

**Daniel Bartoli de Sousa**

**Eventos envolvidos no processo da capacitação espermática *in vivo***

Monografia apresentada como parte integrante da disciplina Seminários II do Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista - UNESP, Campus de Botucatu, curso Doutorado.

Área de concentração: Reprodução Animal

**Botucatu - SP**

**2003**

**Daniel Bartoli de Sousa**

**Eventos envolvidos no processo da capacitação espermática *in vivo***

Monografia apresentada como parte integrante da disciplina Seminários II do Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista - UNESP, Campus de Botucatu, curso Doutorado.  
Área de concentração: Reprodução Animal

**Docentes Responsáveis: Profa. Adj. Dra. Maria Denise Lopes**

**Prof. Adj. Dr. Sony Dimas Bicudo**

Botucatu - SP

2003

## Índice

Abreviaturas .....	4
1. Introdução.....	4
2. Revisão de literatura.....	4
2.1. Membranas Celulares (ALBERTS et al., 1994).....	4
2.1.1. Bicamada lipídica.....	5
2.1.2. Proteínas de membrana .....	9
2.2. Capacitação.....	13
2.2.1. Local da capacitação .....	14
2.2.2. Especificidade e especialidade do genital feminino em relação à capacitação .....	15
2.2.3. Fatores desencadeadores da capacitação.....	16
2.2.3.1. Bicarbonato.....	16
2.2.3.2. Albumina .....	17
2.2.3.3. Íon cálcio – Ca <sup>2+</sup> .....	17
2.2.3.4. Glicosaminoglicanos .....	18
2.2.3.5. Espécies reativas de oxigênio - ROS .....	18
2.2.4. Eventos que ocorrem no espermatozóide durante a capacitação.....	18
2.2.4.1. Mudanças nos íons intracelulares .....	18
2.2.4.2. Mudanças no metabolismo .....	20
2.2.4.3. Mudanças nos sistemas adenilatociclase-AMPC.....	20
2.2.4.4. Mudanças no núcleo.....	21
2.2.4.5. Mudanças no acrossomo.....	21
2.2.4.6. Mudanças na membrana plasmática .....	22
3. Considerações Finais .....	25
4. Referências .....	25

## Abreviaturas

- mM – milimolar
- $\mu\text{g}$  – micrograma
- nm – nanômetro
- AMPc – monofosfato de adenosina cíclico
- $\text{Ca}^{2+}$  – íon cálcio
- $\text{Cl}^-$  – íon cloro
- $\text{CO}_2$  – dióxido de carbono
- GIFT – transferência intrafalopaiana de gametas
- GPI – glicosilfosfatidil inositol
- $\text{HCO}_3^-$  – Bicarbonato
- IMPs – partículas intramembranas
- IP3 – inositol trifosfato
- $\text{K}^+$  – íon potássio
- kDa – kilodáton
- $\text{Na}^+$  – íon sódio
- PKA – proteína kinase A
- PKA – proteína kinase A
- ROS – espécies reativas de oxigênio
- SH – radicais sulfidríla
- S-S – pontes de dissulfeto
- $\text{Zn}^{2+}$  – íon zinco

## **1. Introdução**

Os espermatozoides dos mamíferos após a ejaculação não são capazes de fecundar os oócitos, mesmo apresentando motilidade e aparente normalidade morfológica, adquirindo esta capacidade no trato genital feminino em um processo tempo dependente denominado capacitação espermática (PÉREZ et al., 1996, PEREIRA et al., 2000). Os primeiros relatos da capacitação espermática foram descritos independentemente por Austin na Austrália e Chang nos Estados Unidos em 1951 (GORDON, 1994, BAZER et al., 1995, HARRISON, 1996).

A capacitação espermática está relacionada a mudanças fisiológicas e bioquímicas da membrana plasmática dos espermatozoides para que ocorram interações entre os eles e os oócitos. Entre os processos envolvidos podem-se verificar modificações como da fluidez da membrana, do fluxo de íons, entre outros (ROLDAN & GOMENDIO, 1992, GORDON, 1994, PÉREZ et al., 1996).

Frente ao exposto, esta monografia tem como principal objetivo apresentar os eventos relacionados ao processo de capacitação espermática, além de apresentar uma breve revisão sobre membranas biológicas (plasmática).

## **2. Revisão de literatura**

### **2.1. Membranas Celulares (ALBERTS et al., 1994)**

As membranas celulares são essenciais para a vida da célula. A membrana plasmática define a célula, seus limites e mantém as diferenças entre o citoplasma e o meio extracelular.

Em todas as células, a membrana plasmática possui proteínas que agem como sensores de sinais externos, avisando à célula a mudar seu comportamento em resposta às alterações do meio. Estas proteínas sensoriais ou receptoras transferem informações antes que íons ou moléculas atravessem a membrana.

Apesar de diferenças funcionais, toda membrana biológica tem uma estrutura geral comum: uma camada fina de lipídeos e proteínas ligadas entre si por interações

não covalentes. As membranas celulares são dinâmicas estruturas fluidas e a maioria das moléculas é capaz de se mover no plano da membrana. As camadas de lipídeos são arranjadas como uma dupla camada de aproximadamente 5 nm de espessura que fornece a estrutura básica da membrana e serve como uma barreira relativamente impermeável à passagem da maioria das moléculas solúveis em água.

As moléculas de proteína “dissolvem” a bicamada lipídica mediando a maioria das funções da membrana (transporte específico de moléculas). Algumas servem como sítios estruturais que conectam a membrana ao citoesqueleto e/ou a matriz extracelular ou célula adjacente enquanto outras servem de receptores para detectar e traduzir sinais químicos do ambiente celular.

As membranas celulares são estruturas assimétricas. A composição de lipídeos e proteínas da face interna e externa difere, relacionando-se com o modo que exercem suas funções.

