SANDRA HELENA GABALDI

**Efeito de bloqueadores de canais de íons cálcio
sobre espermatozóides e oócitos de hamsters
fecundados *in vivo* e *in vitro***

São Paulo

2004

SANDRA HELENA GABALDI

**Efeito de bloqueadores de canais de íons cálcio sobre
espermatozóides e oócitos de hamsters
fecundados *in vivo* e *in vitro***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Departamento:

Reprodução Animal

Área de Concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. Cesar Roberto Esper

SÃO PAULO

2004

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1382 FMVZ	<p>Gabaldi, Sandra Helena</p> <p>Efeito de bloqueadores de canais de íons cálcio sobre espermatozóides e oócitos de hamsters fecundados <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> / Sandra Helena Gabaldi. – São Paulo : S. H. Gabaldi, 2004. 204 f. : il.</p> <p>Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, 2004.</p> <p>Programa de Pós-graduação: Reprodução Animal. Área de concentração: Reprodução Animal.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Cesar Roberto Esper.</p> <p>1. Hamsters. 2. Espermatozóides. 3. Óvulos. 4. Canais de cálcio. 5. Fertilidade. I. Título.</p>
----------------	---

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome do autor: GABALDI, Sandra Helena

Título: Efeito de bloqueadores de canais de íons cálcio sobre espermatozóides e oócitos de hamsters fecundados *in vivo* e *in vitro*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Dedico,

*Aos meus amados pais Cláudio e Helena, pela sabedoria guardada na
simplicidade do "ser" e, com o apoio e o incentivo,
ensinaram-me o verdadeiro caminho da vida.*

*Ao meu esposo Alexandre, um Homem especial,
que soube abrir meu coração para um sentimento tão nobre,
o AMOR VERDADEIRO.*

Ao seu amor, apoio e compreensão, dedico.

*Ao meu amado irmão Cláudio, querida cunhada Regina e
adorável sobrinho e afilhado Felipe, meu orgulho,
pelo amor, apoio e companheirismo.*

*A minha querida avó Adelina (in memorian), batalhadora,
carinhosa, um exemplo de mulher, pelos ensinamentos de vida, lembranças
estas das quais nunca me esquecerei.*

*A Deus pela oportunidade de encontrar pessoas tão especiais em
minha vida, que me guiaram até aqui.*

A Ele seja toda a glória, a honra e o louvor!

*Aos inesquecíveis animais, que na forma mais nobre, doando sua
própria existência, foram os principais instrumentos desta etapa de
minha vida, pois sem eles, nada disto seria possível.*

...com muito carinho

Agradecimentos

Especialmente, ao Prof. Dr. Cesar Roberto Esper, exemplo de cientista dedicado à pesquisa e ao ensino, meus agradecimentos sinceros não só pela orientação, mas também pelo apoio, amizade, carinho, compreensão e confiança durante o nosso convívio.

Ao Prof. Dr. Antônio Cláudio Tedesco, grande pesquisador e amigo, pela colaboração imensurável neste trabalho, interesse, disponibilidade, confiança, conhecimentos transmitidos..., meus sinceros agradecimentos.

Ao curso de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, em especial ao Prof. Dr. Renato Campanarut Barnabe, pela oportunidade concedida.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP - Câmpus de Jaboticabal pelo acolhimento e ambiente de trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão de Bolsa de Estudos e pelo suporte financeiro deste trabalho.

Ao Prof. João Ademir de Oliveira, do Departamento de Ciências Exatas, FCAV - UNESP - Jaboticabal, pelas orientações e análise estatística dos resultados, pela amizade, interesse e disponibilidade.

A todos os professores do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, FCAV - UNESP - Jaboticabal, em especial ao Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia, pelo auxílio, convívio e amizade.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica da FMRP - USP - Campus de Ribeirão Preto, em especial à Teresa, pela ajuda este trabalho, meus sinceros agradecimentos.

A todos os amigos da pós-graduação da UNESP - Câmpus de Jaboticabal e da USP - Campus de São Paulo e de Ribeirão Preto, especialmente à Andréa Mendes Maranhão, Andréa Cristina Basso, Christina Ramires Ferreira, Eric Castro, Karina Beloti Avelino, Max Vitória Resende, Simone Cristina Méo, Tânia Vasconcelos Cavalcante, Viviane Sgobbi Castro e Walt Yamazaki, pelo companheirismo incondicional, aprendizagem, auxílio e amizade.

Aos funcionários Isabel Aparecida Penariol Natarelli, Ivo Almeida Jr., Paulo Sérgio da Silva e Roberta Vantini, pela ajuda no desenvolvimento da pesquisa.

Enfim, a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a minha formação e na realização deste trabalho, meu eterno agradecimento.

...agradeço de coração.

“Eu quase que nada sei, mas desconfio de muita coisa”

(Guimarães Rosa)

As perguntas não cessam, a busca não cessa...

Nisso existe algo de infinito, que faz a beleza.

(Pina Bausch)

RESUMO

GABALDI, S. H. **Efeito de bloqueadores de canais de íons cálcio sobre espermatozóides e oócitos de hamsters fecundados *in vivo* e *in vitro*.** [Effects of calcium ion channel blockers on hamster spermatozoa and oocytes in *in vivo* and *in vitro* fertilization]. 2004. 204 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

O processo de fertilização está intimamente relacionado ao íon cálcio. Há relatos que bloqueadores de canais de íons cálcio voltagem-dependentes, utilizados na terapia anti-hipertensiva, podem levar à infertilidade masculina, mas poucos relatos são os de seus efeitos sobre o oócito. O objetivo deste experimento foi verificar a influência dos bloqueadores de canais de cálcio voltagem-dependentes do tipo-L, verapamil, nifedipina e diltiazem, sobre os gametas masculino e feminino. Machos e fêmeas hamsters foram utilizados em testes *in vivo* e *in vitro*. Foram realizados tratamentos *in vitro* no Experimento I: espermatozóides foram capacitados em meios contendo três concentrações de bloqueadores de canais de cálcio e avaliados quanto à capacitação espermática, hiperatividade e fertilidade *in vitro*. Oócitos foram tratados previamente por 30 minutos com quatro concentrações de antagonistas de canais de cálcio e submetidos a teste de fertilização *in vitro* e à avaliação do comportamento dos grânulos corticais. No Experimento II, os bloqueadores de canais de cálcio foram administrados, duas vezes ao dia, por 60 dias nos machos e por 30 dias nas fêmeas, que foram analisados pela fertilidade *in vivo*, capacitação e hiperatividade espermáticas, fecundação *in vitro* e exocitose dos grânulos corticais, e microscopia eletrônica de transmissão nos oócitos tratados *in vivo*. No Experimento III, a concentração intracelular de cálcio foi mensurada em espermatozóides e oócitos na presença dos bloqueadores de canais de cálcio. Como resultados, no Experimento I, os fármacos atuaram de forma dose-dependente, os

espermatozóides tratados apresentaram menor taxa de capacitação espermática, de hiperatividade e de fecundação *in vitro*. Os oócitos tratados mostraram menor taxa de fertilização *in vitro* em relação ao controle e, nos grupos verapamil e diltiazem, exocitose parcial dos grânulos corticais e ativação não completa dos oócitos. O Experimento II demonstrou que os machos dos grupos tratados tiveram menor taxa de capacitação espermática, de hiperatividade e de fertilidade *in vitro* em relação ao grupo controle, e nos grupos verapamil e nifedipina houve uma redução da fertilidade refletida no número de fêmeas paridas em relação ao grupo controle e diltiazem. A fecundação *in vivo* das fêmeas tratadas não variou entre os grupos; porém, a taxa de fertilização *in vitro* dos oócitos de fêmeas tratadas *in vivo* com os antagonistas foi menor em relação ao controle; tanto a exocitose dos grânulos corticais quanto a microscopia eletrônica não foram detectadas diferenças entre os grupos. As ninhadas de fêmeas que receberam a terapia no início da gestação apresentaram menor peso ao nascimento e maior taxa de mortalidade. No Experimento III, notou-se que os fármacos causaram um bloqueio do influxo de cálcio extracelular tanto em espermatozóides como em oócitos. Concluiu-se que, tanto espermatozóides como oócitos, possuem em sua membrana plasmática canais de íons cálcio sensíveis aos bloqueadores de canais de cálcio voltagem-dependentes do tipo-*L*. Nos tratamentos *in vitro*, estes fármacos atuaram negativamente na capacidade de fecundação dos espermatozóides e dos oócitos. A terapia com os bloqueadores de canais de cálcio reduziu a fertilidade nos machos, mas não nas fêmeas. A administração dos bloqueadores no início da gestação causou efeitos teratogênicos.

Palavras-chave: Hamsters. Espermatozóides. Óvulos. Canais de cálcio. Fertilidade.

