3 pode induzir a reação acrossômica em mamíferos, depois que o espermatozóide se liga a esta, não foi facilmente aceita, uma vez que a reação acrossômica deveria ocorrer antes da ligação, como ocorre no ouriço do mar, e que o espermatozóide dos mamíferos utilizariam as enzimas acrossômicas para penetrar através do *cumulus*, entretanto, Endo Kopf e Schultz (1987) e Endo, Lee e Kopf (1987) e Leyton e Saling (1989) demonstraram que a porção protéica da ZP3 era capaz de induzir a reação acrossômica nos espermatozoides de ratos e que a região hidrocarbonada, essencial para a ligação do espermatozóide não é necessária para induzir a reação acrossômica.

Conforme referiu Wasserman (1988), a ZP3 é responsável pela ligação do espermatozóide e pela indução da reação acrossômica. Leyton e Saling (1989b), relataram que parece que a ZP3 induz a reação acrossômica através de ligamentos cruzados de seus receptores, uma vez que, experimentalmente, utilizando espermatozoides capacitados de ratos incubados com frag-

mentos da ZP3, que poderiam ligar-se aos espermatozoides, e que estes fragmentos da ZP3 se ligaram, e a reação não ocorreu, en-

tretanto, que quando estes fragmentos eram ligados com anticorpos contra ZP3, ocorria excitação do acrossomo (Figura 4).

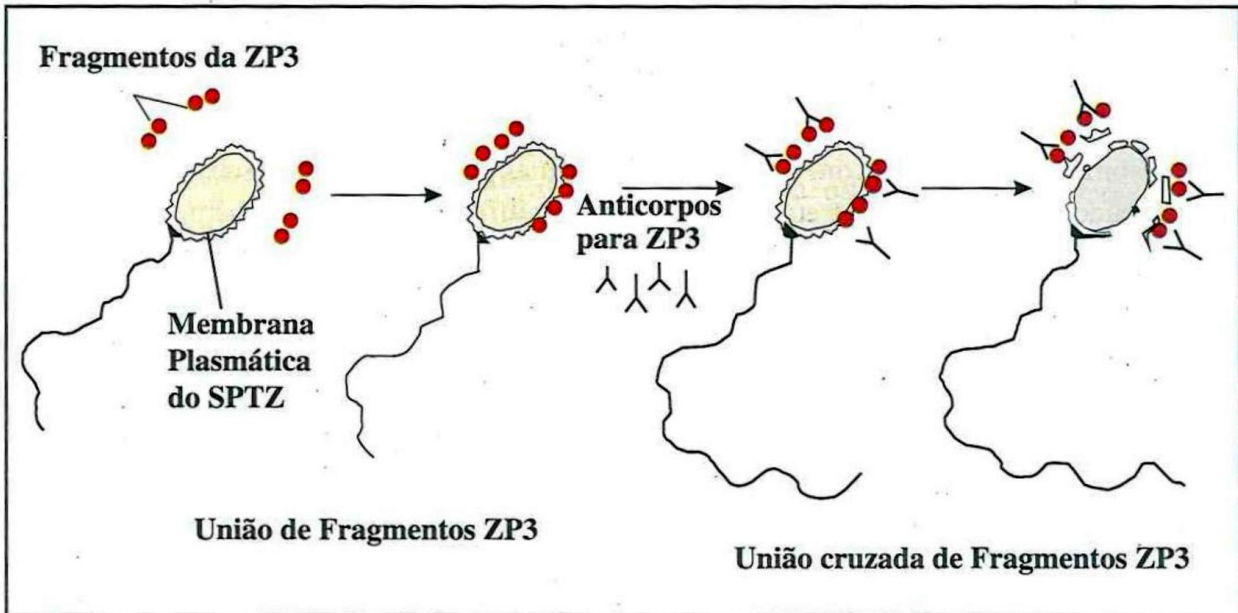


Figura 4— Demonstrativo do experimento realizado por Leyton e Saling em 1989 comprovando a importância de anticorpos contra a ZP3 na reação acrossômica.

Os indutores naturais da reação do acrossomo parecem ser substâncias presentes no *cumulus oophorus* ou na zona pelúcida. Algumas glicoproteínas da zona pelúcida (ZP3) se unem à membrana plasmática do espermatozoide sobre o capuz acrossômico, causando mudanças conformacionais que permitiriam um aumento temporário da permeabilidade da membrana ao Ca^{++} extracelular (GONZÁLEZ, 2002). Conforme relatou Fraser (1992), o Ca^{++} extracelular, também, é extremamente importante para a reação acrossômica.