### **2.1.1. Bicamada lipídica**

Todas moléculas lipídicas das membranas celulares são anfipáticas ou anfifílicas, isto é, têm uma extremidade hidrofílica (polar) e outra hidrofóbica (não polar). As mais abundantes são os fosfolipídeos que têm uma cabeça polar e duas caudas hidrofóbicas de hidrocarbonos. A cauda geralmente é de ácidos graxos que podem diferir em tamanho (14 a 24 átomos de carbono). Uma das caudas geralmente tem uma ou mais dupla *cis* ligação, isto é, é insaturada. Esta dupla ligação cria uma dobra na cauda. A diferença no tamanho e saturação das caudas de ácidos graxos é importante devido influenciarem a habilidade das moléculas dos fosfolipídeos acomodarem-se umas nas outras e por esta razão eles afetam a fluidez da membrana (ALBERTS et al., 1994, FLESCH & GADELLA, 2000).

É a forma e a natureza anfipática das moléculas de lipídeos que causam a formação espontânea da bicamada em solução aquosa, pois quando elas são circundadas por água, tendem a agregar-se, com suas caudas hidrofóbicas direcionadas para o interior e suas cabeças hidrofílicas são expostas à água.

Dependendo da forma, elas podem fazer isto de dois modos. Podem formar micelas esféricas com as caudas para o interior ou formar uma lâmina bimolecular ou bicamada, com as caudas hidrofóbicas entre as cabeças hidrofílicas (ALBERTS et al., 1994).

Além disso, esta bicamada lipídica tende a fechar-se e formar compartimentos eliminando margens livres quando as caudas hidrofóbicas estão em contato com a água. Pela mesma razão, compartimentos formados pela bicamada tendem a se restabelecer quando são rompidos (ALBERTS et al., 1994).

Uma das mais importantes características das membranas é a fluidez, essencial para suas funções (ALBERTS et al., 1994).

O componente lipídico da membrana é um fluido bidimensional em que os constituintes moleculares são livres para movimentarem-se lateralmente, sendo os fosfolipídeos normalmente confinados a sua própria monocamada (ALBERTS et al., 1994). Segundo Flesch & Gadella (2000), esta restrição deve-se à organização da membrana plasmática em domínios e subdomínios.

A fluidez correta da membrana, que é dependente de sua composição e sua temperatura, é biologicamente importante para processos de transporte da membrana e atividade enzimática, podendo ser cessados quando a viscosidade da bicamada é aumentada (ALBERTS et al., 1994).

Uma bicamada sintética faz mudanças de um estado líquido para o estado cristalino rígido (gel) como uma característica do ponto de congelamento. Esta mudança no estado é chamada de fase de transição e a temperatura que isto ocorre é mais baixa (isto é, a membrana fica mais difícil de congelar) se a cadeia de hidrocarbonetos for curta ou tiver duplas ligações. Uma cadeia curta reduz a tendência das caudas de hidrocarbonetos de se interagirem e a ligação dupla *cis* produz uma dobra na cadeia de hidrocarbonos fazendo com que seja mais difícil de agregá-los, mantendo a membrana fluida a baixas temperaturas (GRAHAM & FOOTE, 1987; ALBERTS et al., 1994).

Entretanto, a bicamada lipídica não é composta exclusivamente de fosfolipídeos. Há colesterol e glicolipídeos (ALBERTS et al., 1994).

As membranas plasmáticas eucarióticas têm uma grande quantidade de colesterol, sendo mais de uma molécula para cada molécula de fosfolípido. O colesterol acentua as propriedades de permeabilidade da bicamada. Eles se orientam com seus grupos hidroxil ( $\text{OH}^-$ ) perto do grupo de cabeças polares das moléculas de fosfolípidos. Para sua rigidez, anéis esteróides como lâminas interagem e parcialmente imobilizam aquelas regiões das cadeias de hidrocarbonos que são próximas aos grupos de cabeças polares. Pela redução da mobilidade dos primeiros grupos  $\text{CH}_2$  da cadeia de hidrocarbonos das moléculas e fosfolípidos, o colesterol faz a bicamada lipídica menos deformável nesta região, diminuindo a permeabilidade a pequenas moléculas solúveis em água (ALBERTS et al., 1994).

As altas concentrações de colesterol nas membranas plasmáticas tendem a fazer a bicamada menos fluida, prevenindo a ligação e cristalização das cadeias de hidrocarbonos. São maneiras de inibir a possibilidade da fase de transição (GRAHAM & FOOTE, 1987; ALBERTS et al., 1994).

A concentração de colesterol e de fosfolípidos varia conforme a espécie (TAB. 01).

Tabela 01: Porcentagem de colesterol e fosfolípidos nos espermatozoides mamíferos.

<b>Espécie</b>	<b>Colesterol</b> ( $\mu\text{M}/10^9$ sptz*)	<b>Fosfolípidos</b> ( $\mu\text{M}/10^9$ sptz*)	<b>Colesterol:fosfolípidos</b> <b>relação molar</b>	<b>% molar de</b> <b>colesterol</b>
<b>Carneiro</b>	0,722	1,920	0,38	27
<b>Touro</b>	0,893	1,991	0,45	31
<b>Coelho</b>	1,411	1,607	0,88	62
<b>Homem</b>	1,438	1,447	0,99	50

\*-sptz – espermatozóide

Watson, 1981

Os principais fosfolípidos são a fosfatidilcolina; esfingomiéline; fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina que juntos representam mais de 50% dos lípidos de membrana. Um outro lípido, o inositol, está presente em pequena quantidade, sendo importante para a sinalização celular (ALBERTS et al., 1994).

As duas metades da bicamada são diferentes devido à disposição dos quatro fosfolípidos principais, sendo a fosfatidilserina o único com carga negativa (ALBERTS et al., 1994).

Conforme a espécie, os espermatozóides possuem uma proporção diferente na composição dos fosfolípidos de membrana (TAB. 02).

Tabela 02: Composição dos fosfolípidos dos espermatozóides de diferentes espécies.