ABSTRACT

GABALDI, S. H. **Effects of calcium ion channel blockers on hamster spermatozoa and oocytes in *in vivo* and *in vitro* fertilization.** [Efeito de bloqueadores de canais de íons cálcio sobre espermatozóides e oócitos de hamsters fecundados *in vivo* e *in vitro*.]. 2004. 204 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

Fertilization process is closely related with calcium ion. There are reports about voltage-dependent calcium ion channel blockers of anti-hypertension therapeutic use causing male infertility, but there are few reports about such effects on the oocyte. The main goal of this experiment was to check the influence of verapamil, nifedipine and diltiazem (*L*-type voltage-dependent calcium ion channel blockers) on spermatozoa and oocytes. Male and female hamsters were used for *in vivo* and *in vitro* experiment. *In vitro* treatments were preformed in the Experiment I, in which: spermatozoa were capacitated in three concentrations of the three calcium ion channel blockers and they were evaluated for sperm capacitation, hyperactivity and *in vitro* fertility. Oocytes were incubated for 30 minutes in four concentrations of the same calcium channel antagonists and submitted to *in vitro* fertilization and evaluation of cortical granules exocytosis. In the Experiment II, calcium channel blockers were supplied twice per day to males during 60 days and to females during 30 days. After this period, drug effects on the animals were evaluated through *in vivo* fertility, sperm capacitation and hyperactivity, *in vitro* fertilization, cortical granules exocytosis and transmission electronic microscopy of *in vivo* treated oocytes. In the Experiment III, the intracellular calcium concentrations were measured in spermatozoa and oocytes in the presence of calcium ion channel blockers. As results, in the Experiment I, the antagonists presented dose-dependent effects, affecting sperm capacitation rate, hyperactivity and *in vitro* fertilization rate on treated

spermatozoa. Treated oocytes presented lower *in vitro* fertilization rate when compared to the control group and, in the verapamil and diltiazem groups, cortical granules exocytosis was partial and oocyte activation was not concluded. Experiment II showed that male hamsters of treatment groups presented lower sperm capacitation rate, hyperactivity and *in vitro* fertilization rate and there were fewer pregnant females, demonstrating a reducing male fertility in verapamil and nifedipine groups when compared to the control and diltiazem groups. *In vivo* fertility of treated females did not change among groups; however, *in vitro* fertilization rates in oocytes of calcium antagonists *in vivo* treated females were lower. Nor cortical granules exocytosis neither electronic microscopy detected differences among groups. Progeny of females that received the therapy in the beginning of pregnancy presented lower birth weight and higher mortality rate. In the Experiment III, the antagonists blocked extracellular calcium influx in spermatozoa and in oocytes. It is concluded that, there were calcium ion channels with sensibility to L-type voltage-dependent calcium ion channel blockers in the plasmatic membrane of spermatozoa and oocytes. In *in vitro* treatments, these antagonists influenced negatively spermatozoa and oocytes capacity of fertilization. Calcium channel blocker therapy reduced the fertility in males, but not in females. Calcium channel blockers supplied in the beginning pregnancy caused teratogenic effects.

Key words: Hamsters. Spermatozoa. Ovule. Calcium channel. Fertility.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I - EFEITO DE BLOQUEADORES DE CANAIS DE ÍONS CÁLCIO VOLTAGEM-DEPENDENTES DO TIPO-L SOBRE A FERTILIDADE *IN VIVO* E *IN VITRO* DE ESPERMATOZÓIDES DE HAMSTERS

Figura 01 -	Avaliação classificatória da capacitação espermática (porcentagem média) na presença de verapamil nas concentrações de 10 μ M, 100 μ M e 1mM, no momento da colheita, uma, duas, três e quatro horas no meio de capacitação.....	71
Figura 02 -	Avaliação classificatória da capacitação espermática (porcentagem média) na presença de nifedipina nas concentrações de 10 μ M, 100 μ M e 1mM, no momento da colheita, uma, duas, três e quatro horas no meio de capacitação.....	73
Figura 03 -	Avaliação classificatória da capacitação espermática (porcentagem média) na presença de diltiazem nas concentrações de 10 μ M, 100 μ M e 1mM, no momento da colheita, uma, duas, três e quatro horas no meio de capacitação.....	75
Figura 04 -	Epermatozóides de hamster corados com clortetraciclina e observados em microscópio de epifluorescência.....	76
Figura 05 -	Fertilidade <i>in vitro</i> (taxa de fecundação e polispermia) de espermatozóides capacitados por três horas com os bloqueadores de canais de íon cálcio verapamil, nifedipina ou diltiazem nas concentrações de 10 μ M, 100 μ M e 1mM.....	81
Figura 06 -	Oócitos corados com Hoechst 33342.....	81
Figura 07 -	Avaliação classificatória (porcentagem média) da capacitação espermática <i>in vitro</i> de machos submetidos à terapia oral com bloqueadores de canais de cálcio por 60 dias, no momento da colheita, uma, duas, três e quatro horas no meio de capacitação.....	85

Figura 08 -	Taxa da fertilização <i>in vitro</i> de espermatozóides de hamsters submetidos à terapia oral com bloqueadores de canais de cálcio por 60 dias.....	87
Figura 09 -	Concentrações médias do cálcio intracelular (nM) em espermatozóides nos grupos controle e verapamil por 200 segundos.....	89
Figura 10 -	Concentrações médias do cálcio intracelular (nM) em espermatozóides nos grupos controle e nifedipina por 200 segundos.....	90
Figura 11 -	Concentrações médias do cálcio intracelular (nM) em espermatozóides nos grupos controle e diltiazem por 200 segundos.....	91

CAPÍTULO II - EFEITO DE BLOQUEADORES DE CANAIS DE ÍONS CÁLCIO VOLTAGEM-DEPENDENTES DO TIPO-L SOBRE A FERTILIDADE *IN VIVO* E *IN VITRO* DE OÓCITOS DE HAMSTERS

Figura 01 -	Taxa de fecundação <i>in vitro</i> de oócitos tratados com verapamil a 10µM, 100µM, 2mM e 4mM por 30 minutos antes da fecundação.....	143
Figura 02 -	Oócitos tratados com verapamil e corados com Hoechst 33342.....	143
Figura 03 -	Taxa de fecundação <i>in vitro</i> de oócitos tratados com nifedipina a 10µM, 100µM, 500µM e 1mM por 30 minutos antes da fecundação.....	145
Figura 04 -	Oócitos tratados com nifedipina e corados com Hoechst 33342.....	145
Figura 05 -	Taxa de fecundação <i>in vitro</i> de oócitos tratados com diltiazem a 10µM, 100µM, 2mM e 4mM por 30 minutos antes da fecundação.....	147
Figura 06 -	Oócitos tratados com diltiazem e corados com Hoechst 33342.....	147
Figura 07 -	Oócitos do grupo controle.....	149

Figura 08 -	Oócitos tratados com verapamil.....	150
Figura 09 -	Oócitos tratados com nifedipina.....	152
Figura 10 -	Oócitos tratados com diltiazem.....	153
Figura 11 -	Taxa de fecundação <i>in vitro</i> de oócitos de fêmeas submetidas à terapia oral com bloqueadores de canais de cálcio por 30 dias...	156
Figura 12 -	Eletronmicrografias de oócitos, após seis horas de fecundação <i>in vitro</i> , de fêmeas submetidas à terapia oral com bloqueadores de canais de cálcio por 30 dias - Grupo Controle.....	158
Figura 13 -	Eletronmicrografias de oócitos, após seis horas de fecundação <i>in vitro</i> , de fêmeas submetidas à terapia oral com bloqueadores de canais de cálcio por 30 dias - Grupo Verapamil.....	159
Figura 14 -	Eletronmicrografias de oócitos, após seis horas de fecundação <i>in vitro</i> , de fêmeas submetidas à terapia oral com bloqueadores de canais de cálcio por 30 dias - Grupo Nifedipina.....	160
Figura 15 -	Eletronmicrografias de oócitos, após seis horas de fecundação <i>in vitro</i> , de fêmeas submetidas à terapia oral com bloqueadores de canais de cálcio por 30 dias - Grupo Diltiazem.....	161
Figura 16 -	Filhotes com 20 dias de idade de fêmeas hamsters tratadas por 30 dias com verapamil, nifedipina ou diltiazem e por mais 8 dias durante o acasalamento.....	163
Figura 17 -	Taxa de fecundação <i>in vitro</i> de oócitos de fêmeas submetidas à terapia intraperitoneal com bloqueadores de canais de cálcio por 30 dias.....	165
Figura 18 -	Concentrações médias do cálcio intracelular (nM) em oócitos nos grupos controle e verapamil por 300 segundos.....	166
Figura 19 -	Concentrações médias do cálcio intracelular (nM) em oócitos nos grupos controle e nifedipina por 300 segundos.....	167
Figura 20 -	Concentrações médias do cálcio intracelular (nM) em oócitos nos grupos controle e diltiazem por 300 segundos.....	167

