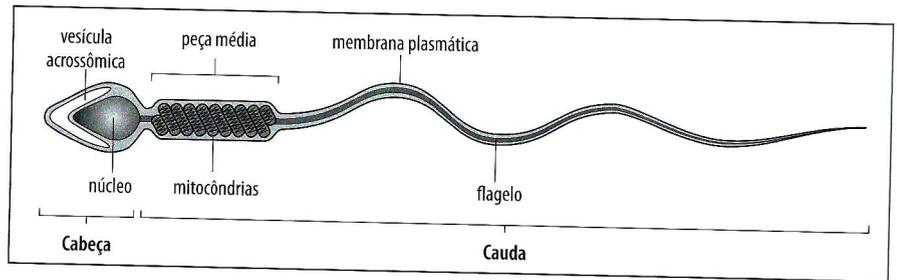


Figura 11.10 Um espermatozóide humano. A vesícula acrossômica na extremidade anterior do espermatozóide contém enzimas que são utilizadas para digerir os envoltórios protetores em torno do ovo. A membrana plasmática na cabeça do espermatozóide contém várias proteínas especializadas que se ligam ao envoltório do ovo e facilitam a sua entrada. O espermatozóide move-se graças ao seu flagelo único, que obtém energia de mitocôndrias. O comprimento total da cabeça até o final da cauda é de aproximadamente 60 μm .



Fecundação

A fecundação – a fusão do ovo e do espermatozóide – é o evento que desencadeia o início do desenvolvimento. As membranas do ovo e do espermatozóide fusionam-se e o núcleo do espermatozóide penetra no citoplasma do ovo, tornando-se o **pronúcleo** do espermatozóide. Nos mamíferos e em muitos outros animais, a fecundação desencadeia a conclusão da meiose no ovo, e o conjunto de cromossomos maternos retido no ovo torna-se o pronúcleo do ovo. Os pronúcleos do espermatozóide e do ovo formam o núcleo zigótico. Na fecundação, o ovo tem a sua divisão ativada e embarca em seu programa de desenvolvimento. A fecundação pode ser externa, como nas rãs, ou interna, como na *Drosophila*, em mamíferos e em aves. De todos os espermatozóides liberados por um animal macho, apenas um fecunda cada ovo. Em muitos animais, incluindo os mamíferos, a penetração do espermatozóide ativa um mecanismo de bloqueio no ovo que impede a entrada de qualquer outro espermatozóide – o chamado bloqueio da **polispermia**. Isso é necessário porque, se mais de um núcleo de espermatozóide entrasse no ovo, haveria conjuntos adicionais de cromossomos e centrossomos, resultando em um desenvolvimento anormal. Há vários mecanismos para garantir que apenas um núcleo de espermatozóide contribua para a formação do zigoto. Em alguns animais, como nas aves, muitos espermatozóides penetram no ovo, mas todos, com exceção de um, são destruídos no citoplasma.

Tanto ovos como espermatozóides são estruturalmente especializados para a fecundação. As especializações do ovo estão direcionadas para impedir a sua fecundação por mais de um espermatozóide, enquanto as do espermatozóide estão direcionadas para facilitar a penetração no ovo. Os ovos estão geralmente envolvidos por várias camadas protetoras e, em muitos organismos, eles possuem uma camada de grânulos corticais logo abaixo da membrana plasmática. O ovo de mamífero é delimitado por uma membrana plasmática com grânulos corticais subjacentes e, em torno dela, está a zona pelúcida, que serve para tornar o ovo impenetrável a mais de um espermatozóide. Todos os espermatozóides são células dotadas de mobilidade, tipicamente projetadas para a ativação do ovo e, ao mesmo tempo, para a liberação de seu núcleo no citoplasma do ovo. Eles consistem fundamentalmente em um núcleo, em mitocôndrias, para o provimento de uma fonte de energia, e em um flagelo, para o movimento. A extremidade anterior é altamente especializada, auxiliando na penetração (Fig. 11.10). Os espermatozóides do nematódeo *C. elegans* e os de alguns outros invertebrados são incomuns porque se assemelham a uma célula normal e se deslocam por movimentos amebóides.