	<b>Carneiro</b>	<b>Touro</b>	<b>Cachaço</b>	<b>Cão</b>	<b>Homem</b>
<b>Fosfatidilcolina</b>	17,3	15,5	37,4	27,5	28,8
<b>Colina fosfoglicerídeos</b>	40,8	44,8	9,8	3,6	2,7
<b>Esfingomielina</b>	11,4	10,5	12,6	18,3	21,4
<b>Fosfatidilserina</b>	1,0	1,8	2,4	3,6	2,7
<b>Fosfatidiletanolamina</b>	5,6	3,5	13,5	20,1	21,6
<b>Fosfatidilinositol</b>	Nd*	Nd*	Nd*	2,7	1,9

\*- não detectado ou em concentração abaixo de 1%

Watson, 1981

Nos bovinos e ovinos, 45% são fosfoglicerídeos enquanto nas outras espécies a fração de fosfoglicerídeos é de 20% ou menos (WATSON, 1981).

Enquanto que os espermatozóides bovino e ovino são distinguíveis de outras espécies pela alta proporção de colina fosfoglicerídeos, os espermatozóides dos suínos são aparentemente similares na distribuição de fosfolípidos (WATSON, 1981).

Os fosfolípidos não dão indicativos da constituição dos ácidos graxos que influenciam as características de membrana. O ácido docosahexaenóico (22:6) foi relatado como sendo o principal fosfolípidos ligado aos ácidos graxos em quase todas as espécies de mamíferos examinadas com exceção do coelho, cão e o macaco *Rhesus* em que o ácido docosopentaenóico (22:5) e/ou ácido palmítico (16:0) predominam (WATSON, 1981).

A assimetria da membrana é importante funcionalmente. A enzima proteína Kinase C, por exemplo, é ativada em resposta a sinais extracelulares. Ela se liga a face citoplasmática da membrana plasmática onde a fosfatidilserina é concentrada e requer

a carga negativa do fosfolípido para atuar. Similarmente, o inositol está concentrado na metade citoplasmática da membrana (ALBERTS et al., 1994).

As moléculas lipídicas que mostram a mais estreita e consistente assimetria na distribuição da membrana celular são os açúcares contendo moléculas de lipídeos chamados de glicoproteínas. Estas moléculas são encontradas exclusivamente na metade não citoplasmática da bicamada lipídica e constituem cerca de 5% dos lipídeos na monocamada externa (ALBERTS et al., 1994).

### **2.1.2. Proteínas de membrana**

Apesar da estrutura básica das membranas biológicas ser a bicamada lipídica, a maioria das funções específicas é conduzida por proteínas. A quantidade e o tipo das proteínas na membrana são altamente variáveis. O usual é que 50% da massa da membrana ser de proteínas. Como a membrana lipídica, a proteína de membrana geralmente tem cadeias de oligossacarídeos ligados a ela. Então a superfície que a célula apresenta para o exterior consiste largamente de carboidratos que formam o **glicocálix** (ALBERTS et al., 1994).

Como os lipídeos, as proteínas transmembranais são anfipáticas. Sua região hidrofóbica passa através da membrana e interage com as caudas hidrofóbicas das moléculas de lipídeos no interior da bicamada. Suas regiões hidrofílicas são expostas à água em um ou outro lado da membrana. A hidrofobicidade de algumas proteínas é aumentada pela ligação covalente com cadeias de ácidos graxos que estão dentro do citoplasma da bicamada lipídica. Outras proteínas são localizadas inteiramente no citoplasma e são associadas com a bicamada somente por meio de uma ou mais ligações covalentes nas cadeias de ácidos graxos ou outro tipo de cadeia lipídica chamada grupo prenil. Há proteínas que estão inteiramente expostas a face externa da célula, sendo ligadas à bicamada somente por ligações covalentes (via oligossacarídeos específicos) ao fosfatidilinositol da monocamada lipídica externa (ALBERTS et al., 1994).

Algumas proteínas que não entraram no interior hidrofóbico da bicamada são ligadas com uma ou outra face da membrana por interações não covalentes com outras proteínas de membrana. Muitas podem sair da membrana por extração como a exposição a forças iônicas fortes ou fracas ou pH extremo que interferem com as interações proteínas-proteínas mas deixam a bicamada intacta. Estas proteínas são chamadas de periféricas. Em contraste, proteínas transmembranais, muitas proteínas ligadas à bicamada pós-grupos lipídicos e outras firmemente ligadas não podem ser separadas por este método e são chamadas de integrais (ALBERTS et al., 1994).

A proteína ligada à membrana e associada com a bicamada lipídica, usualmente reflete a função da proteína. Somente as proteínas transmembranais podem funcionar dos dois lados da bicamada ou transportar moléculas através dela (ALBERTS et al., 1994).

A proteína transmembranais tem uma orientação única. Isto reflete a maneira assimétrica que é sintetizada e sua inserção na bicamada no retículo endoplasmático liso e suas diferentes funções no domínio do citoplasma e fora dele. Estes domínios são separados por segmentos de membrana de cadeias de polipeptídeos que se contactam com o meio hidrofóbico da bicamada e são compostos na maior parte por resíduos de aminoácidos com cadeias não polares (ALBERTS et al., 1994).

Devido aos peptídeos se unirem por ligações polares e a água estar ausente, toda região peptídica na bicamada é dirigida a formar ligações de hidrogênio, que é maximizada se a cadeia polipeptídica formar uma  $\alpha$  hélice regular como as que atravessam a barreira. Esta é como a maioria dos segmentos de membrana das cadeias polipeptídicas é levada a atravessar a bicamada (ALBERTS et al., 1994).

Na proteína transmembranais passagem simples, os polipeptídeos atravessam uma vez, enquanto as múltiplas passagens, atravessam várias vezes, sendo difícil às proteínas transmembranais se cristalizarem (ALBERTS et al., 1994).

Algumas proteínas transmembranais múltiplas passagens têm segmentos arranjados como  $\beta$  cilindro antes das  $\alpha$  hélices. As mais estudadas são as porinas. A membrana externa é penetrada por várias proteínas porinas que formam poros que permitem selecionar solutos hidrofílicos de até 600 Dalton para difundir através da

membrana externa. As porinas têm uma  $\beta$  superfície ao invés da  $\alpha$  hélice na maioria das estruturas transmembranais (ALBERTS et al., 1994).

Como a membrana lipídica, as proteínas não viram através da bicamada (*flip-flop*), mas elas podem rotacionar sobre seu eixo perpendicular do plano da bicamada (difusão rotacional). Outras são capazes de se mover lateralmente dentro da membrana (difusão lateral) (ALBERTS et al., 1994).