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I - EFEITO DE BLOQUEADORES DE CANAIS DE ÍONS CÁLCIO VOLTAGEM-DEPENDENTES DO TIPO-L SOBRE A FERTILIDADE *IN VIVO* E *IN VITRO* DE ESPERMATOZÓIDES DE HAMSTERS

Tabela 01 -	Classificação de espermatozóides de hamsters quanto à capacitação (porcentagem média), na presença de verapamil nas concentrações de 10µM, 100µM e 1mM, no momento da colheita, uma, duas, três e quatro horas no meio de capacitação. Jaboticabal-SP, 2004.....	70
Tabela 02 -	Classificação de espermatozóides de hamsters quanto à capacitação (porcentagem média), na presença de nifedipina nas concentrações de 10µM, 100µM e 1mM, no momento da colheita, uma, duas, três e quatro horas no meio de capacitação. Jaboticabal-SP, 2004.....	72
Tabela 03 -	Classificação de espermatozóides de hamsters quanto à capacitação (porcentagem média), na presença de diltiazem nas concentrações de 10µM, 100µM e 1mM, no momento da colheita, uma, duas, três e quatro horas no meio de capacitação. Jaboticabal-SP, 2004.....	74
Tabela 04 -	Motilidade espermática inicial e motilidade e hiperatividade espermáticas (porcentagem média) após três horas de incubação com 10µM do bloqueador de canal de íon cálcio. Jaboticabal-SP, 2004.....	78
Tabela 05 -	Número de oócitos e porcentagem da fertilidade <i>in vitro</i> (taxa de fecundação e polispermia) de espermatozóides incubados com 10µM do bloqueador de canal de íon cálcio. Jaboticabal-SP, 2004.....	78
Tabela 06 -	Motilidade espermática inicial e motilidade e hiperatividade espermáticas (porcentagem média) após três horas da incubação com 100µM do bloqueador de canal de íon cálcio. Jaboticabal-SP, 2004.....	79

Tabela 07 -	Número de oócitos e porcentagem da fertilidade <i>in vitro</i> (taxa de fecundação e polispermia) de espermatozóides incubados com 100µM do bloqueador de canal de íon cálcio. Jaboticabal-SP, 2004.....	79
Tabela 08 -	Motilidade espermática inicial e motilidade e hiperatividade espermáticas (porcentagem média) após três horas da incubação com 1mM do bloqueador de canal de íon cálcio. Jaboticabal-SP, 2004.....	80
Tabela 09 -	Número de oócitos e porcentagem da fertilidade <i>in vitro</i> (taxa de fecundação e polispermia) de espermatozóides incubados com 1mM do bloqueador de canal de íon cálcio. Jaboticabal-SP, 2004.....	80
Tabela 10 -	Fertilidade <i>in vivo</i> de fêmeas acasaladas com machos tratados com bloqueadores de canais de cálcio por via oral durante 60 dias, e número médio de filhotes por ninhada. Jaboticabal-SP, 2004.....	82
Tabela 11 -	Classificação da capacitação espermática <i>in vitro</i> (porcentagem média) de hamsters machos submetidos à terapia oral com bloqueadores de canais de cálcio por 60 dias, no momento da colheita, uma, duas, três e quatro horas no meio de capacitação. Jaboticabal-SP, 2004.....	84
Tabela 12 -	Número de oócitos e porcentagem da fertilidade <i>in vitro</i> de espermatozóides de machos submetidos à terapia oral com bloqueadores de canais de cálcio por 60 dias. Jaboticabal-SP, 2004.....	86

CAPÍTULO II - EFEITO DE BLOQUEADORES DE CANAIS DE ÍONS CÁLCIO VOLTAGEM-DEPENDENTES DO TIPO-L SOBRE A FERTILIDADE *IN VIVO* E *IN VITRO* DE OÓCITOS DE HAMSTERS

Tabela 01 -	Número de oócitos e porcentagem da fertilidade <i>in vitro</i> (taxa de fecundação, penetração e polispermia sem descondensação) de oócitos tratados com verapamil a 10µM, 100µM, 2mM e 4mM por 30 minutos antes da fecundação. Jaboticabal-SP, 2004.....	142
Tabela 02 -	Número de oócitos e porcentagem da fertilidade <i>in vitro</i> (taxa de fecundação e polispermia) de oócitos tratados com nifedipina a 10µM, 100µM, 500µM e 1mM por 30 minutos antes da fecundação. Jaboticabal-SP, 2004.....	144

Tabela 03 -	Número de oócitos e porcentagem da fertilidade <i>in vitro</i> (taxa de fecundação, polispermia, penetração e polispermia sem descondensação) de oócitos tratados com diltiazem a 10μM, 100μM, 2mM e 4mM por 30 minutos antes da fecundação. Jaboticabal-SP, 2004.....	146
Tabela 04 -	Número de oócitos e porcentagem da fertilidade <i>in vitro</i> (taxa de fecundação, polispermia, penetração e polispermia sem descondensação) de oócitos tratados com verapamil. Jaboticabal-SP, 2004.....	150
Tabela 05 -	Número de oócitos e porcentagem da fertilidade <i>in vitro</i> (taxa de fecundação e polispermia) de oócitos tratados com nifedipina. Jaboticabal-SP, 2004.....	151
Tabela 06 -	Número de oócitos e porcentagem da fertilidade <i>in vitro</i> (taxa de fecundação, polispermia, penetração e polispermia sem descondensação) de oócitos tratados com diltiazem. Jaboticabal-SP, 2004.....	153
Tabela 07 -	Fertilidade <i>in vivo</i> e número médio de filhotes por ninhada de fêmeas tratadas com bloqueadores de canais de cálcio por via oral durante 30 dias. Jaboticabal-SP, 2004.....	154
Tabela 08 -	Número de oócitos e porcentagem da taxa de fecundação <i>in vitro</i> de oócitos de fêmeas submetidas à terapia oral com bloqueadores de canais de cálcio por 30 dias. Jaboticabal-SP, 2004.....	155
Tabela 09 -	Fertilidade <i>in vivo</i> de fêmeas tratadas com bloqueadores de canais de cálcio pela via intraperitoneal por 30 dias, número médio de filhotes por ninhada, mortalidade média (%) e peso médio (g) aos 20 dias do nascimento. Jaboticabal-SP, 2004.....	163
Tabela 10 -	Número de oócitos e porcentagem da taxa de fecundação <i>in vitro</i> de oócitos de fêmeas submetidas à terapia intraperitoneal de bloqueadores de canais de cálcio por 30 dias. Jaboticabal-SP, 2004.....	164

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPc	AMP cíclico
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina sérica bovina
Ca⁺²	Íon cálcio
CaMKII	Proteína calmodulina-dependente quinase II
CCE	Conteúdo da cauda do epidídimo
CCO	Complexo <i>cumulus</i> -oócitos
CO₂	Gás carbonico
CTC	Clortetraciclina
DAG	Diacilglicerol
eCG	Gonadotrofina coriônica eqüina
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
g	grama
H⁺	Íon hidrogênio
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
IP₃	Inositol trifosfato
K⁺	Íon potássio
Kg	quilograma
log	logaritmo
mg	miligrama
mg/d	miligrama por dia
mg/mL	miligrama por mililitro
Mg⁺²	Íon magnésio
min	minuto

μL	microlitro
μM	micromolar
mL	mililitro
mm	milímetro
MPF	Fator promotor de metáfase
n	Número
Na⁺	Íon sódio
nm	nanômetro
p	Probabilidade
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PHE	Solução para a motilidade espermática (penicilamina, hipotaurina e epinefrina)
PI4,5P₂	Fosfatidil inositol 4,5-bifosfato
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
PLA	Fosfolipase A
PLC	Fosfolipase C
PTH	Hormônio paratireóideo
RNA_m	Ácido ribonucleico mensageiro
ROC	Canais operados por receptores
rpm	rotações por minuto
RT-PCR	Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase
SAS	<i>Statistical Analysis System</i>
sptz	Espermatozóide
UI	unidade internacional
VDCC	Canais de cálcio voltagem-dependentes
xg	vezes a força da gravidade
χ²	Teste do Qui-Quadrado