O Ca^{++} funciona como mensageiro ou regulador de íons. O gradiente de con-

centração e Ca^{++} entre o fluido extracelular e o citoplasma permite que o Ca^{++} funcione como um sinalizador iônico para ativar os processos intracelulares. A bicamada lipídica da membrana celular apresenta uma baixa permeabilidade ao Ca^{++} , portanto, o influxo de Ca^{++} para o interior do citoplasma é controlado por um grupo heterogêneo de transportadores ou mediadores do Ca^{++} , pelo potencial de membrana, pelos receptores de membrana ou pelos mensageiros intracelular secundários (MILLER, 1992).

Segundo González (2002), a membrana plasmática do espermatozoide deve ter receptores que iniciam dois processos paralelos: (a) um processo não-dependen-

te de Ca^{++} que aumenta o pH intracelular mediante a entrada de íons sódio (Na^+) e a saída de hidrogênio (H^+); e (b) um processo Ca^{++} dependente que causa a despolarização da membrana. Ambos processos resultariam na abertura de canais que permitiriam o ingresso maciço de íons Ca^{++} , fato que induziria a fusão das membranas plasmática e acrossômica, terminando com a exocitose do conteúdo acrossômico. Entretanto, o fluxo de Ca^{++} não é suficiente para precipitar a reação, sendo provável que quase todos os componentes das membranas plasmática e

acrossômica, bem como íons a ambos lados da membrana, estejam envolvidos direta ou indiretamente na reação.

O influxo do Ca^{++} para o interior das células é capaz de regular a função celular através da interação com as proteínas ligadoras do Ca^{++} , como por exemplo, a calmodulina e com as proteínas quinase sensíveis ao Ca^{++} , esse influxo é capaz também de estimular respostas biológicas, como liberação de neurotransmissores, contração e secreção (ROSOL; CAPEN, 1997) (Figura 5).

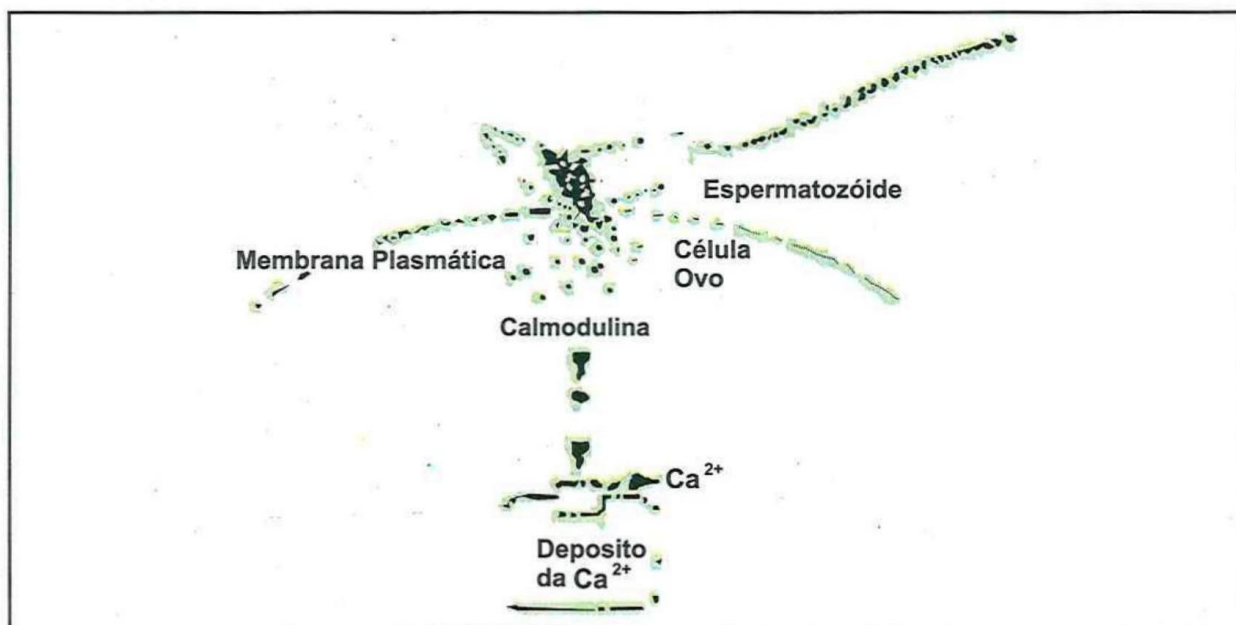


Figura 5 – Liberação do Ca dos depósitos celulares modulada pela liberação da calmodulina introduzida no citoplasma da célula ovo no momento da fusão das membranas