Muitas células têm maneiras de confinar as proteínas de membrana em domínios específicos da bicamada. Isto ocorre por barreiras específicas nas junções intracelulares (*tight junction*) (ALBERTS et al., 1994).

Uma célula pode criar domínios membranais sem usar junções intracelulares. Os espermatozoides mamíferos são as únicas células que consistem de partes distintas estrutural e funcionalmente, cercados por uma membrana plasmática contínua. Há pelo menos três domínios distintos: cabeça anterior e posterior e cauda (ALBERTS et al., 1994, FLESCHE & GADELLA, 2000), podendo ser detalhados em peri-acrossomal, pós-acrossomal, cabeça espermática, peça intermediária e flagelo (CUNHA, 2000). Algumas propriedades da membrana como sua distribuição lipídica, assimetria e interações lipídeo-lipídeo ou lipídeo-proteínas são a base para a organização destes domínios (PARKS & GRAHAM, 1992, FLESCHE & GADELLA, 2000).

As proteínas da membrana plasmática, como regra, não são expostas para o exterior celular, mas são recobertas por carboidratos que estão presentes na superfície celular. Estes carboidratos ocorrem como cadeias covalentes de oligossacarídeos ligados a proteínas de membrana (glicoproteínas) ou lipídeos (glicolipídeos) ou como cadeias de polissacarídeos de moléculas integrais da membrana, os proteoglicanos. Os proteoglicanos, que consistem de cadeias longas de polissacarídeos ligados covalentemente a um centro protéico, são encontrados principalmente fora da célula como parte da matriz extracelular, mas no caso dos proteoglicanos integrais de membrana, o centro protéico também se estende através da bicamada lipídica ou é ligado à bicamada por uma ligação glicosilfosfatidil inositol (GPI) (ALBERTS et al., 1994).

O termo glicocálix é geralmente usado para descrever uma região de carboidratos na superfície celular. O glicocálix exerce um papel importante na comunicação intercelular dos gametas, pois forma uma capa na superfície do espermatozóide (ALBERTS et al., 1994, FLESCHE & GADELLA, 2000).

As proteínas ligadas a carboidratos são as lectinas. Apesar da maioria dos carboidratos estar ligado à molécula da membrana plasmática intrínseca, o glicocálix usualmente contém glicoproteínas e proteoglicanos que foram secretados dentro do espaço extracelular e então adsorvidos na superfície celular (ALBERTS et al., 1994).

O lado da cadeia de oligossacarídeos das glicoproteínas e glicolipídeos é diferente em seu arranjo de açúcares (ALBERTS et al., 1994).

Recentemente, a membrana plasmática ligada à lectina tem sido identificada por reconhecer específicos oligossacarídeos na superfície celular glicolipídica e glicoproteica para mediar o processo de adesão célula-célula, incluindo a ligação espermatozóide-ócito (ALBERTS et al., 1994).

## 2.2. Capacitação

Os espermatozoides maturados no epidídimo são capazes de movimentação ativa, mas não possuem capacidade imediata de fertilização. Eles ganham esta habilidade após permanecerem no genital feminino por algum tempo. As mudanças fisiológicas que levam os espermatozoides a estarem competentes para a fertilização são coletivamente denominadas de capacitação (YANAGIMACHI, 1994, FLESCHE & GADELLA, 2000).

Historicamente, a capacitação tem sido definida como o intervalo de tempo entre a deposição do sêmen no genital feminino durante a cobertura natural e a ocorrência da fertilização (KOPF et al., 1999).

A descoberta da capacitação foi resultado de tentativas frustradas de realizar a fertilização de oócitos *in vitro* com espermatozoides do ejaculado ou do epidídimo. Em 1949, Noyes, Finkle e Rocke encontraram que espermatozoides de coelhos obtidos do sêmen ou dos ductos deferentes foram incapazes de fertilizar oócitos no oviduto, enquanto aqueles que permaneciam no oviduto por quatro a oito horas, possuíam esta capacidade. Estes achados não foram totalmente avaliados, não sendo por isto publicados (YANAGIMACHI, 1994).

Os créditos da descoberta da capacitação foram dados a Austin e Chang no ano de 1951, pois foram os primeiros a documentar, de forma independente, evidências experimentais da necessidade da capacitação em coelhos e ratos (YANAGIMACHI, 1994, FERRARI, 1997).

A capacitação espermática irá induzir mudanças na membrana plasmática do espermatozoide que resultarão em um aumento da sua afinidade pela zona pelúcida, propiciando a fertilização (FLESCHE & GADELLA, 2000).

Mesmo hoje, após cinquenta anos da descoberta da capacitação, as bases moleculares não foram totalmente entendidas. Entretanto, acredita-se que um dos principais eventos na capacitação seja a remoção ou alteração de estabilizadores ou fatores protetores da membrana plasmática, adquiridos durante o trânsito pelo epidídimo ou exposição ao plasma seminal, os quais levariam a membrana a uma

condição propicia para a fertilização e a ligação espermatozóide-oócito (YANAGIMACHI, 1994, FERRARI, 1997).

### **2.2.1. Local da capacitação**

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 espermatozóides encontram-se totalmente ou a maior parte deles capacitados nas partes iniciais do istmo, onde os espermatozóides “fertilizadores” estão armazenados. Em hamsters, a capacitação espermática no istmo ocorrerá mais rapidamente quando as fêmeas são cobertas após a ovulação. É improvável que todos os espermatozóides completem a capacitação e cheguem ao istmo simultaneamente. Ao invés disto, sub-populações específicas de espermatozóides são capacitados em momentos diferentes, provavelmente devido a diferenças fisiológicas e de localização no istmo, levando de minutos a horas para que o processo se concretize. Contudo, muitos espermatozóides poderão não reagir a estímulos indutores da capacitação ou ainda se deteriorarem sobre estas condições (YANAGIMACHI, 1994, FLESCHE & GADELLA, 2000).