11.7 A fecundação envolve interações de superfície celular entre o ovo e o espermatozóide

Depois de os espermatozóides terem sido depositados no trato reprodutivo de uma fêmea de mamífero, eles passam por um processo conhecido como **capacitação**, que facilita a fecundação por remover certos fatores inibitórios. Há muito poucos ovos maduros – geralmente um ou dois em seres humanos e em torno de 10 no camundongo – esperando para serem fecundados, e menos de 100 dos milhões de espermatozóides depositados acabam chegando a esses ovos. O espermatozóide tem de penetrar várias barreiras

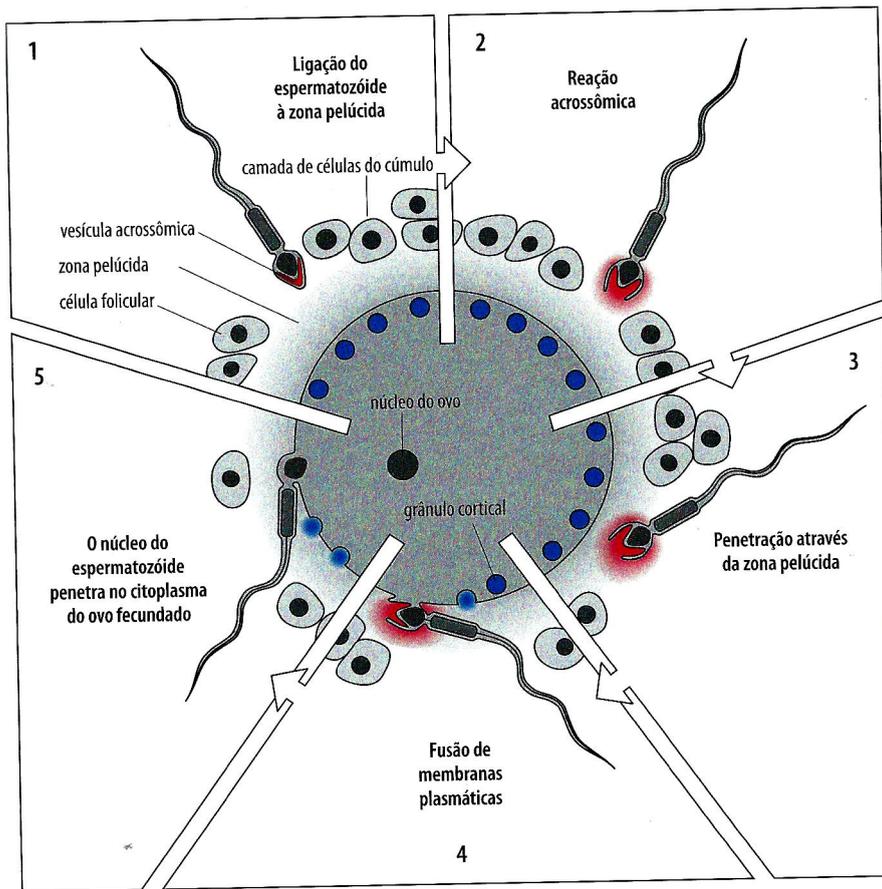


Figura 11.11 A fecundação de um ovo de mamífero. Depois de penetrar na camada de células do cúmulo derivada do folículo, o espermatozóide liga-se à zona pelúcida (1). Isso desencadeia a reação acrossômica (2), na qual são liberadas enzimas da vesícula acrossômica que degradam a zona pelúcida. Isso possibilita que o espermatozóide penetre na zona pelúcida (3) e se ligue à membrana plasmática do ovo. A membrana plasmática da cabeça do espermatozóide funde-se com a membrana plasmática do ovo (4). Isso ativa o ovo, causando a liberação dos grânulos corticais e a entrada do núcleo do espermatozóide no citoplasma do futuro zigoto (5).

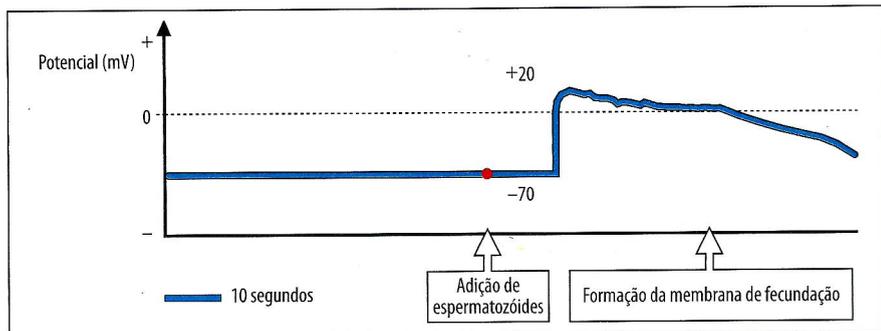
Segundo Alberts, B. et al.: 1989.