Fonte: Rosol e Capen (1997)

Flores (2000) refere a reação acrossômica dependente de interações multivalentes, incluindo: a) Proteínas G, onde os receptores para ZP3 ativarão uma proteína G, a qual, por sua vez ativará uma segunda proteína G, a proteína G q/11 que dará origem a segundos mensageiros

como o AMPc; b) Canais iônicos, a ZP3 estimula os canais de cálcio dependentes de voltagem tipo T, levando a despolarização da membrana de -60mV a -30mV ; c) Elevação do pH devido a contrapartida $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ dependente do sódio que levará, finalmente, a uma união de inositol trifosfato (IP3)

com seu receptor do retículo e a subsequente liberação de cálcio (Ca^{++}) intracelular e; d) Ativação das adenilciclases, proteína fosfatases, proteínas quinases A e C, tirosina quinases e fosfolipases A2, C e D, que levarão o IP3 e o Ca^{++} intracelular.

De acordo com Moratalla (2002), a exocitose envolve uma série de alterações moleculares que culminam com a fusão da membrana externa do acrossomo com a membrana plasmática, formando poros que permitirão a liberação de enzimas contidas em um grânulo acrossômico, as quais serão capazes de abrir um canal na zona pelúcida e desta forma avançar através dela.

Segundo González (2002), o acrossomo contém pelo menos 20 enzimas hidrolíticas, dentre elas a hialuronidase, acrosina, proteinase, esterase, neuraminidase, fosfatase, collagenase, β -galactosidase, fosfolipase C e outras. Cernach (2003) refere que a fusão da membrana plasmática do espermatozóide com a membrana do acrossomo e seu desaparecimento gradativo, promove a liberação de enzimas como acrosina, neuraminidase e hialuronidases, no interior do acrossomo que irão facilitar a passagem da cabeça do espermatozóide através da zona pelúcida.

2.6 INTERAÇÃO E FUSÃO DO ESPERMATOZÓIDE-OVÓCITO

A reação acrossômica é um pré-requisito para a fusão entre as membranas plasmáticas do espermatozóide e do óvulo. Após o espermatozóide ter atravessado a zona pelúcida, a cabeça move-se para dentro do espaço

vitelino e entra em contato com a membrana vitelina. A ligação do espermatozóide ocorre principalmente no segmento equatorial da cabeça, seja com as microvilosidades ou com a área de intervalos da membrana vitelina. Subseqüentemente, a superfície da região equatorial do espermatozóide é incorporada na membrana plasmática do óvulo. A região equatorial da membrana plasmática do espermatozóide torna-se entremesclada com a membrana do óvulo e pode ser identificada na membrana do óvulo até o estágio de oito células (HAFEZ, 2000) (Figura 6).

A união do espermatozóide à zona pelúcida desencadeia a reação acrossomal permitindo a penetração do espermatozóide na zona. O espermatozóide promove uma abertura na zona, através de uma combinação de força e digestão enzimática. Após a penetração na zona, o espermatozóide entrante se fixa no espaço perivitelino do ovócito entrando em contato com a membrana plasmática, onde o segmento equatorial da cabeça do espermatozóide iniciará a fusão espermatozóide-ovócito. Uma proteína do espermatozóide chamada fertilicina é considerada como mediador dessa fusão nos mamíferos. A fertilicina apresenta um domínio molecular, domínio desintegrina, que permite atuar reciprocamente com as proteínas da membrana chamadas integrinas, levando à expectativa de que as integrinas do ovócito funcionam como receptoras de espermatozóides, e que a união entre a desintegrina do espermatozóide e a integrina da membrana plasmática do ovócito é responsável pela interação dos gametas nos mamíferos (WILDE, 2001).