Nas espécies em que os espermatozóides são depositados na vagina durante a cobertura, como por exemplo nos ruminantes, a capacitação espermática pode ter início enquanto os espermatozóides passam através do muco cervical. A fricção da superfície espermática contra o muco adsorve substâncias como as proteínas do plasma seminal, facilitando a capacitação. Apesar de alguns espermatozóides estarem em um estágio avançado da capacitação após esta passagem pelo muco, pouco se sabe sobre a real capacidade destas células entrarem no oviduto para participarem da fertilização. Nos hamsters, os espermatozóides que foram totalmente capacitados intra-útero não serão capazes de migrar eficientemente até o oviduto (YANAGIMACHI, 1994, FERRARI, 1997).

### **2.2.2. Especificidade e especialidade do genital feminino em relação à capacitação**

Em coelhos, os espermatozóides são capacitados mais efetivamente quando passam seqüencialmente pelo útero e oviduto. Entretanto, eles já podem estar totalmente capacitados no útero sem ascenderem ao oviduto. A capacitação poderá ainda ocorrer em ovidutos isolados em um processo mais lento ou mesmo dentro de alguns segmentos da vagina (YANAGIMACHI, 1994).

Gestações bem sucedidas em mulheres após a transferência intrafalopaiana de gametas (GIFT) indicaram que o espermatozóide humano não necessita do útero ou da região do istmo para tornar-se capacitado, sugerindo que a capacitação *in vivo* não é restrita a órgãos específicos (YANAGIMACHI, 1994).

A capacitação no trato genital feminino também não é espécie-específica porque o espermatozóide e o oócito de uma espécie podem realizar a fertilização no trato genital de uma fêmea de outra espécie. É claro que a capacitação é possível *in vitro* sem qualquer contribuição do genital feminino (YANAGIMACHI, 1994).

Apesar de em alguns casos o genital feminino não ser essencial à capacitação, ele possui uma habilidade singular e especial que é a “liberar” os espermatozóides capacitados em número suficiente para todos os oócitos ovulados antes deles ficarem velhos demais (YANAGIMACHI, 1994).

Quando a fêmea está pronta para ovular, ela entra em estro e aceita o macho. Se ela é coberta imediatamente ou logo após o início do estro, os espermatozóides que foram selecionados na cérvix e/ou na junção útero-tubárica são armazenados em segmentos anteriores ao istmo, ficando aderidos ao epitélio, mantendo-se viáveis e se tornando capacitados lentamente. Alguns completam a capacitação no momento da ovulação, deixando o istmo, e fertilizando o oócito recém ovulado. Outros completarão a capacitação após a ovulação e deixarão o istmo logo após o final deste processo, fertilizando os oócitos que chegaram ao oviduto algum tempo depois da primeira ovulação. Se a fêmea não puder ser novamente coberta após a ovulação, o processo de capacitação é acelerado e os espermatozóides deixarão o istmo mais cedo, antes

dos oócitos ficarem velhos no oviduto. Esta habilidade do genital feminino em controlar a velocidade da capacitação e liberar prontamente os espermatozóides capacitados para todos os oócitos ovulados não tem uma relação com o tempo da cobertura, sendo um mecanismo que beneficia a reprodução de todas as espécies de mamíferos, especialmente aquelas que ovulam vários oócitos por períodos prolongados e sem um comportamento distinto de estro (YANAGIMACHI, 1994).

### **2.2.3. Fatores desencadeadores da capacitação**

Segundo Ferreira (1997) e Flesch & Gadella (2000), o bicarbonato, a albumina, o íon cálcio e o glicosaminoglicanos desempenhariam o papel de desencadeadores do processo da capacitação espermática.

#### **2.2.3.1. Bicarbonato**

O principal componente e considerado o desencadeador da capacitação é o bicarbonato, o qual atuaria da seguinte forma (HARRISON, 1996, FLESCHE & GADELLA, 2000):

O bicarbonato ativa diretamente uma adenilato ciclase espermatozóide específica que então se liga a proteína kinase A (PKA) que, via fosforilação de proteínas de tirosina, ativa direta ou indiretamente o deslocamento de fosfolípidos levando a uma alteração da assimetria da membrana, resultando em células espermáticas capacitadas.

O deslocamento dos fosfolípidos é dose dependente dos níveis de bicarbonato, sendo que eles podem se movimentar na ausência do bicarbonato quando há inibidores da fosfodiesterase os quais inibem a quebra do AMPc, ativadores da PKA, inibidores da fosfatase 1 e 2a e pela adição de análogos do AMPc (FLESCHE & GADELLA, 2000)

A concentração de bicarbonato é baixa na cauda do epidídimo (< 1mM), local onde ficam armazenados os espermatozóides. Quando chegam ao genital feminino, encontram concentração muito superiores, da ordem de 15 mM. Os níveis intracelulares de bicarbonato também podem aumentar pela entrada de bicarbonato na célula via

canais iônicos na membrana plasmática ( $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ ). Uma alternativa de explicação para a entrada do bicarbonato é que os níveis de  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$  estão em equilíbrio em compartimentos intra e extracelulares pela difusão de gás através da membrana plasmática, sendo a anidrase carbônica, que está presente na cabeça do espermatozóide, envolvida na manutenção da alta concentração intracelular de bicarbonato pela conversão do  $\text{CO}_2$  difundido (FLESCH & GADELLA, 2000).

Em estudo *in vitro* com espermatozoides eqüinos, pode-se verificar o importante papel do bicarbonato no processo da capacitação, onde este atuou na mudança do conteúdo e distribuição dos lipídeos (COLENBRANDER et al, 2002).

### **2.2.3.2. Albumina**

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, FLESCH & GADELLA, 2000).

Nas espécies onde a membrana plasmática é rica em colesterol (humanos e bovinos), tais eventos não são evidenciados na mesma velocidade como nas com um baixo nível (suínos e ovinos). Frente a isto, o tempo para capacitação varia, sendo verificada a necessidade um maior tempo naquelas com altos níveis de colesterol na membrana (FLESCH & GADELLA, 2000).

### **2.2.3.3. Íon cálcio – $\text{Ca}^{2+}$**

Um terceiro componente capacitante é o íon  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, entretanto seu papel direto sobre a fosforilação proteína tirosina é difícil de ser avaliar, pois vários processos necessitam dele e diferem entre as espécies (FLESCH & GADELLA, 2000).