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	25
1.1	OBJETIVOS.....	27
1.1.1	Objetivos Gerais.....	27
1.1.2	Objetivos Específicos.....	27
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	28
2.1	O ÍON CÁLCIO E SEUS CANAIS.....	28
2.2	OS BLOQUEADORES DE CANAIS DE ÍONS CÁLCIO.....	31
2.3	A INFLUÊNCIA DOS BLOQUEADORES DE CANAIS DE CÁLCIO NA SECREÇÃO HORMONAL.....	34
2.4	DOSAGEM DE CÁLCIO INTRACELULAR.....	36
CAPÍTULO I - EFEITO DE BLOQUEADORES DE CANAIS DE ÍONS CÁLCIO VOLTAGEM-DEPENDENTES DO TIPO-L SOBRE A FERTILIDADE <i>IN VIVO</i> E <i>IN VITRO</i> DE ESPERMATOZÓIDES DE HAMSTERS.....		37
RESUMO.....		38
1	INTRODUÇÃO.....	40
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	41
2.1	A FUNÇÃO DO CÁLCIO NO ESPERMATOZÓIDE.....	41
2.2	CANAIS DE ÍONS CÁLCIO NO ESPERMATOZÓIDE.....	46
2.3	EFEITOS DOS BLOQUEADORES CANAIS DE CÁLCIO NO ESPERMATÓZÓIDE.....	52
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	58
3.1	ANIMAIS.....	58
3.2	GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	59
3.3	COLHEITA E CAPACITAÇÃO DOS ESPERMATOZÓIDES.....	59
3.4	PROCEDIMENTOS PARA A FECUNDAÇÃO <i>IN VITRO</i>	60
3.4.1	Obtenção dos oócitos.....	60
3.4.2	Fecundação <i>in vitro</i>	61
3.5	AVALIAÇÃO DA FERTILIZAÇÃO DOS OÓCITOS.....	61
3.6	AVALIAÇÃO DA CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA.....	62

3.7	EXPERIMENTO I - TRATAMENTO <i>IN VITRO</i> DOS ESPERMATOZÓIDES COM OS BLOQUEADORES DE CANAIS DE CÁLCIO.....	63
3.8	EXPERIMENTO II - TRATAMENTO <i>IN VIVO</i> DOS MACHOS COM BLOQUEADORES DE CANAIS DE CÁLCIO.....	64
3.9	EXPERIMENTO III - DOSAGEM DE CÁLCIO INTRACELULAR EM ESPERMATOZÓIDES.....	65
4	RESULTADOS.....	68
4.1	EXPERIMENTO I - TRATAMENTOS <i>IN VITRO</i> DOS ESPERMATOZÓIDES COM BLOQUEADORES DE CANAIS DE CÁLCIO.....	68
4.1.1	Capacitação espermática <i>in vitro</i> na presença de bloqueadores de canais de cálcio.....	68
4.1.2	Capacitação espermática <i>in vitro</i> na presença de bloqueadores de canais de cálcio e fertilização <i>in vitro</i>	77
4.2	EXPERIMENTO II - TRATAMENTO <i>IN VIVO</i> DE HAMSTERS MACHOS COM BLOQUEADORES DE CANAIS DE CÁLCIO.....	82
4.2.1	Fertilidade <i>in vivo</i> de machos tratados com bloqueadores de canais de cálcio.....	82
4.2.2	Capacitação <i>in vitro</i> dos espermatozóides de machos tratados com bloqueadores de canais de cálcio.....	83
4.2.3	Fertilidade <i>in vitro</i> dos espermatozóides de machos tratados <i>in vivo</i> com bloqueadores de canais de cálcio.....	86
4.3	EXPERIMENTO III - DOSAGEM DE CÁLCIO INTRACELULAR EM ESPERMATOZÓIDES.....	88
5	DISCUSSÃO.....	92
5.1	EXPERIMENTO I - TRATAMENTO <i>IN VITRO</i> DOS ESPERMATOZÓIDES COM BLOQUEADORES DE CANAIS DE CÁLCIO.....	94
5.1.1	Capacitação espermática <i>in vitro</i> na presença de bloqueadores de canais de cálcio.....	94
5.1.2	Capacitação espermática <i>in vitro</i> na presença de bloqueadores de canais de cálcio e fertilização <i>in vitro</i>	98
5.2	EXPERIMENTO II - TRATAMENTO <i>IN VIVO</i> DE HAMSTERS MACHOS COM BLOQUEADORES DE CANAIS DE CÁLCIO.....	100
5.3	EXPERIMENTO III - DOSAGEM DE CÁLCIO INTRACELULAR EM ESPERMATOZÓIDES.....	102
6	CONCLUSÕES.....	105

CAPÍTULO II - EFEITO DE BLOQUEADORES DE CANAIS DE ÍONS CÁLCIO VOLTAGEM-DEPENDENTES DO TIPO-L SOBRE A FERTILIDADE <i>IN VIVO</i> E <i>IN VITRO</i> DE OÓCITOS DE HAMSTERS.....	107
RESUMO.....	108
1 INTRODUÇÃO.....	110
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	111
2.1 EVENTOS NO OÓCITO E A FUNÇÃO DO ÍON CÁLCIO.....	111
2.2 O ÍON CÁLCIO NA LIBERAÇÃO DE GRÂNULOS CORTICAIS E BLOQUEIO À POLISPERMIA.....	119
2.3 EFEITOS DOS BLOQUEADORES CANAIS DE CÁLCIO NO OÓCITO.....	122
2.4 EFEITOS TERATOGÊNICOS RELACIONADOS AOS BLOQUEADORES DE CANAIS DE CÁLCIO.....	126
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	128
3.1 ANIMAIS.....	128
3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	129
3.3 COLHEITA DOS OÓCITOS.....	129
3.4 PROCEDIMENTOS PARA A FECUNDAÇÃO <i>IN VITRO</i>	130
3.4.1 Colheita e capacitação dos espermatozóides.....	130
3.4.2 Fecundação <i>in vitro</i>	131
3.5 AVALIAÇÃO DA FERTILIZAÇÃO DOS OÓCITOS.....	131
3.6 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DOS GRÂNULOS CORTICAIS.....	132
3.7 ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DOS OÓCITOS FECUNDADOS <i>IN VITRO</i>	133
3.8 EXPERIMENTO I - TRATAMENTO <i>IN VITRO</i> DOS OÓCITOS COM OS BLOQUEADORES DE CANAIS DE CÁLCIO.....	134
3.9 EXPERIMENTO II - TRATAMENTO <i>IN VIVO</i> DAS FÊMEAS COM BLOQUEADORES DE CANAIS DE CÁLCIO.....	135
3.9.1 Administração por via oral.....	135
3.9.2 Administração por via intraperitoneal.....	136
3.10 EXPERIMENTO III - DOSAGEM DE CÁLCIO INTRACELULAR EM OÓCITOS.....	138
4 RESULTADOS.....	141
4.1 EXPERIMENTO I - TRATAMENTOS <i>IN VITRO</i> DOS OÓCITOS COM BLOQUEADORES DE CANAIS DE CÁLCIO.....	141
4.1.1 Incubação dos oócitos com bloqueadores dos canais de cálcio e fertilização <i>in vitro</i>	141

4.1.2	Comportamento dos grânulos corticais após o tratamento <i>in vitro</i> dos oócitos com bloqueadores de canais de cálcio e fertilização <i>in vitro</i>	148
4.2	EXPERIMENTO II - TRATAMENTO <i>IN VIVO</i> DAS FÊMEAS COM BLOQUEADORES DE CANAIS DE CÁLCIO.....	154
4.2.1	Tratamento por via oral das fêmeas com bloqueadores de canais de cálcio.....	154
4.2.1.1	Fertilidade <i>in vivo</i> das fêmeas submetidas à terapia oral.....	154
4.2.1.2	Fertilidade <i>in vitro</i> e comportamento dos grânulos corticais dos oócitos de fêmeas submetidas à terapia oral com bloqueadores de canais de cálcio.....	155
4.2.1.3	Análise ultraestrutural de oócitos fertilizados de fêmeas submetidas à terapia oral com bloqueadores de canais de cálcio.....	157
4.2.2	Tratamento pela via intraperitoneal das fêmeas com bloqueadores de canais de cálcio.....	162
4.2.2.1	Fertilidade <i>in vivo</i> das fêmeas submetidas à terapia intraperitoneal.....	162
4.2.2.2	Fertilidade <i>in vitro</i> e comportamento dos grânulos corticais de oócitos de fêmeas submetidas à terapia intraperitoneal com bloqueadores de canais de cálcio.....	164
4.3	EXPERIMENTO III - DOSAGEM DE CÁLCIO INTRACELULAR EM OÓCITOS.....	166
5	DISCUSSÃO.....	168
5.1	EXPERIMENTOS I E III - TRATAMENTO <i>IN VITRO</i> DOS OÓCITOS COM BLOQUEADORES DE CANAIS DE CÁLCIO E DOSAGEM DE CÁLCIO INTRACELULAR.....	169
5.2	EXPERIMENTO II - TRATAMENTO <i>IN VIVO</i> DAS FÊMEAS COM BLOQUEADORES DE CANAIS DE CÁLCIO.....	178
6	CONCLUSÕES.....	183
	REFERÊNCIAS.....	185
	ANEXOS.....	197

1 INTRODUÇÃO

A fecundação é um evento único, na qual somente a interação entre dois tipos de células da mesma espécie leva a uma cascata de eventos, que resultam na produção de um novo indivíduo. É necessário que haja uma série de transformações organizadas desde a capacitação espermática, o reconhecimento da espécie, a passagem do espermatozóide pelas camadas do oócito, a maturação oocitária, a penetração do espermatozóide no citoplasma materno, e, finalmente, a ativação do processo intracelular que leva à embriogênese.