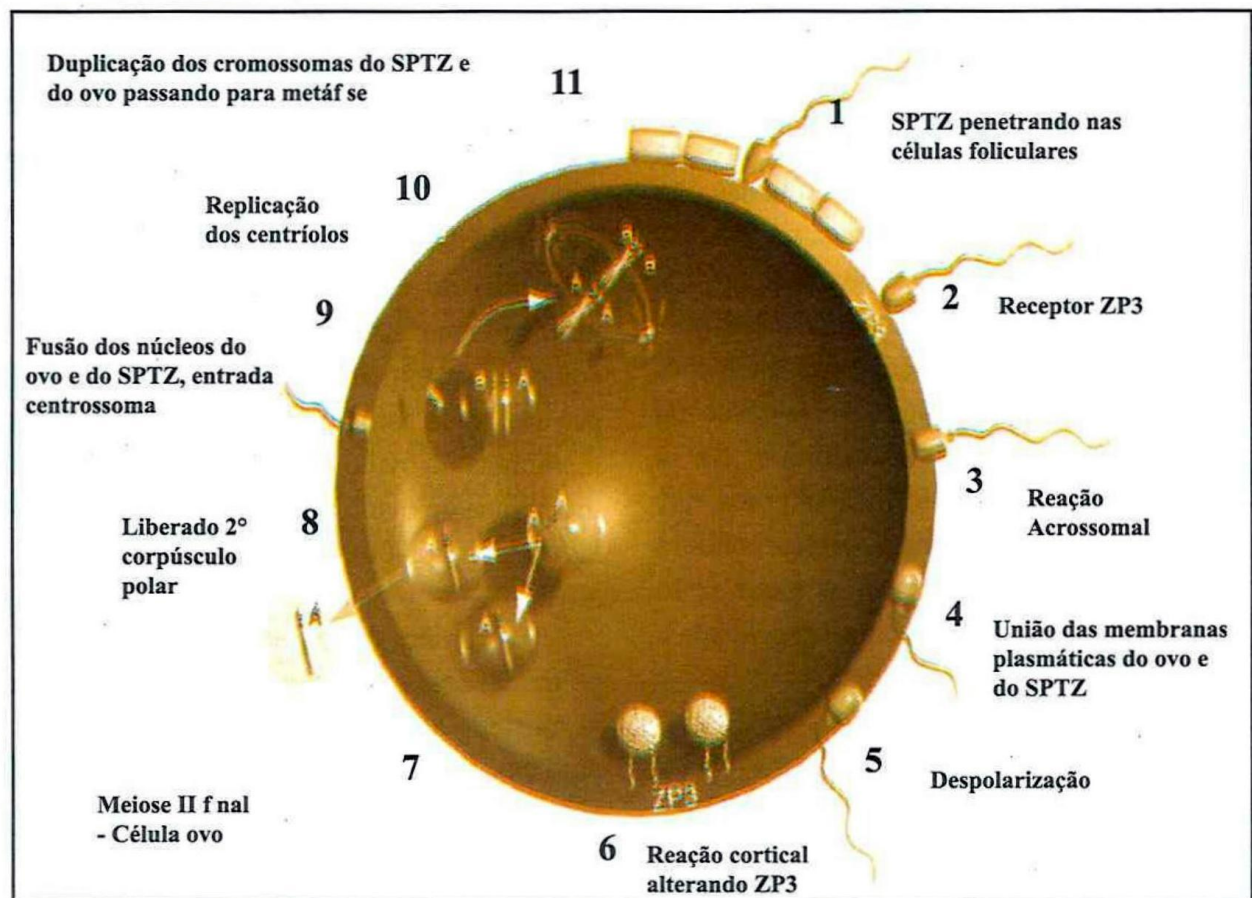


Figura 6 – Demonstrativo da interação e fusão do espermatozóide-ovócito

Fonte: Modificado de Fernandes, Soares Furtado e Corrêa Pinto (200 -).

Flores (2000) relata que logo que a reação acrossômica ocorre e o espermatozóide penetra a zona pelúcida, a membrana plasmática do óvulo e a do espermatozóide com o acrossomo reagente se unem e, posteriormente, se fusionam. Acredita-se que a fertilicina seja responsável pela união do óvulo com o espermatozóide e, possivelmente, também pela fusão de ambos.

Sathananthan e Trounson (1985) referiram que em condições fisiológicas, somente um espermatozóide se funde com a membrana e penetra no ovócito e que a entrada do espermatozóide desencadeia a exocitose dos grânulos corticais os quais irão

modificar os envoltórios do ovócito, evitando a fecundação polispérmica. Segundo Palma (2001), o espermatozóide alcançando a zona pelúcida, se une as proteínas da zona, as quais induzirão a reação acrossômica.

Segundo Yanagimachi (1994) e Bedford (1998), a penetração da zona pelúcida responde a um processo de proteólise regional limitada pelas proteínas que a constituem, e que a medida que o espermatozóide se movimenta e a reação acrossômica avança. Köle et al. (1998) relataram que a proteína ZP3 é a responsável pela união e é caracteristicamente espécie-específica.