#### **2.2.3.4. Glicosaminoglicanos**

Em relatos de Ferreira (1997) e Zúge (1999), os glicosaminoglicanos poderiam atuar sobre a capacitação removendo os fatores decapacitantes ou por modificações diretas na membrana plasmática, induzindo um aumento na captação de cálcio ou pela ativação da proteína Kinase dependente do AMPc (PKA).

#### **2.2.3.5. Espécies reativas de oxigênio - ROS**

Por muito tempo, as espécies reativas de oxigênio foram indicadas como agentes tóxicos para os espermatozóides, mas evidências recentes sugerem que estas moléculas quando presentes em baixa quantidade estariam também envolvidas em algumas funções fisiológicas. A adição de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em baixas quantidades promove a capacitação enquanto que a presença de catalase, a previne, sendo a produção do O<sub>2</sub><sup>-</sup> é um dos primeiros eventos da capacitação (BALDI et al., 2002).

### **2.2.4. Eventos que ocorrem no espermatozóide durante a capacitação**

#### **2.2.4.1. Mudanças nos íons intracelulares**

Como outras células, os espermatozóides devem manter um gradiente iônico através da membrana plasmática. A concentração de íons potássio (K<sup>+</sup>) dentro da célula é maior que fora dela, enquanto que o contrário ocorre com o íon sódio (Na<sup>+</sup>). Este gradiente iônico é mantido por bombas de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase dependente. As concentrações de K<sup>+</sup> e Na<sup>+</sup> no espermatozóide bovino da cauda do epidídimo são aproximadamente de 120 mM e 14 mM, respectivamente (YANAGIMACHI, 1994).

Durante o processo de capacitação, as concentrações intracelulares destes íons alteram significativamente conforme demonstrado nos espermatozóides do porquinho da Índia que quando incubado em meio para a capacitação, reduziram as

concentrações de  $K^+$  intracelular de 3 a 5  $\mu g$  para 0,6  $\mu g/10^8$  espermatozóides ao final de duas horas de incubação. Ao contrário, as concentrações de  $Na^+$  aumentaram drasticamente de 0,2 a 0,4  $\mu g$  para 11 a 12  $\mu g/10^8$  espermatozóides durante o mesmo período (YANAGIMACHI, 1994).

Não está claro como o  $Ca^{2+}$  extracelular passa pela membrana plasmática durante a capacitação e pouco se conhece sobre a cinética intracelular deste íon neste processo. Concorde-se que a concentração intracelular de  $Ca^{2+}$  nos espermatozóides é um pouco menor, tanto na cabeça como em partes da cauda, devido a presença de uma variedade de canais de  $Ca^{2+}$ : canais de  $Ca^{2+}$  voltagem dependente,  $Ca^{2+}$  ATPase, trocadores  $Na^+/Ca^{2+}$ , sistema de trocas  $Ca^{2+}/H^+$  entre outros. Além destes canais, a presença de canais  $Ca^{2+}$  portão inositol trifosfato (IP3) no acrossomo tem sido descrita, assim como a presença de  $Ca^{2+}$  ATPase no acrossomo, sugerindo que o acrossomo pode servir como um escoadouro do  $Ca^{2+}$  intracelular. Entretanto, o  $Ca^{2+}$  acrossomal é imobilizado por proteínas ou cristais de sal devido ao pH ácido do acrossomo. Pode-se notar que os espermatozóides necessitam do retículo endoplasmático como um reservatório para o  $Ca^{2+}$  imobilizado, sendo isto suportado pela observação que o IP3 não afeta os níveis de  $Ca^{2+}$  citosólicos nos espermatozóides. Além disto, as mitocôndrias não estão localizadas na cabeça espermática, não influenciando os níveis de  $Ca^{2+}$  na região acrossomal (YANAGIMACHI, 1994, FLESCHE & GADELLA, 2000).

Foi postulado que os níveis de  $Ca^{2+}$  no citoplasma são mantidos baixos nos espermatozóides recém ejaculados pela calmodulina sensível a  $Ca^{2+}$  ATPase que inibe a capacitação. A inibição da calmodulina ou da calmodulina sensível a  $Ca^{2+}$  ATPase leva ao aumento dos níveis de  $Ca^{2+}$  intracelular que são refletidos em uma maior proporção de células capacitadas. Isto sugere que a contínua remoção do  $Ca^{2+}$  citoplasmático pela  $Ca^{2+}$  ATPase está envolvida na capacitação prematura dos espermatozóides. Além disto, a inibição do trocador  $Na^+/Ca^{2+}$  por um peptídeo do plasma seminal de 10 kDa, a caltrina, previne o aumento de  $Ca^{2+}$  nos espermatozóides recém ejaculados de bovinos. A proteína quinase C e os canais de  $Ca^{2+}$  voltagem dependente também estão envolvidos no aumento do  $Ca^{2+}$ . A despolarização do potencial da membrana plasmática é um pré-requisito para a zona pelúcida induzir a

reação acrossomal. A bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase pode desempenhar um papel na capacitação induzindo a despolarização, pois a incubação de espermatozóides no meio de capacitação com baixos níveis de sódio (menos de 25mM) inibem a capacitação. Este fenômeno pode ser explicado pelo requerimento de sódio intracelular para ativar os trocadores de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , aumentando as concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (FLESCH & GADELLA, 2000).

#### **2.2.4.2. Mudanças no metabolismo**

Relata-se que os espermatozóides exibem um aumento do metabolismo intracelular como, por exemplo, da atividade glicolítica e o de consumo de oxigênio após a incubação no trato genital feminino ou em meio capaz de induzir a capacitação. Os espermatozóides de camundongos em meio de capacitação exibem um aumento constante nos níveis de respiração do início ao fim do período de incubação, contudo consomem oxigênio na mesma proporção nos meios capacitante e não capacitante, podendo-se assim concluir que o aumento da respiração do espermatozóide em um meio capacitante é devido à presença de substâncias oxidáveis e, desta forma, é um evento secundário ao processo de capacitação antes de um fator desencadeador (YANAGIMACHI, 1994, ZÚGE, 1999).