Este evento se inicia com uma ligação espécie-específica entre os gametas e termina, relativamente rápido, com a fusão de um único espermatozóide em cada oócito. Embora este processo seja bem investigado, ainda há muitas dúvidas com relação à adesão e à fusão de gametas, e ao mecanismo do bloqueio à polispermia, representando ainda uma importante área de pesquisa.

Uma característica obrigatória no reino animal é a necessidade de restabelecer a diploidia na fecundação. Os embriões que apresentam esta poliploidia geralmente morrem em estádios precoces do desenvolvimento e, como é observado na espécie humana entre outras, a presença de um cromossomo extra irá levar a sérias anormalidades. Com isso, é preciso haver mecanismos para que somente um único pronúcleo masculino e um feminino possam realizar a singamia.

Em organismos com fecundação externa, um grande número de espermatozóides entra em contato com o oócito, o qual apresenta uma resposta imediata para garantir que a polispermia não ocorra. Já em mamíferos, além destes mecanismos protetores resultantes das interações diretas entre oócitos e espermatozóides, há uma seleção do número de gametas

masculinos quando estes atravessam o trato reprodutivo da fêmea. Portanto, somente uma pequena fração do ejaculado original sobrevive para o encontro com o complexo *cumulus*-oócito. Neste local, qualquer espermatozóide que tenha sofrido espontaneamente uma reação acrossomal antecipada será eliminado dos candidatos ao processo da fecundação.

Entretanto, a chance de vários espermatozoides chegarem simultaneamente ao oolema *in vivo* é muito baixa, mas a possibilidade de fecundação polispérmica permanece. O principal mecanismo para prevenir este fenômeno é representado pela exocitose dos grânulos corticais presentes no oócito e subsequente interação destes com a zona pelúcida, endurecendo-a.

Pesquisas comprovam que, para o espermatozóide ter capacidade fecundante, para o oócito ser ativado e para que haja bloqueio à polispermia, há necessidade de uma cascata de eventos onde está envolvido o aumento nas concentrações de cálcio intracelular.

Umas das terapias de controle da hipertensão arterial humana está baseada na utilização de bloqueadores de canais de íon cálcio, representados pelo verapamil, nifedipina e diltiazem. O mecanismo de ação destes antagonistas de cálcio atua também no gameta masculino, impedindo a reação acrossomal e, conseqüentemente, a fecundação. Tendo em vista as alterações que ocorrem na fisiologia e na capacidade fecundante dos espermatozoides de homens com estes medicamentos, é interessante saber também as possíveis conseqüências deste tratamento sobre o oócito. Pelas exíguas informações na literatura com respeito ao uso de bloqueadores de canais de cálcio sobre oócitos de mamíferos, é de se especular quais as conseqüências do contato do gameta feminino com estes antagonistas na função do cálcio na exocitose dos grânulos corticais, no bloqueio à polispermia e na ativação oocitária.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivos Gerais

- Observar a fertilidade *in vivo* e *in vitro* de oócitos e de espermatozóides quando expostos aos bloqueadores de canais de cálcio voltagem-dependentes.
- Demonstrar a utilização de gametas de hamsters como excelentes modelos biológicos para estudos da fisiologia reprodutiva.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a capacitação e a reação acrossomal dos espermatozóides com a terapia anti-hipertensiva.
- Estudar os efeitos dos bloqueadores de canais de cálcio no comportamento dos grânulos corticais.
- Verificar a influência destes antagonistas no bloqueio à polispermia.
- Avaliar todo o processo desde a fertilização até o término da segunda divisão meiótica (ativação oocitária).
- Observar, ao nível ultraestrutural, as possíveis alterações que possam ocorrer em oócitos após o contato com os bloqueadores de canais de cálcio voltagem-dependentes.
- Verificar as possíveis alterações nas concentrações de cálcio intracelular de oócitos e de espermatozóides na presença de bloqueadores de canais de cálcio voltagem-dependentes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Nesta revisão serão abordados a importância do íon cálcio e de seus canais na fisiologia celular, a farmacologia dos bloqueadores dos canais de íons cálcio e a dosagem de cálcio intracelular.

2.1 O ÍON CÁLCIO E SEUS CANAIS

O cálcio é o metal iônico mais abundante e um dos mais importantes elementos constitucionais do organismo e da fisiologia celular. Mais de 90% do cálcio corporal é encontrado em ossos e dentes. A outra fração (10%) está na forma solúvel e envolvida em processos fisiológicos de excitação (excitação-contracção e estímulo de secreção), crescimento e locomoção celular, comunicação intercelular, fusão de membranas, coagulação sangüínea, processos de transporte intracelular, estabilidade da membrana plasmática e fertilização. De acordo com o seu sítio de ação, as funções do cálcio podem ser divididas em duas categorias: extra e intracelular (GILMAN et al., 1991; JANIS; SILVER; TRIGGLE, 1987).

O cálcio é um segundo mensageiro intracelular universal, que regula numerosos fenômenos celulares fisiológicos, mas também pode desencadear e participar de eventos patológicos que levam à injúria celular (BOOTMAN et al., 2001). A concentração de cálcio dentro da célula é regulada pela interação de múltiplos processos, os quais podem ser divididos em mecanismos para dentro ou para fora, dependendo se a concentração interna

deva ser elevada ou reduzida, respectivamente, (BOOTMAN et al., 2001; GILMAN et al., 1991). A concentração de cálcio intracelular é heterogênea, ocorrendo em formas de ondas ou picos, pois altas concentrações por longos períodos são tóxicas à célula (BOOTMAN et al., 2001).

Desta forma, as células eucarióticas mantêm baixas concentrações de cálcio intracelular livre em seu citosol (aproximadamente 10^{-7}M) em relação a altas concentrações extracelulares (aproximadamente 10^{-3}M) (ALBERTS et al., 2002; BOOTMAN et al., 2001). Uma pequena elevação de cálcio no citoplasma leva a um aumento significativo na sua concentração intracelular, o qual é rapidamente resgatado, promovendo um importante fenômeno, onde o cálcio é liberado de forma oscilatória (em picos). O gradiente de cálcio é mantido por canais presentes na membrana plasmática que também move ativamente o cálcio para fora da célula. Ou ainda, este íon pode ser resgatado para o retículo endoplasmático pela bomba $\text{Ca}^{+2}\text{-ATPase}$, dependente de ATP (ALBERTS et al., 2002).

O mecanismo de mobilização do cálcio (influxo, efluxo e estocagem intracelular) é constituído por: canais seletivos para cálcio (potencial-dependentes e receptor-operados), trocas de sódio-cálcio, bombas $\text{Ca}^{+2}\text{-ATPase}$, proteínas ligadoras de cálcio (calmodulina e troponina C) e estoques em mitocôndria e retículo endoplasmático. Este controle preciso das concentrações de cálcio são importantes para manter níveis intracelulares baixos e constantes deste íon, pois o cálcio fora de controle é letal à célula e a sua sinalização (ALBERTS et al., 2002; BOOTMAN et al., 2001; JANIS; SILVER; TRIGGLE, 1987). Entretanto, o estresse ou traumas celulares resultam no distúrbio da homeostase de cálcio intracelular (LANE; BAVISTER, 1998), levando à disfunções celulares.

O retículo endoplasmático e a mitocôndria constituem as maiores fontes intracelulares de cálcio. A sua liberação depende de sinais elétricos, químicos ou anatômicos sobre bombas de cálcio, ativação de cátions, canais de cálcio ou atividade de trocas iônicas, isto é, depende

do sinal e do tipo celular envolvido (BOOTMAN et al., 2001; JANIS; SILVER; TRIGGLE, 1987).

Os canais de cálcio são responsáveis pela entrada deste íon na célula em resposta à sinalização da membrana e são classificados diferentemente pelos autores.

Em dois grandes tipos: (I) canais voltagem-dependentes (VDCC) que são ativados pela despolarização da membrana por estímulos químicos ou elétricos, e (II) canais receptor-operados (ROC) que estão associados com a ativação de receptores por alterações químicas (BOOTMAN et al., 2001; JANIS; SILVER; TRIGGLE, 1987; TRIGGLE, 1981). Estes canais iônicos são regulados pelo AMP cíclico (AMPC) dependente de proteína quinase (BOOTMAN et al., 2001; JANIS; SILVER; TRIGGLE, 1987).