De acordo com Fernandes et al. (2000 -) a interação do espermatozóide com receptores específicos da zona pelúcida (ZP3) desencadeia a reação acrossômica, criando-se poros que permitem a exocitose das enzimas acrosina, neuraminidase e hialuronidases que irão digerir a zona pelúcida, sendo, assim, possível a fusão do espermatozóide com a membrana plasmática do ovócito, despolarizando-a e levando à exocitose de proteases e glicosidases que alteram as glicoproteínas da superfície celular, como a ZP3, impedindo a fertilização por outros espermatozóides, ou seja, a poliespermia.

Devido a hidrólise da ZP3, por ação das enzimas proteinase e glicosidase provenientes dos grânulos corticais, os espermatozóides não têm mais pontos de ligação com a zona e são incapazes de penetrá-la. Uma demora na exocitose dos grânulos corticais atrasará a reação da zona, podendo levar a poliespermia (GONZÁLEZ, 2002).

Cernach (2003) refere o bloqueio a poliespermia envolvendo mecanismos que irão impedir a entrada de mais de um espermatozóide no ovócito, ocorrendo um bloqueio rápido que consiste na rápida despolarização da membrana plasmática do ovo e que ocorre entre 2 a 3 segundos após a fusão dos pró-núcleos, impedindo a aderência de outros espermatozóides e um segundo bloqueio, um bloqueio lento, com duas reações: a reação cortical, onde a propagação de íons cálcio ativa os grânulos corticais que se unem à membrana plasmática do ovo e liberam seu conteúdo para o espaço perivitelino, os grânulos exercem uma força

osmótica, tornam-se hidratados e afastam a zona pelúcida da membrana do ovócito; e a reação da zona, onde as enzimas depositadas no espaço perivitelino se difundem pela zona pelúcida e hidrolisam os receptores (moléculas ZP3), dessa forma impedindo que outros espermatozóides se liguem à zona pelúcida.

De acordo com González (2002), existem duas hipóteses para explicar a passagem dos espermatozóides pela zona pelúcida: (a) uma hipótese mecânica, que estabelece que as enzimas acrossômicas teriam a única função de iniciar a reação do acrosomo, não tendo nada a ver com a penetração do espermatozóide através da zona, ou seja, o espermatozóide atravessa a zona batendo vigorosamente a cauda, movimento essencial para a penetração, ajudado por movimentos laterais e antero-posteriores da cabeça, sendo, portanto, o único propósito da reação acrossômica o de expor a membrana interna do acrosomo *perforatorium*, parecendo que o espermatozóide “corta” a zona ao invés de dissolvê-la e; (b) uma hipótese enzimática, onde a cada passo da penetração espermática seria mediado por enzimas, como a hialuronidase que facilita a passagem pelo *cumulus oophorus*, ao passo que outras enzimas atuarão na adesão do espermatozóide à zona; a acrosina hidrolisa glicoproteínas para amaciar a zona. Entretanto, as evidências indicam que o mais provável é que os espermatozóides usem tanto os meios mecânicos como enzimáticos para penetrar a zona.

Sueldo et al. (1993) citaram que, em humanos, a progesterona aumenta a quanti-

dade de espermatozoides com reação acrossômica e hipermotilidade e o número de espermatozoides com habilidade para se ligar e penetrar a zona pelúcida.

3 CONCLUSÃO

A fertilização é um processo basicamente espécie-específico;

Várias interações entre espermatozoide e ovócito estão envolvidas no processo da fertilização nos mamíferos;

Os mecanismos da capacitação espermática são pouco conhecidos, todavia, sabe-se que o espermatozoide para fecundar o óvulo dos mamíferos, deverá passar por processos de capacitação e de reação acrossômica para interagir com a zona pelúcida do óvulo proporcionando a fusão dos gametas;

Na maioria das espécies, o óvulo encontra-se na metáfase II da segunda divisão meiótica, exceto nas cadelas, éguas e raposas, onde encontra-se na primeira divisão meiótica;

As glicoproteínas ZPA, ZPB e ZPC, que formam a zona pelúcida, são fundamentais para a realização do processo da fertilização;

O íon Ca^{++} é muito importante durante todo o processo da capacitação e da reação acrossômica;

Para que o espermatozoide possa interagir com o ovócito é extremamente impor-

tante que ele esteja capacitado e tenha sofrido a reação acrossômica (hipótese mecânica) e que, cada passo da penetração seja mediado por enzimas (hipótese enzimática) que facilitam a passagem do espermatozoide pelas barreiras encontradas no processo da fecundação.