#### **2.2.4.3. Mudanças nos sistemas adenilatociclase-AMPC**

Na maioria das espécies, o espermatozóide começa a mover ativamente com o contato com o plasma seminal no momento da ejaculação. Entretanto, o espermatozóide “destinado” à fertilização pode temporariamente experimentar uma redução ou perda de sua motilidade, retomando esta movimentação de forma mais vigorosa ao final da capacitação (YANAGIMACHI, 1994). Este incremento na motilidade dos espermatozóides é denominada de hiperativação. Há uma controvérsia sobre a inter-relação capacitação e hiperativação, sendo considerados eventos distintos por alguns pesquisadores (KOFT et al., 1999).

Nos sistemas de capacitação *in vitro*, os espermatozoides mantêm movimentação regularmente ativa durante o período de capacitação (YANAGIMACHI, 1994).

A ativação das proteínas quinase dependentes de AMPc e a fosforilação de proteínas espermáticas exercem papel vital no início e manutenção da motilidade espermática. Segundo Yanagimachi (1994), há evidências do aumento da atividade da adenilato ciclase durante a capacitação espermática. Aumentando a adenilato ciclase provavelmente aumenta o AMPc disponível, podendo estimular a proteína quinase dependente de AMPc, e esta, quando estimulada, pode alterar a estrutura das proteínas espermáticas da membrana e/ou de movimentação pela fosforilação.

#### **2.2.4.4. Mudanças no núcleo**

Os núcleos dos espermatozoides maduros da maioria dos eutérios são estruturas bem estáveis devido a ligação das proteínas nucleares por extensas pontes de dissulfeto (S-S). Sua estabilidade é mantida por todo processo de capacitação. Nos humanos, as proteínas nucleares do espermatozoide são também ligadas por pontes dissulfeto, porém com menor extensão que as das outras espécies (YANAGIMACHI, 1994).

No plasma seminal, o íon zinco ( $Zn^{2+}$ ), de origem prostática, liga-se aos radicais sulfidríla (SH) livres das proteínas nucleares do espermatozoide após a ejaculação, causando uma temporária estabilização das proteínas nucleares. Durante a capacitação, o núcleo perde os íons  $Zn^{2+}$  e aumenta sua estabilidade, provavelmente pela oxidação da liberação dos radicais SH das pontes de dissulfeto (YANAGIMACHI, 1994).

#### **2.2.4.5. Mudanças no acrossomo**

A forma do acrossomo não muda notadamente durante a capacitação na maioria das espécies. Relata-se que a proacrosina inativa do acrossomo do espermatozoide de

suínos é convertida em acrosina ativa por glicosaminoglicanos do fluido uterino (YANAGIMACHI, 1994). Um exemplo destes glicosaminoglicanos é a heparina (GORDON, 1994, O'FLAHERTY et al, 1999).

#### **2.2.4.6. Mudanças na membrana plasmática**

Devido à membrana plasmática estar diretamente exposta ao ambiente de capacitação, não é de se surpreender que as mudanças mais significativas ocorram nela durante o processo. Foi postulado que a remoção ou alteração da “capa de cobertura” da superfície espermática constituía uma importante parte do processo de capacitação. Estes materiais de cobertura que são removidos ou alterados durante a capacitação incluem os chamados fatores decapitantes, as caltrina de 5 a 10 kDa, uma proteína de 6,4 kDa inibidora da proteinase, glicoproteínas de 15-, 16- e 23- kDa e espermina, todas com origem no plasma seminal, e proteínas de estabilização acrossomol de 125 a 259 kDa com origem epididimal (YANAGIMACHI, 1994).

Em carneiros, verificou-se que os espermatozoides ejaculados que foram incubados no fluido uterino liberam de suas superfícies três proteínas glicosiladas diferentes (65, 41 e 24 kDa). No mesmo tempo, eles adsorvem uma proteína de 16 kDa do fluido. No fluido do oviduto, eles liberam proteínas de 97 kDa e 41 kDa (YANAGIMACHI, 1994).

No modelo do mosaico fluido das membranas biológicas, proteínas ou glicoproteínas são não covalentes associadas com a bicamada lipídica que formam a matriz da membrana. Proteínas integrais, que estão firmemente aderidas à bicamada, podem ser removidas apenas por severo tratamento com detergentes, enquanto que as proteínas periféricas, que estão associadas com a membrana primariamente por interações eletrostáticas, podem ser liberadas pela simples adição de agentes quelantes ou pelo aumento do pH ou da força iônica. Então, a maioria das proteínas ou glicoproteínas liberadas da superfície espermática durante a capacitação é periférica (YANAGIMACHI, 1994, FLESCH & GADELLA, 2000).

Mudanças na habilidade de ligação da lecitina à membrana plasmática durante a capacitação indicam que a metade das glicoproteínas periféricas ou integrais é alterada durante a capacitação, sendo atribuído este fato à remoção de terminais de ácido siálico das glicoproteínas da superfície dos espermatozóides (YANAGIMACHI, 1994).

A avaliação da membrana plasmática após a criofatura de espermatozóides de hamsters e porquinhos da Índia incubados em meio de capacitação revelou que partículas intramembranas (IMPs), que são proteínas intrínsecas dentro da bicamada lipídica, mudam suas distribuições tanto na região da cabeça como da cauda. Regiões livres de IMPs aparecem na membrana plasmática de espermatozóides humanos durante a capacitação (YANAGIMACHI, 1994).

Foram encontradas áreas livre de IMPs, desigualmente rodeadas por áreas ricas em IMPs, sem ou com muito pouco colesterol e lipídeos aniônicos (cardiolipina). A membrana plasmática coberta na região da peça intermediária dos espermatozóides não capacitados de porquinhos da Índia tem concretamente arranjados os IMPs em posições próximas a hélice mitocondrial interna. Este único arranjo das IMPs desaparece quando os espermatozóides estão capacitados. Todas estas mudanças podem ser resultado de alterações físicas e químicas da bicamada lipídica durante a capacitação (YANAGIMACHI, 1994).

Segundo Flesch & Gadella (2000), este rearranjo das proteínas da membrana ocorre durante a capacitação, enquanto que alterações do citoesqueleto não são observadas.