físicas para entrar no ovo (Fig. 11.11). Em ovos de mamíferos, a primeira barreira é a camada das células do cúmulo, incrustadas em uma massa pegajosa de ácido hialurônico. A atividade de hialuronidase na superfície da cabeça do espermatozóide ajuda-o a penetrar nessa camada. O espermatozóide encontra a seguir a **zona pelúcida**, uma camada de glicoproteínas que envolve o ovo. Esta camada também atua como uma barreira física, mas a penetração dos espermatozóides nela é auxiliada pela **reação acrossômica** – a liberação do conteúdo da vesícula acrossômica localizada na cabeça do espermatozóide. A zona pelúcida contém três glicoproteínas, incluindo a ZP3, que é um receptor para a ligação espécie-específica do espermatozóide. A proteína SED1, que está na membrana plasmática da cabeça do espermatozóide, liga-se à zona pelúcida. Quando o espermatozóide se liga à ZP3, o conteúdo do acrossomo é liberado por exocitose. Dentre as enzimas liberadas estão a β -N-acetilglicosaminidase, que quebra as cadeias laterais oligossacarídicas das glicoproteínas da zona pelúcida, e uma protease denominada acrosina. Essas enzimas permitem que o espermatozóide aproxime-se da membrana plasmática do ovo.

A reação acrossômica também expõe proteínas na superfície do espermatozóide que podem ligar-se à membrana do ovo e que estão envolvidas na fusão das membranas do espermatozóide e do ovo. Um componente potencial é a proteína fertilina, que pode se ligar a um receptor do tipo integrina na membrana plasmática do ovo. Um receptor do ovo fundamental para o espermatozóide é a proteína CD9. A interação de um espermatozóide com a CD9 poderia iniciar a fusão do espermatozóide e do ovo. Em espermatozóides de muitos invertebrados, como o ouriço-do-mar, a reação acrossômica resulta na extensão de um processo acrossômico em forma de bastão. Esse processo forma-se pela polimerização da actina e facilita o contato com a membrana do ovo.

É possível fecundar ovos humanos em cultura e depois transferir um embrião muito inicial para a mãe. Essa técnica de fecundação *in vitro* (IVF, de *in vitro fertilization*) tem sido de grande ajuda para casais que têm, por uma várias razões, dificuldades

Figura 11.12 A despolarização da membrana plasmática do ovo de ouriço-do-mar na fecundação. O potencial de repouso da membrana do ovo não-fecundado de ouriço-do-mar é de -70 mV. Na fecundação, ele muda rapidamente para +20 mV e depois retorna lentamente ao seu valor original. Essa despolarização poderia constituir um bloqueio rápido à polispermia.



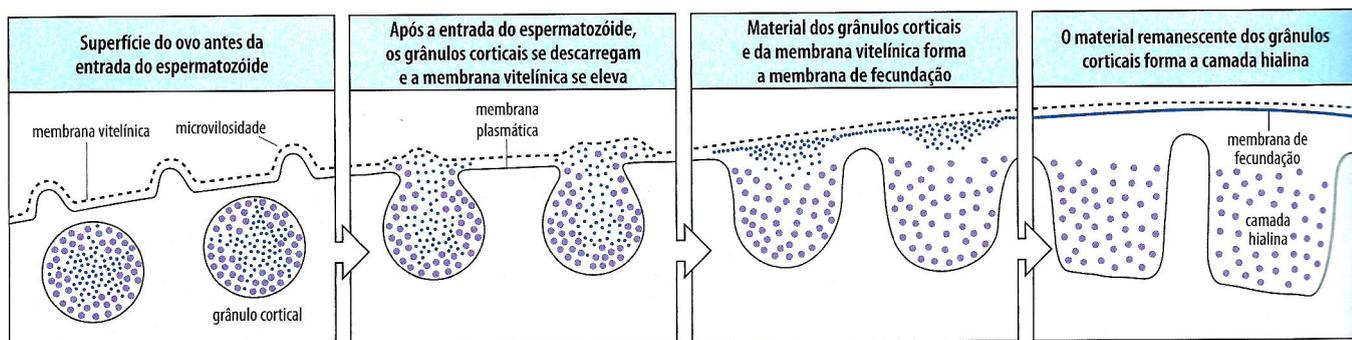
para conceber. É possível até mesmo fecundar um ovo humano injetando-se um único espermatozóide individual intacto diretamente no ovo.