A fertilicina, proteína espermática é responsável pela união do óvulo com o espermatozoide, e que após a sua entrada, desencadeia a exocitose dos grânulos corticais que modificam os envoltórios do ovócito evitando a poliespermia.

REFERÊNCIAS

BEDFORD, J. M. Mammalian fertilization misread? Sperm penetration of the eutherian zona pellucida is unlikely to be a lytic event. *Biol. Reprod.*, v. 59, p.1275-1287, 1998.

BERGER, T. Fertilization in ungulates. *Anim. Reprod. Scien.*, v.42, p.351-360, 1996.

_____; DAVIS, A.; WARDRIP, N. J.; HEDRICK, J. L. Sperm binding to the pig zona pellucida and inhibition of binding by solubilized components of the zona pellucida. *J. Reprod. Fertil.*, v.86, p.559-565, 1989.

BLEIL, J. D.; WASSARMAN, P. M. Mammalian sperm-egg interaction: identification of a glycoprotein in mouse egg zonae pellucidae possessing receptor activity for sperm. *Cell*, v.20, p.873-882, 1980.

- BURKS, D. J.; SALING, P. M. Molecular mechanisms of fertilization and activation of development. *Anim. Reprod. Sci.*, v.28, p.79-86, 1992.
- BYSKOV, A. G.; HAFNE, A. L.; YDING ANDERSEN, C.; TVERDAL, A. Maturation of oocytes and environmental influences. *Reprod. Dom. Anim. Abstract H1*, v.35, p. 7, 2000.
- CERNACH, M. C. S. P. Fecundação e segmentação do ovo. 2003. Disponível em: <[www.unimes.br/aulas/MEDICINA/Aulas2003/1ano/Biologia_Molecular_\(Genetic...\)](http://www.unimes.br/aulas/MEDICINA/Aulas2003/1ano/Biologia_Molecular_(Genetic...))>. Acesso em: 07 set. 2003.
- COLE, H. H.; CUPPS, P. T. *Reproducción de los animales domésticos*. Zaragoza: Acribia, 1984. 551p.
- CUMMINS, J. M. Fertility and Taxon-Specific binding persist after replacement of mouse sperm receptors with human homologs. *Develop. Cell*, v.5, p.33-43, 2003.
- DeMOTT, R. P.; SUAREZ, S. S. Hyperactivated sperm progress in the mouse oviduct. *Biol. Reprod.*, v.46, p.779-785, 1992.
- ENDO, Y. G.; KOPF, G. S.; SCHULTZ, R.M. Effect of phorbol ester on mouse eggs: Dissociation of sperm receptor activity from acrosome reaction inducing activity of the mouse zona pellucida protein, ZP3. *Dev. Biol.*, v.123, p.574-577, 1987.
- ENDO, Y. G.; LEE, M. A.; KOPF, G. S. Evidence for the role of a guanosine nucleotide binding regulatory protein in the zona pellucida induced mouse sperm acrosome reaction. *Dev. Biol.*, v. 119, p.210-216, 1987.
- FERNÁNDEZ, J. S.; SOARES FURTADO, J. M.; CORREIA-PINTO, J. *Fisiologia do sistema reprodutor feminino*. S.l.: Universidade do Minho. SOF-Fisiologia [200-]. Disponível em: <www.FisiolApRepFem>. Acesso em: 07 set. 2003.
- FLESCH, F. M.; GADELLA, B. M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in process of fertilization. *Bioch. Biophys. Acta*, v.1469, p.197-235, 2000.
- FLORES, J. L. U. Fertilización mamífera: aspectos moleculares de la adhesión de los gametos, exocitosis y fusión. *Boletín Genética y Desarrollo*, n.3, ago. 2000. Disponível em: <www.geocities.com/ccgeaqp/boletin3.htm>. Acesso em: 07 set. 2003.
- FLORMAN, H. M.; STOREY, B. T. Mouse gamete interactions: the zona pellucida is the site of the acrosome reaction leading to fertilization in vitro. *Dev. Biol.*, v.91, p.121-130, 1982.
- FRASER, L. R. Na⁺ requirements for capacitation and acrosomal exocytosis in mammalian sperm. *Int. Rev. Cyt.*, v. 149, p.1-44, 1994.
- _____. Requirements for successful mammalian sperm capacitation and fertilization. *Arc. Pathol. Lab. Med.*, v.116, p. 345-350, 1992.