Acessando a fluidez da membrana plasmática dos espermatozóides de camundongos usando técnicas fluorescentes de fotobranqueamento, encontrou-se que a fluidez da membrana muda mais proeminentemente na peça principal da cauda durante a capacitação. A quantidade relativa de fosfolipídeos de membrana pode ser mudada durante a capacitação, mas a distribuição de cada lipídeo na camada interna e externa pode ser alterada pela capacitação. Há relatos ou sugestões da alteração da composição dos fosfolipídeos da membrana espermática durante a capacitação. O fosfatidilinositol, que é ausente no ejaculado fresco de suínos, é “sintetizado” pelo espermatozóide durante a incubação no genital feminino. A metilação dos fosfolipídeos

(conversão do fosfatidiletanolamina em fosfatidilcolina) parece ocorrer durante a capacitação dos espermatozoides de hamsters. Foi postulado que durante a capacitação dos espermatozoides de porquinhos da Índia, o ácido fosfatídico intracelular é convertido a cardiolipina, que é então inserida dentro da camada externa da bicamada lipídica da membrana plasmática (YANAGIMACHI, 1994).

Muita atenção tem sido direcionada para ao colesterol da membrana plasmática devido a ele exercer vários papéis em todas as membranas biológicas como a passagem ativa ou passiva de íon pela membrana, regulando a orientação, fluidez e a espessura das membranas lipídica. Acredita-se que a albumina e lipoproteínas do trato genital retiram o colesterol da membrana plasmática do espermatozoide (YANAGIMACHI, 1994, KOFT et al., 1999).

Apesar da importância da remoção do colesterol da membrana plasmática para o processo de capacitação ter sido extensamente estudada, pode ser que a fase de separação dos fosfolípidos de membrana e colesterol (migração lateral destas moléculas dentro da bicamada lipídica para formar os domínios), e não a remoção completamente do colesterol da membrana, seja mais importante para a capacitação. Há relatos que a fluidez dos lípidos da cabeça dos espermatozoides e da cauda da membrana plasmática alterem-se como resultado da capacitação, sendo a movimentação do colesterol responsável em parte por tais mudanças (YANAGIMACHI, 1994, FLESCH & GADELLA, 2000).

Alterações do glicocalix durante a capacitação podem ser verificadas por estudos de ligação a lecitina. Durante a capacitação, há reposição de glicolípidos, liberação de fatores decapacitantes e de outros fatores. Foi postulado que a remoção de fatores decapacitantes induzem a atividade da tirosina kinase nas proteínas transmembrana, permitindo sua agregação posterior agregação com a zona pelúcida (FLESCH & GADELLA, 2000).

### 3. Considerações Finais

Apesar de mais de cinco décadas terem se passado desde a descoberta da existência do fenômeno da capacitação espermática, verificam-se ainda vários pontos de interrogação ao longo desse processo, principalmente no que diz respeito aos eventos ocorridos *in vivo*.

Contudo, devido ao grande interesse dos centros de pesquisa e trabalho na área de biotecnologia da reprodução, associado ao avanço nas técnicas de avaliação dos espermatozoides e aos estudos moleculares, prevê-se a elucidação de pelo menos parte destes pontos, permitindo assim não somente melhores resultados de fertilidade, como um melhor entendimento dos processos fisiológicos, bioquímicos e moleculares da capacitação espermática.

### 4. Referências

ALBERTS, B. et al. Membrane Structure. In: \_\_\_\_\_. **Molecular biology of the cell**. 3 ed., Garland Publishing, New York. 1994. Cap. 10, p. 478-506.

BALDI, E. et al. Signal transduction pathways in human spermatozoa. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 53, p. 121-131, 2002.

BAZER, F.W.; GEISERT, R.D.; ZAVY, M.T. Fertilização, clivagem e implantação. In: HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**, 6 ed. Editora Manole Ltda, São Paulo, 1995, p. 191-216.

COLENBRANDER, B. et al. Capacitation dependent lipid rearrangements in the plasma membrane of equine sperm. **Theriogenology**, v. 58, p. 341-345, 2002.

CUNHA, I.C.N. Atualidades sobre inseminação artificial na espécie canina. In Jornada de integração dos alunos de graduação e pós-graduação, 2, 1998, Botucatu, **Anais...** Botucatu, 1998, p.152-179.

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

FLESCH, F.M.; GADELLA, B.M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in process of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1469, p. 197-235, 2000.

GORDON, I. **Laboratory Production of Cattle Embryos**. CAB International. Wallingford, 1994. Cap. 3, p. 143-169.

GRAHAM, J.K.; FOOTE, R.H. Effect of several lipids, fatty acyl chain length, and degree of unsaturation on motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. **Cryobiology**, v. 24, p. 42-52, 1987.

HARRISON, R. A. Capacitation mechanisms, and the role of capacitation as seen in eutherian mammals. **Reproduction Fertility and Development**, v. 8, p. 581-594, 1996.

KOFT, G.S. et al. Signal transduction and regulation of sperm function. In: GAGNON, C. **The male gamete: from basic science to clinical applications**. Cache River Press, 1999. Cap. 11, p. 105 - 118.

O'FLAHERTY, C.M.; BEORLEGUI, N.B.; BECONI, M. T. Reactive oxygen species requirements for bovine sperm capacitation and acrosome reaction. **Theriogenology**, v. 52, p. 289-301, 1999.

PARKS, E.J.; GRAHAM, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v.38, p.209-22, 1992.

PÉREZ, L.J. et al. In vitro capacitation and induction of acrosomal exocytosis in ram spermatozoa as assessed by the chlortetracycline assay. **Theriogenology**, v. 45, p. 1037-1046, 1996.

ROLDAN, E.R.S.; GOMENDIO, M. Morphological, functional and biochemical changes underlying the preparation and selection of fertilizing spermatozoa *in vitro*. **Animal Reproduction Science**, v. 28, p. 69-78, 1992.

WATSON, P.F. The effects of cold shock on sperm cell membranes. In: MORRIS, G.J.; CLARKE, A. **Effects of low temperatures on biological membranes**. London, Academic Press, 1981. p.189.

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