Ou então, (I) canais de entrada de cálcio e (II) canais de liberação de cálcio. A primeira classe podendo ser subdividida em três categorias: (1) canais de cálcio voltagem-dependentes (VDCC), os quais são operados por despolarização; (2) canais de cálcio operados por receptor (ROC), que são ativados por mensageiros bioquímicos (ex. glutamato); e (3) canais de cálcio capacitativo, os quais são operados pela depleção de estoques intracelulares. Já a segunda categoria inclui os canais dependentes de receptores para o inositol trifosfato (IP_3) e para a rianodina (BENOFF, 1998).

Desde o início da vida, a fertilização e o desenvolvimento embrionário são regulados pelo cálcio (BOOTMAN et al., 2001).

A fertilização necessita de comunicações entre os espermatozóides e os oócitos, havendo sinais de curto (ZP_3 e reação acrossomal, IP_3 e concentrações de cálcio no oócito) e de longo (quimiotaxia) alcance emitidos pelo oócito que influencia a função espermática, levando à interações distintas entre os gametas e, finalmente, à fertilização (DARSON; LIÉVANO; BELTRÁN, 1996).

Há evidências que os canais de íons estão intimamente envolvidos na sinalização entre os gametas, demonstrado pela inibição da reação acrossomal em mamíferos por bloqueadores de canais de cálcio, principalmente os canais voltagem-dependentes do tipo-*L*. Por outro lado, a ativação de oócitos pode ser cessada por componentes que interferem na responsividade dos canais de íons para a elevação de cálcio dos estoques intracelulares (DARSON; LIÉVANO; BELTRÁN, 1996).

2.2 OS BLOQUEADORES DE CANAIS DE ÍONS CÁLCIO

A definição de antagonista de canais de cálcio é usada para drogas que inibem os processos dependentes de cálcio ou mecanismos regulatórios, pela inibição do aumento de cálcio intracelular (JANIS; SILVER; TRIGGLE, 1987).

Os antagonistas, bloqueadores de canais ou bloqueadores da entrada do íon cálcio agem nos canais de cálcio voltagem-dependentes e são representados pelos fármacos verapamil, nifedipina e diltiazem. Foram introduzidos na medicina na década de 70 e são empregados com sucesso em doenças cardiovasculares e hipertensão arterial. Estas drogas podem ter funções em outras doenças, como hiperatividade de vísceras e de musculatura vascular lisa, e agir em tecidos neurais. Podem atuar, ainda, em outros locais sem fim terapêutico (JANIS; SILVER; TRIGGLE, 1987).

Atualmente, os bloqueadores de canais de cálcio, diltiazem (benzotiazepina), nifedipina (diidropiridina) e verapamil (difenilpiperazina), aprovados nos Estados Unidos como também no Brasil, são indicados no tratamento da insuficiência coronária, em todas as formas de angina do peito (de repouso, de esforço e angina pós-infarto agudo do miocárdio),

no tratamento da isquemia silenciosa, nas arritmias supraventriculares, na prevenção de arritmia pós-infarto e no tratamento de hipertensão arterial, com resultados terapêuticos bem satisfatórios (GILMAN et al., 1991).

Os canais voltagem-sensíveis ou voltagem-dependentes foram divididos em três subtipos, denominados *L*, *N* e *T*, baseados em suas condutâncias e sensibilidade à voltagem. Apenas o canal do tipo-*L* é sensível aos bloqueadores dos canais de íons cálcio. A seletividade dos efeitos farmacológicos destes bloqueadores parece surgir, em particular, por causa da abundância dos canais *L* no músculo cardíaco e liso. Os fatores farmacocinéticos e o aumento da afinidade dos ligantes pelo canal, quando a membrana é despolarizada, também parece contribuir para esta caracterização (BENOFF et al., 1994; GILMAN et al., 1991). Os antagonistas de canais de cálcio são uma das melhores ferramentas para se detectar a presença de canais de tipo-*L* na membrana plasmática (JANIS; SILVER; TRIGGLE, 1987).

Por outro lado, outros autores relataram que dependendo da concentração utilizada, os antagonistas de cálcio podem bloquear diferentes tipos de canais de cálcio (*L*, *N*, *P/Q*, *R*, *T*). Desta forma, Furukawa et al. (1999) demonstraram que a nifedipina a 10 μ M apresentou 70% de seletividade nos canais do tipo-*L* e 10% no tipo-*N*, embora os bloqueadores nifedipina, verapamil e diltiazem sejam considerados canais tipo-*L* seletivos. Já, segundo Darszon et al. (2001) as diidropiridinas (nifedipina) podem ser consideradas antagonistas dos canais de cálcio do tipo-*T*.

Com relação à farmacodinâmica, embora a absorção destes fármacos seja quase completa após a administração oral, sua disponibilidade é reduzida, em alguns casos de forma acentuada, em razão da sua metabolização na primeira passagem pelo fígado. Todas estas drogas são ligadas a proteínas plasmáticas em uma proporção significativa (70 a 99%) e, suas meia-vidas de eliminação, variam de uma a cinco horas. A concentração eficaz da nifedipina é a partir de 160ng/mL e para o verapamil de 260ng/mL de sangue circulante (GILMAN et al.,

1991). Em humanos, estes bloqueadores de cálcio podem levar de cinco a sete horas para serem absorvidos na administração por via oral (JANIS; SILVER; TRIGGLE, 1987).

Sabe-se que o verapamil, a nifedipina e o diltiazem são os fármacos mais específicos, inibindo a corrente de cálcio, com poucos efeitos na de sódio (Na^+) e de magnésio (Mg^{+2}). A predominância da seletividade vascular da nifedipina e o potencial antiarrítmico do verapamil são diferenças marcantes entre estas drogas e em situações terapêuticas. A nifedipina é geralmente mais específica para os canais de cálcio que o verapamil e o diltiazem. Os antagonistas de canais de cálcio não são efetivos contra a troca de Na^+ : Ca^{+2} (troca por gradiente iônico transmembrana bidirecional e potencial de membrana), embora o diltiazem iniba processos mitocondriais e o verapamil iniba esta troca no músculo cardíaco (JANIS; SILVER; TRIGGLE, 1987).

Os tipos de canais de cálcio voltagem-dependentes e suas concentrações mínimas necessárias para os efeitos em musculatura lisa e cardíaca foram testados *in vitro* para cada fármaco: a nifedipina atua em canais do tipo-*L* nas concentrações de $30\mu\text{M}$; o verapamil atua no tipo-*L* ($10\mu\text{M}$) e no tipo-*T* ($100\mu\text{M}$); e o diltiazem atua em canais tipo-*L* nas concentrações de $80\mu\text{M}$ (JANIS; SILVER; TRIGGLE, 1987). O uso de verapamil em concentrações que excedam $10\mu\text{M}$ pode atuar em outros sítios de canais de cálcio (TRIGGLE, 1981).

A ação do fármaco é influenciada: quando a mobilização de cálcio para o efeito fisiológico da célula é de origem intra ou extracelular; pelo tipo de canal de cálcio envolvido na célula; pelo tempo e frequência de despolarização da membrana plasmática; pelos fatores farmacocinéticos; pelos efeitos não específicos; pelo estado patológico (alteração de despolarização da membrana); e pela homeostase (JANIS; SILVER; TRIGGLE, 1987).

Desta forma, os efeitos dos bloqueadores de canais de cálcio são prejudicados nas seguintes situações: se a resposta fisiológica independe do cálcio extracelular; se há outros mecanismos de entrada de cálcio; e se a célula-alvo não possuir o tipo de canal de cálcio

específico do fármaco. Portanto, as falhas dos fármacos nos efeitos podem ser devida à ausência da dependência de canais de cálcio do tipo-*L* no processo fisiológico (JANIS; SILVER; TRIGGLE, 1987).

Embora os bloqueadores de canais de cálcio constituam um grupo químico e farmacologicamente heterogêneo, há fortes evidências que eles exerçam suas ações em outras células que possuem canais de cálcio voltagem-dependentes, onde regulam a entrada de cálcio (JANIS; SILVER; TRIGGLE, 1987), podendo prejudicar a fisiologia destas células.

2.3 A INFLUÊNCIA DOS BLOQUEADORES DE CANAIS DE CÁLCIO NA SECREÇÃO HORMONAL

O cálcio extracelular é importante na restauração da função secretória em glândulas, com a presença dos canais de íons cálcio voltagem-dependentes. Segundo Fleckenstein (1977), o verapamil interferiu especificamente com a quantidade de cálcio da hipófise, alterando a despolarização da membrana *in vitro*, suprimindo a secreção de ACTH, GH e TSH em camundongos.

A sensibilidade dos bloqueadores de canais de cálcio na ligação de sítios nas células da hipófise *in vitro* é semelhante a do músculo liso, podendo interferir na síntese e na liberação de hormônios hipofisários. Apenas em altas concentrações, o verapamil reduziu a síntese de progesterona pelo ovário (TSANG; CARNEGEE, 1984); entretanto, a nifedipina (0,03 μ M) interferiu na ação da proteína quinase fosfolípídeo-dependente de cálcio, inibindo potencialmente a síntese de testosterona pela célula de Leydig (LIN, 1985).