- GONZÁLEZ, F. H. D. *Introdução a endocrinologia na reprodução veterinária*. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina Veterinária. 2002, p.53-57. Disponível em: <www5.ufrgs.br/bioquimica/posgrad/endocrino/endocrinolvet.pdf>. Acesso em: 08 set. 2003.
- GORDON, I. *Laboratory production of cattle embryos*. Wallingfort: CAB International, 1994. cap.3.
- HAFEZ, E. S. E. *Reproduction in farm animals*. 7.ed. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins, 2000. p.188-212.
- HARRISON, R. A. Capacitation mechanisms, and the role of capacitation as seen in eutherian mammals. *Reprod. Fertil. Develop.*, v.8, p.581-594, 1996.
- HATANAKA, Y.; NAGAI, T.; TOBITA, T.; NAKANO, M. Changes in properties and composition of zona pellucida of pigs during fertilization in vitro. *J. Reprod. Fertil.*, v.95, p.431-440, 1992.
- HO, H-C.; SUAREZ, S. S. An inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-gated intracellular Ca⁺⁺ store is involved in regulating sperm hyperactivated motility. *Biol. Reprod.*, v.65, p.1606-1615, 2001.
- HUNTER, R. H. F. Reflections upon Sperm-Endosalpingeal and Sperm-Zona Pellucida interactions in vivo and in vitro. *Reprod. Dom. Anim.*, v.38, n.2, p.147-154, 2003.
- IGNOTZ, G. G.; LO, M. C.; PEREZ, C. L.; GWATHMEY, T. M.; SUAREZ, S. S. Characterization of a fucose-binding protein from bull sperm and seminal plasma that may be responsible for formation of the oviductal sperm reservoir. *Biol. Reprod.*, v.64, p.1806-1811, 2001.
- JANSEN, R. P. S. Fallopian tube isthmic mucus and ovum transport. *Science*, v.201, p.349-351, 1978.
- KÖLLE, S.; SINOWATZ, F.; BOIE, G.; PALMA, G. Differential expression of ZPC in the bovine ovary, oocyte, and embryo. *Mol. Reprod. Dev.*, v.49, p. 435-443, 1998.
- KOPF, G. S. Zona pellucida mediated signal transduction in mammalian spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, p.33-49, 1990. Suppl.42.
- LEYTON, L.; SALING, P. Evidence that aggregation of mouse sperm receptors by ZP3 triggers the acrosome reaction. *J. Cell Biol.*, v.108, p.2163-2168, 1989a.
- _____ ; _____. 95kd sperm proteins bind ZP3 and serve as tyrosine kinase substrate in response to zone binding. *Cell*, v. 57, p.1123-1130, 1989b.
- MILLER, R. J. Voltage sensitive Ca⁺⁺ channels. *J. Biol. Chem.*, v.267, p.1403-1406, 1992.
- MORATALLA, N. L. *Fecundación in vitro* 2002. Disponível em: <www.arvo.net/includes/documento.php?ldDoc=5522&els ec+1001>. Acesso em: 13 set. 2003.