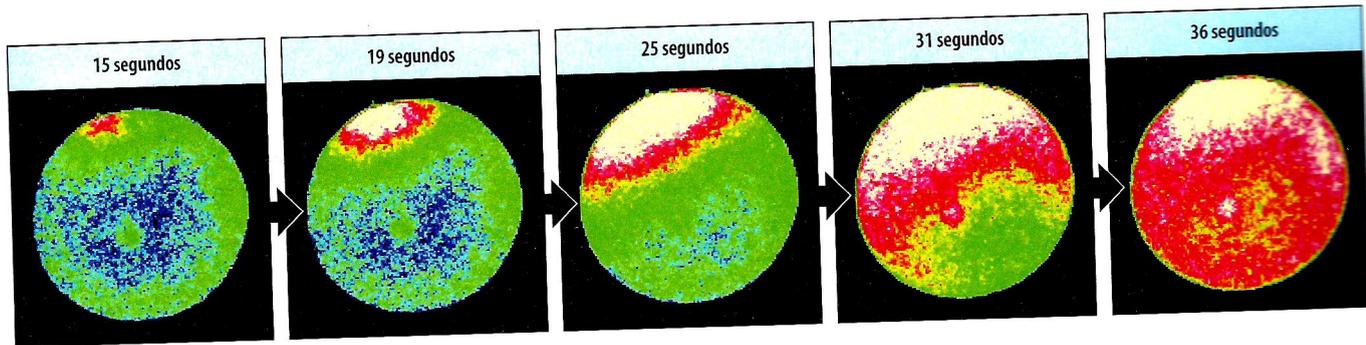
11.8 Alterações da membrana do ovo na fecundação bloqueiam a polispermia

Embora muitos espermatozoides adiram aos envoltórios circundantes do ovo, é importante que apenas um deles se funde com a membrana plasmática e libere seu núcleo no citoplasma do ovo. Assim, existem mecanismos para impedir a entrada de mais de um espermatozóide. O principal bloqueio à polispermia em muitos animais é posto em ação tão logo o primeiro espermatozóide se funde à membrana plasmática. Isso estimula a liberação dos grânulos corticais que, em mamíferos, contêm enzimas que bloqueiam a ligação de outros espermatozoides à zona pelúcida. Em ouriços-do-mar, que consideraremos em maiores detalhes, as enzimas contribuem para a formação de uma membrana de fecundação impenetrável ao redor do ovo fecundado.

Figura 11.13 A reação cortical na fecundação de ouriço-do-mar. O ovo é envolvido por uma membrana vitelínica, que fica do lado de fora da membrana plasmática. Grânulos corticais limitados por membrana estão posicionados logo abaixo da membrana plasmática do ovo. Na fecundação, esses grânulos fundem-se com a membrana plasmática e parte do seu conteúdo é liberada por exocitose. O material liberado junta-se à membrana vitelínica para formar uma forte membrana de fecundação, que então se descola da superfície do ovo e impede a entrada de outros espermatozoides. Outros constituintes dos grânulos corticais dão origem a uma camada hialina, que envolve o óvulo fecundado sob a membrana da fecundação.

No ovo de ouriço-do-mar, um bloqueio rápido à polispermia é desencadeado por uma despolarização transitória da membrana plasmática, causada pela fusão espermatozóide-ovo. O potencial elétrico de membrana através da membrana plasmática vai de -70 mV a +20 mV em um período de poucos segundos após a penetração, do espermatozóide (Fig. 11.12). O potencial de membrana retorna lentamente ao seu nível original enquanto a membrana de fecundação é formada a partir dos grânulos corticais e da membrana vitelínica. Se a despolarização for impedida, ocorre polispermia, mas a maneira pela qual a despolarização bloqueia a polispermia ainda não foi esclarecida. (Na fecundação do camundongo, não há alteração do potencial de membrana). A reação cortical do ouriço-do-mar, que é mais lenta, é melhor compreendida. A entrada do espermatozóide no ovo do ouriço-do-mar resulta na iniciação de uma onda de liberação de cálcio e faz com que os grânulos corticais, que se situam imediatamente sob a membrana plasmática no ovo maduro, liberem seu conteúdo no lado externo da membrana plasmática por exocitose. Isso resulta no desprendimento da membrana vitelínica da membrana plasmática. O conteúdo dos grânulos corticais contribui para que a membrana vitelínica forme a membrana de fecundação e também constitui uma camada





hialina entre ela e a membrana plasmática do ovo (Fig. 11.13). Essas duas estruturas impedem que outros espermatozoides se liguem à membrana plasmática do ovo.