Já *in vivo*, o uso da nifedipina reduziu a resposta do cortisol, FSH, LH, prolactina, TSH, tiroitropina ao GnRH em humanos (JANIS; SILVER; TRIGGLE, 1987), o mesmo ocorrendo com o verapamil, exceto da concentração plasmática de prolactina (BARBARINO; MARINIS, 1980), indicando que estes antagonistas de canais de cálcio atuaram sobre a liberação dos hormônios hipofisários. Porém, experimentos semelhantes realizados com o diltiazem não demonstraram efeitos sobre os hormônios liberadores hipotalâmicos, nem na secreção dos hormônios LH, FSH, TSH, GH e prolactina (VELDHUIS et al., 1985). Desta forma, quando as secreções de FSH, LH e TSH foram estimuladas com o hormônio liberador hipofisário, em uso terapêutico da nifedipina, não houve diferenças nas concentrações plasmáticas dos hormônios estudados (STRUTHERS et al., 1983).

Em contraste, o influxo de cálcio e a secreção hormonal de células da hipófise são altamente sensíveis a estas drogas em condições *in vitro*, onde a concentração de verapamil deve ser dez vezes maior que a requerida para a inibição de contração do músculo liso. Portanto, o verapamil, mas não o diltiazem, inibiu a liberação do hormônio liberador de GnRH e do hormônio liberador de TSH. No entanto, não foram encontradas alterações nas concentrações de epinefrina e prostaglandinas com o uso de bloqueadores de canais de cálcio (JANIS; SILVER; TRIGGLE, 1987).

Estes mesmos autores relataram que o verapamil inibiu a liberação de FSH, LH, TSH e insulina em injeções intravenosas em humanos, mas Semple et al. (1984) não encontraram efeitos significativos nos parâmetros endócrinos dos eixos hipófise-testicular e hipófise-tireóide quando realizada a administração por via oral durante quatro semanas.

O íon cálcio, via AMPc, tem um importante papel na regulação gonadotrópica da esteroidogênese ovariana. A produção de progesterona em células da granulosa de rato, tratadas *in vitro* com verapamil (125 μ M), foi menor quando estimuladas pelo FSH, prostaglandina E₂ e outros agentes, porém, a produção de AMPc não foi alterada. Com estes

resultados, concluíram que um influxo de cálcio transmembrana poderia ser muito importante e o consideraram como um passo no mecanismo da estimulação da célula da granulosa para a produção de progesterona (TSANG; CARNEGIE, 1984).

2.4 DOSAGEM DE CÁLCIO INTRACELULAR

As alterações de concentração de cálcio no citosol podem ser aferidas quantitativamente com o uso de indicadores fluorescentes para este íon, que mudam suas características de absorção e/ou emissão de luz quando ligados ao cálcio (LAMBERT, 1999; TAKAHASHI et al., 1999).

O Fluo-3 AM é uma sonda indicada para a avaliação do aumento da concentração do íon cálcio intracelular, pois possui uma alta sensibilidade, e sua constante de dissociação (K_d) mostra um grau adequado de afinidade com o cálcio. Em alguns experimentos, utiliza-se o pluronic F-127, um agente dispersivo não iônico que auxilia na solubilização de grandes moléculas do ionóforo no meio fisiológico, facilitando, assim, a passagem do marcador pela membrana plasmática (LAMBERT, 1999; TAKAHASHI et al., 1999).

CAPÍTULO I

EFEITO DE BLOQUEADORES DE CANAIS DE ÍONS CÁLCIO VOLTAGEM-DEPENDENTES DO TIPO-*L* SOBRE A FERTILIDADE *IN VIVO* E *IN VITRO* DE ESPERMATOZÓIDES DE HAMSTERS

RESUMO

Efeito de bloqueadores de canais de íons cálcio voltagem-dependentes do tipo-*L* sobre a fertilidade *in vivo* e *in vitro* de espermatozóides de hamsters.

[Effects of type-*L* voltage-dependent calcium ion channel blockers on hamster spermatozoa in *in vivo* and *in vitro* fertilization].

Há relatos que bloqueadores de canais de íons cálcio, utilizados na terapia anti-hipertensiva, podem levar à infertilidade masculina, pois o íon cálcio é importante na capacitação espermática e reação acrossomal. Este experimento teve como objetivo verificar a influência dos bloqueadores de canais de íons cálcio voltagem-dependentes do tipo-*L*, verapamil, nifedipina e diltiazem, sobre a fertilidade *in vivo* e *in vitro* de espermatozóides de hamsters. Foram realizados tratamentos *in vitro* no Experimento I: espermatozóides foram capacitados em meios contendo a concentração de 0, 10 μ M, 100 μ M ou 1mM dos bloqueadores de canais de cálcio e avaliados quanto à motilidade e hiperatividade. A capacitação espermática foi avaliada pela coloração de clortetraciclina fluorescente em cinco momentos (na colheita, uma, duas, três e quatro horas), e a fertilidade *in vitro* pela utilização de oócitos de fêmeas hamsters superovuladas e corados pela coloração de Hoechst 33342 após 6 horas da fecundação *in vitro*. No Experimento II, os bloqueadores verapamil (40mg/kg/d), nifedipina (50mg/kg/d) ou diltiazem (40mg/kg/d) foram administrados aos machos por via oral, duas vezes ao dia, e durante 60 dias e, posteriormente, analisados quanto à fertilidade *in vivo*, capacitação e hiperatividade espermáticas e fecundação *in vitro*. No Experimento III, a concentração intracelular de cálcio foi mensurada em espermatozóides na presença de 50 μ M dos bloqueadores de canais de íons cálcio. Como resultados, no Experimento I, os fármacos atuaram de forma dose-dependente, os espermatozóides tratados apresentaram menor taxa de

capacitação espermática, de hiperatividade e de fecundação *in vitro*. O Experimento II demonstrou que os machos dos grupos tratados tiveram menor taxa de capacitação espermática, de hiperatividade e de fertilidade *in vitro* em relação ao grupo controle, e nos grupos verapamil e nifedipina houve uma redução da fertilidade refletida no número de fêmeas paridas em relação ao grupo controle e diltiazem. No Experimento III, notou-se que os fármacos causaram um bloqueio do influxo de cálcio extracelular nos espermatozóides. Concluiu-se que os espermatozóides possuem em sua membrana plasmática canais de íons cálcio sensíveis aos bloqueadores de canais de cálcio voltagem-dependentes do tipo-*L*, e que estes antagonistas atuaram negativamente na motilidade e hiperatividade espermáticas, taxa de capacitação, reação acrossomal e na fecundação *in vivo* e *in vitro* e, finalmente, que a terapia com bloqueadores de canais de cálcio voltagem-dependentes do tipo-*L* reduziu a fertilidade de machos hamsters.

Palavras-chave: Hamsters. Espermatozóides. Capacitação espermática. Cálcio. Bloqueadores de canais de íons cálcio. Fertilidade.

1 INTRODUÇÃO

O processo de fertilização está intimamente relacionado ao íon cálcio. A capacitação espermática e a reação acrossomal necessitam de uma série de eventos, onde o influxo do íon cálcio pela membrana plasmática do espermatozóide é muito importante para a aquisição da capacidade para fecundar o oócito.

Uma das vias de entrada do íon cálcio no espermatozóide se faz no início da fertilização, onde ocorre a despolarização da membrana plasmática e, com isso, a abertura dos canais de íons cálcio voltagem-dependentes, levando à reação acrossomal.

Os bloqueadores dos canais de íons cálcio voltagem-dependentes do tipo-*L* são utilizados na terapia de controle da hipertensão arterial humana, e são representados pelo verapamil, nifedipina e diltiazem. Estes antagonistas de canais de cálcio atuam em células que possuem, em sua membrana plasmática, canais de cálcio voltagem-dependentes sensíveis a estes fármacos. Como o espermatozóide tem canais de cálcio com estas propriedades em sua membrana, estes bloqueadores podem influenciar nos processos de capacitação espermática, de reação acrossomal e, conseqüentemente, de fecundação.

Há muitos estudos envolvendo a capacidade fecundante dos espermatozóides e bloqueadores de canais de cálcio, porém, existem inúmeras divergências entre os pesquisadores quanto às concentrações efetivas e à atuação destes antagonistas neste gameta.