- PALMA, G. A. *Biotechnology de la reproducción*. S. l.: Minera, 2001. p.225-300.
- ROLDAN, E. R. S.; GOMENDIO, M. Morphological, functional and biochemical changes underlying the preparation and selection of fertilising spermatozoa *in vivo*. *Anim. Reprod. Science*, v.28, p.69-78, 1992.
- RONCOLETTA, M. *A membrana de espermatozoides e sua relação com o potencial de desempenho reprodutivo do macho*. Jaboticabal: FCAVJ/UNESP. Departamento de Reprodução Animal, 2000. Disponível em: <www.GERA%20Brasil%20>. Acesso em: 07 set. 2003.
- ROSOL, T. J.; CAPEN, C. C. Calcium – Regulating hormones and diseases of abnormal mineral (calcium, phosphorus, magnesium) metabolism. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. *Clinical biochemistry of domestic animals*. San Diego: Academic Press, 1997. cap.23.
- SATHANANTHAN, A., H.; TROUNSON, A. O. The human pronuclear ovum: fine structure of monospermic and polyspermic fertilization *in vitro*. *Gamete Research*, v.12, p.385-398, 1985.
- SINOWATZ, F.; KÖLLE, S.; TOPFER-PETERSEN, E. Biosynthesis and expression of zona pellucida glycoproteins in mammals. *Cells Tissues Organs*, v.168, p.24-35, 2001
- _____; TOPFER-PETERSEN, E; KÖLLE, S.; PALMA, G. Functional morphology of zona pellucida. *Anat. Histol. Embryol.*, v.5, p.257-263, 2001.
- SINOWATZ, F.; WESSA, E.; NEUMÜLLER, C.; PALMA, G. On the species specificity of sperm binding and sperm penetration of zona pellucida. *Reprod. Dom. Anim.*, v.38, n.2, p.141-146, 2003.
- SMITH, E. L.; HILL, R. L.; LERMAN, I. R.; LEFKOWITZ, R. J. et al. *Bioquímica mamíferos*. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1985. p.328-329.
- SOUSA, D. B. *Eventos envolvidos no processo da capacitação espermática in vivo*. Botucatu: UNESP Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2003. 27 f. (Monografia apresentada a disciplina Seminários II, Curso de Doutorado).
- STAUSS, C. R.; VOTTA, T. J.; SUAREZ, S. S. Sperm motility hyperactivation facilitates penetration of the hamster zona pellucida. *Biol. Reprod.*, v. 53, p.1280-1285, 1995.
- SUAREZ, S. S. Formation of a reservoir of sperm in the oviduct. *Reprod. Dom. Anim.*, v.37, p.140-143, 2002.
- _____; DAÍ, X. B. Hyperactivation enhances mouse sperm capacity for penetrating viscoelastic media. *Biol. Reprod.*, v.46, p.686-691, 1992.
- _____; HO, H-C. Hyperactivated motility in sperm. *Reprod. Dom. Anim.*, Berlin, v.38, p.119-124, 2003.
- _____; BROCKMAN, K.; LEFEBVRE, R. Distribution of mucus and sperm in bovine oviducts after artificial insemination. *Biol. Reprod.*, v. 56, p.447-453, 1997.

SUAREZ, S. S.; DAÍ, X. B.; DeMOTT, R. P.; REDFERN, K.; MIRANDO, M. A. Movement characteristics of boar sperm obtained from the oviduct or hyperactivated *in vitro*. *J. Androl.*, v.13, p.75-80, 1992.

_____; KATZ, D. F.; OWEN, D. H.; ANDREW, J. B.; POWELL, R. L. Evidence for the function of hyperactivated motility in sperm. *Biol. Reprod.*, v.44, p.375-381, 1991.

SUELDO, C. E.; OEHNINGER, S.; SUBIAS, E.; MAHONY, M. et al.. Effect of progesterone on human zona pellucida sperm binding and oocyte penetrating capacity. *Fertil. Steril.*, v.60, n.1, p.137-140, 1993.

THOMAS, P.; MEIZEL, S. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis in human sperm stimulated with follicular fluid or progesterone is dependent upon Ca²⁺ influx. *Biochem. J.*, v.264, p.539-546, 1989.

URCH, U. A. Biochemistry and function of acrosin. In: WASSARMAN, P. M. *Elements of mammalian fertilization: basic concepts*. Boca Raton: CRC Press, 1991. v.1. p.233-248.

VÍSCONTI, P.E.; BAILEY, J.J.; MOORE, G. D.; PAN, D. et al. Capacitation of mouse spermatozoa: Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development*, v. 121, p.1129-1150, 1995.

WASSARMAN, P. M. Fertilization in mammals. *Science Am.*, v.256, p.78-84, 1988.

WASSARMAN, P. M. Regulation of mammalian fertilization by zona pellucida glycoproteins. *J. Reprod. Fertil.*, p.79-87, 1990. Supl. 42.

WILDE, O. R. *Activación de la reacción acrosómica en mamíferos. Lecturas seleccionadas de reproducción animal*. Disponível em: <www.unt.edu.ar/faz/labrydea/Reaccion%20acrosomica.htm>. Acesso em: 13 set. 2003.

_____. *Fertilización: reconocimiento espermatozoide/Huevo y contacto. Lecturas seleccionadas de reproducción animal*. S. l: Facultad de Agronomía y Zootecnia, 2001. Disponível em: <<http://www.unt.edu.ar/faz/labrydea/Fertilizacion.htm>>. Acesso em: 08 set. 2003.

YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: KNOBIL, E.; NEIL, J. *The physiology of reproduction*. 2 nd ed. New York: Raven Press, 1994. p.189-317.