11.9 Uma onda de cálcio iniciada na fecundação resulta na ativação do ovo

A ativação do ovo na fecundação inicia uma série de eventos que resulta no começo do desenvolvimento. Por exemplo, no ovo do ouriço-do-mar, há um aumento de várias vezes na síntese protéica e, em vários outros casos, há mudanças em estruturas do ovo, como a rotação cortical que ocorre em ovos de anfíbios (ver Seção 3.6). Os eventos principais, contudo, começam com o a conclusão da meiose do ovo, a qual havia sido bloqueada em um de seus estágios. Depois disso, os núcleos do ovo e do espermatozoide se fusionam para formar o genoma zigótico diplóide, e o ovo fecundado entra em mitose. Em camundongos e em seres humanos, as membranas pronucleares desaparecem antes dos pronúcleos se unirem.

A fecundação e a ativação do ovo em mamíferos e ouriços-do-mar estão associadas a uma liberação explosiva de íons de Ca^{2+} livres no interior do ovo, produzindo uma onda de cálcio que viaja através dele (Fig. 11.14). A liberação de cálcio é desencadeada pela entrada do espermatozoide e é necessária e suficiente para dar início ao desenvolvimento. A onda começa no ponto de entrada do espermatozoide e cruza o ovo a uma velocidade de 5 a $10 \mu\text{m}$ por segundo. Em todos os mamíferos, ocorrem oscilações na concentração de cálcio por várias horas após a fecundação. O mecanismo para a liberação de Ca^{2+} na fecundação não é conhecido, mas é possível que o espermatozoide introduza um fator protéico específico que inicie a liberação de Ca^{2+} após a fusão dos grânulos.

O acentuado aumento de Ca^{2+} livre é crucial para a ativação do ovo. Os ovos de uma variedade de animais podem ser ativados se a concentração de Ca^{2+} no citosol for artificialmente aumentada, por exemplo, por injeção direta de Ca^{2+} . Em contrapartida, quando o aumento da concentração de cálcio é impedido por meio da injeção de agentes que se ligam a ele, como o quelante de cálcio EGTA, a ativação é bloqueada. Já se sabe, há muitos anos, que os ovos de *Xenopus* podem ser ativados por uma simples picada com uma agulha de vidro; isso se deve a um influxo local de cálcio no sítio da inserção da agulha, o qual desencadeia uma onda de cálcio. O cálcio inicia o desenvolvimento do ovo fecundado por meio de sua ação sobre proteínas que controlam o ciclo celular.

O ovo de *Xenopus* não-fecundado é mantido na metáfase da segunda divisão meiótica pela presença de altos níveis de um complexo protéico, o fator promotor de maturação (MPF, de *maturation-promoting factor*), que é um complexo de uma quinase dependente de ciclina (Cdk, de *cyclin-dependent kinase*) com a sua ciclina correspondente. Os efeitos do MPF são devidos à fosforilação de várias proteínas-alvo pela quinase. Para que o ovo complete a meiose, o nível de atividade do MPF deve ser reduzido (Fig. 11.15). Complexos Cdk-ciclina similares controlam o ciclo celular mitótico. A onda de cálcio resulta na ativação da enzima proteíno-quinase calmodulina-dependente II. A atividade desta quinase resulta indiretamente na degradação do componente de ciclina do MPF, o que permite que o ovo complete a meiose. Os pronúcleos então se fusionam, e o zigoto avança para o próximo estágio do seu desenvolvimento, que é a entrada nos ciclos celulares mitóticos da clivagem.

Figura 11.14 A onda de cálcio na fecundação. Uma série de imagens mostrando uma onda de cálcio intracelular na fecundação de um ovo de ouriço-do-mar. O espermatozoide fecundante fundiu-se um pouco à esquerda do topo do óvulo e desencadeou a onda. A concentração de íons de cálcio é monitorada com um corante fluorescente sensível a cálcio, utilizando microscopia confocal de fluorescência. A concentração de cálcio é mostrada em cores falsas: vermelho é a concentração mais elevada e, depois, amarelo, verde e azul. Os tempos mostrados são segundos após a entrada do espermatozoide.

Fotografias cortesia de M. Whitaker.

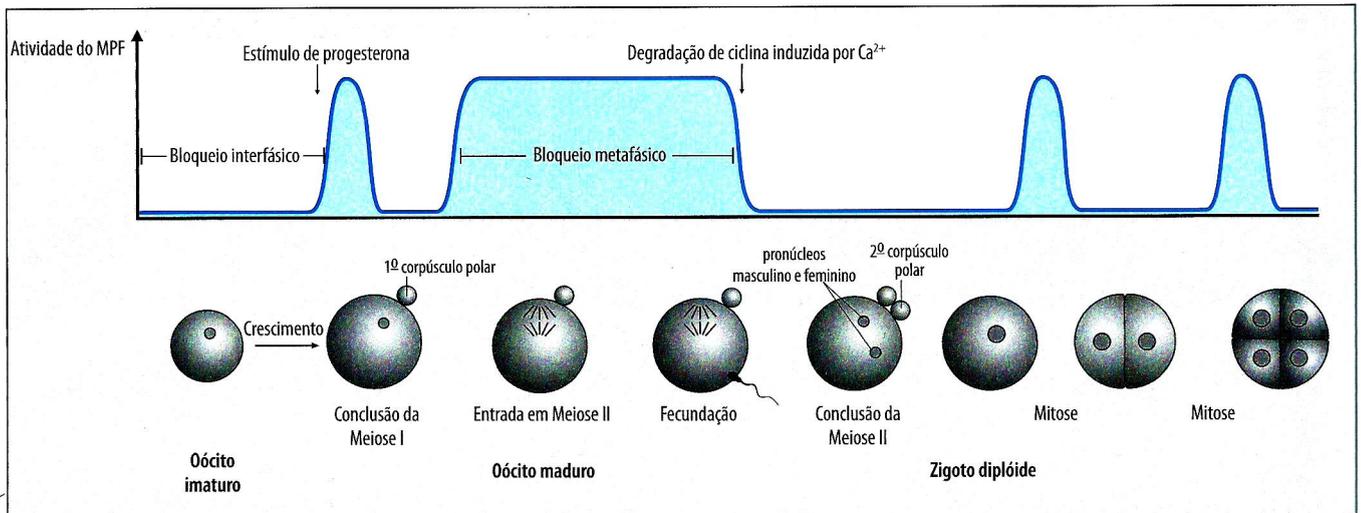


Figura 11.15 Perfil de atividade do fator promotor de maturação (MPF) no desenvolvimento inicial de *Xenopus*. O avanço do ciclo celular do oócito imaturo de *Xenopus* está bloqueado. Ao receber um estímulo hormonal de progesterona, ele entra na primeira divisão meiótica e a completa, com a formação do primeiro corpúsculo polar. Ele entra então na segunda divisão meiótica, mas fica novamente retido na metafase. Neste ponto, ocorre a postura. Na fecundação, a onda de cálcio leva à conclusão da meiose, sendo formado o segundo corpúsculo polar. O zigoto começa então a clivar rapidamente por divisões mitóticas. A atividade do fator promotor de maturação (MPF) aumenta abruptamente um pouco antes de cada divisão dos ciclos celulares meiótico e mitótico, permanece elevada durante cada mitose e depois cai abruptamente e permanece baixa entre mitoses sucessivas.

Resumo

A fusão do espermatozóide e do ovo na fecundação estimula o ovo a começar a se dividir e a se desenvolver. Tanto o espermatozóide como o ovo têm estruturas especializadas relacionadas à fecundação. A ligação inicial do espermatozóide ao ovo em mamíferos é mediada por moléculas da zona pelúcida e leva à liberação do conteúdo do acrossomo do espermatozóide, o que facilita a penetração do espermatozóide nas camadas que envolvem o ovo e lhe permite atingir a membrana plasmática do ovo. O bloqueio da polispermia permite que apenas um espermatozóide se fusione com o ovo e libere seu núcleo no citoplasma dele. Em ouriços-do-mar, o primeiro bloqueio é rápido e parcial e o segundo resulta da liberação do conteúdo dos grânulos corticais no exterior para formar uma membrana de fecundação impenetrável. Uma função fundamental na ativação do ovo após a fecundação é desempenhada pela liberação de íons de cálcio livres no citosol, os quais se espalham em uma onda a partir do sítio da fusão do espermatozóide. Em mamíferos e na maior parte dos outros vertebrados, a fecundação desencadeia a conclusão da segunda divisão meiótica; os pronúcleos haplóides do espermatozóide e do ovo originam o núcleo do zigoto, e o ovo se divide.

Resumo: a fecundação nos mamíferos