Com isso, apesar das evidências de alterações que ocorrem na fisiologia dos espermatozóides humanos com esta terapia, é interessante também se avaliar o aumento nas concentrações de cálcio intracelular e a fertilidade do gameta masculino na presença destes fármacos, representando uma importante área de pesquisa.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A FUNÇÃO DO CÁLCIO NO ESPERMATOZÓIDE

Os espermatozóides no trato reprodutivo masculino não são capazes de fertilizar o oócito, mas adquirem competência funcional após um período espécie-dependente no trato reprodutivo da fêmea. Estas alterações para aquisição da habilidade de fecundar são chamadas de capacitação. Uma vez capacitados, os espermatozóides podem sofrer exocitose acrossomal em resposta à molécula oócito-associada (ZP₃), penetração pela zona pelúcida e fusão com a membrana plasmática do oócito. Embora estes eventos ocorram no trato feminino, sistemas laboratoriais que promovem a capacitação e a fecundação *in vitro* são capazes de avaliar mais detalhadamente os requerimentos específicos para o desenvolvimento da habilidade de fecundação. Estas técnicas possibilitaram a descoberta de uma concentração mínima de cálcio e sódio necessária para que ocorra a capacitação e a exocitose acrossomal (YANAGIMACHI, 1994).

O cálcio intracelular no espermatozóide tem um papel fundamental nos processos de capacitação, hiperatividade e reação acrossomal para a fertilização. Além disso, o cálcio intracelular é o principal elemento para a motilidade flagelar e fusão da vesícula acrossomal (DARSZON et al., 1999). O aumento de cálcio interno é um passo essencial na via de sinalização da ZP₃ (uma das três glicoproteínas da zona pelúcida e espécie-específica), levando à reação acrossomal, sendo o cálcio extracelular muito importante para este processo fisiológico (DARSZON; LIÉVANO; BELTRÁN, 1996).

O acrossomo é uma vesícula secretória que está presente na região apical do espermatozóide. A liberação do conteúdo desta vesícula ocorre por um processo de exocitose conhecido como reação acrossomal. Primeiro, o espermatozóide deve sofrer uma ativação prévia, chamada de capacitação, a qual regula a eficiência da exocitose. Depois, a reação acrossomal dos espermatozoides capacitados é iniciada durante o contato com a ZP₃ da zona pelúcida do oócito (ARNOULT et al., 1999).

Antes do espermatozóide se ligar ao oócito, ele sofre uma série de mudanças bioquímicas no trato genital feminino, processo chamado de capacitação espermática. Durante este processo, íons de bicarbonato ativam a enzima adenilciclase no citosol que, por sua vez, produz o AMPc que ativa a proteína quinase A para indiretamente fosforilar proteínas da tirosina (ALBERTS et al., 2002; BREITBART, 2003). A fosforilação da tirosina serve como ligação entre a proteína G e os canais de cálcio voltagem-dependentes (BENOFF, 1998). Assim, inicia-se as mudanças associadas à capacitação, como a alteração da composição lipídica (efluxo de colesterol) e glicoprotéica da membrana plasmática; ainda, ocorre uma elevação do metabolismo espermático e de sua motilidade (hiperativação) (ALBERTS et al., 2002; BREITBART, 2003).

Motilidade hiperativada ou hiperativação é definida como o padrão de movimento flagelar apresentado pelo espermatozóide no sítio de fertilização, podendo ser estimulada por hormônios, íons e secreções do fluido luminal do oviduto, dependendo da espécie. O cálcio possui uma importante função na regulação da motilidade hiperativada, tanto extra como intracelular, atuando principalmente no axonema, mas pouco se sabe de seu modo de ação. Há evidências de que o flagelo contém estoques de cálcio intracelulares e estes possuem receptores para inositol trifosfato (IP₃). A membrana plasmática apresenta canais de cálcio (voltagem-dependentes e/ou *CatSper*) que iniciam e mantêm o aumento intracelular deste íon

na hiperativação. O movimento flagelar também necessita do aumento de ATP e AMPc (SUAREZ; HO, 2003).

Dando maior importância ao íon cálcio e à presença de seus canais, Ashizawa, Hashiguchi e Tsuzuki (1992) demonstraram que a motilidade e a respiração de espermatozoides de aves foram fortemente influenciadas pela concentração de cálcio intracelular.

Na capacitação espermática, há um efluxo de colesterol constituinte da membrana e, com isso, uma entrada maciça de cálcio extracelular. Este evento é pré-requisito para que a reação acrossomal ocorra. A entrada de cálcio é uma consequência das alterações de fluidez na membrana que a torna mais sensível ao cálcio. Alternativamente, há a abertura de canais de cálcio voltagem-dependentes, estimulado pela fosfolipase C (PLC) (MARTINEZ; MORROS, 1996).

O aumento da concentração do cálcio intracelular é característica do evento bioquímico que ocorre durante a capacitação espermática, e este depende do cálcio presente no meio extracelular (DARSZON et al., 1999). A concentração deste íon intracelular é regulada pela Ca^{+2} -ATPase (atua como bomba de expulsão), troca de íons $\text{Ca}^{+2}/\text{H}^{+}$ mais $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{+2}$ (atuam na entrada de cálcio) presentes na membrana citoplasmática e, possivelmente, por estoques intracelulares. A elevação de cálcio intracelular dos espermatozoides se completa em torno de 90 a 120 minutos (FLESH; GARDELLA, 2000; MARTINEZ; MORROS, 1996). A participação dos canais de cálcio voltagem-dependentes durante a capacitação é duvidosa, porém, são essenciais para o rápido influxo de cálcio durante a reação acrossomal (BALDI et al., 1996).

Na membrana do acrossomo estão presentes canais de cálcio voltagem-dependentes, canais de cálcio via IP_3 e Ca^{+2} -ATPase, sugerindo a passagem de cálcio por esta membrana. Entretanto, o cálcio presente no acrossomo é mobilizado pelo aumento do pH, não havendo na

cabeça do espermatozóide mitocôndrias nem retículo endoplasmático como reservatórios de cálcio via IP₃ (FLESH; GARDELLA, 2000). Apesar disso, na membrana acrossomal de ratos, hamsters, camundongos, cães, touros e carneiros há receptores para o IP₃ e bombas Ca⁺²-ATPase, sugerindo que o acrossomo é realmente um estoque de cálcio intracelular (DRAGILEVA; RUBINSTEIN; BREITBART, 1999).

Durante a capacitação, o influxo inicial de cálcio extracelular para dentro do espermatozóide tem a função de completar o estoque de cálcio intracelular localizado no acrossomo (PARRISH; SUSKO-PARRISH; GRAHAM, 1999).

Quando há depleção de cálcio dos estoques intracelulares IP₃-sensíveis, a entrada de cálcio no espermatozóide ocorre através de canais de cálcio receptor-operados (WASSARMAN; JOVILE; LITSCHER, 2001).

O cálcio extracelular é requerido para a capacitação (DARSZON et al., 1999) e para a indução da reação acrossomal, pois o espermatozóide não possui reservas de cálcio intracelular. Baixas concentrações de cálcio no meio (0.90mM) são capazes de induzir somente a capacitação espermática, porém níveis mais altos (1,8mM) são apropriados para desencadear a reação acrossomal (FLESH; GARDELLA, 2000). Portanto, espermatozoides requerem concentrações na ordem de micromolares de cálcio para a capacitação, porém, níveis milimolares para a realização da reação acrossomal (FLESH; GARDELLA, 2000; FRASER; MCINTYRE, 1989).

Desta forma, uma elevação progressiva de cálcio intracelular é requerida para a reação acrossomal. Florman (1994) mensurou a concentração de 50 a 100nM de cálcio em espermatozoides não capacitados, 125 a 175nM em capacitados e 300 a 500nM em espermatozoides estimulados pela ZP₃.

Para a fecundação, o espermatozóide sofre exocitose de seus grânulos acrossomais, evento conhecido como reação acrossomal, processo dependente de cálcio. Evidências

sugerem que o cálcio requerido durante a exocitose acrossomal é de origem extracelular e que a reação acrossomal somente é concretizada na presença de concentrações milimolares de cálcio extracelular. Não há dúvidas de que o influxo de cálcio seja essencial para a reação acrossomal. Entretanto, somente o influxo de cálcio não é suficiente para que este evento ocorra. Os componentes das membranas plasmáticas e acrossomais, bem como os materiais presentes dentro e fora destas membranas, incluindo os íons, estão direta e/ou indiretamente envolvidos na realização da reação acrossomal (YANAGIMACHI, 1994).

Segundo Arnoult et al. (1996), Arnoult, Zeng e Florman (1996), Florman et al. (1998) e Wassarman, Jovile e Litscher (2001), várias etapas estão envolvidas na reação acrossomal como: componentes de sinal de transdução, incluindo proteínas G, IP_3 e seus receptores, fosforilase C, íons cálcio e canais de cálcio voltagem-dependentes. A ZP_3 estimula proteínas G no espermatozóide (G_{i1} , G_{i2} e $G_{q/11}$), despolariza a membrana plasmática espermática (de $\cong 60$ para $\cong 30mV$), ativa canais de cálcio (tipo-T) e eleva o pH ($\cong 6,6$ para $\cong 6,8$ a $7,0$) e a concentração de cálcio intracelular (de $\cong 150$ para $\cong 400nM$).

O aumento da concentração de cálcio intracelular envolve diferentes vias para desencadear a reação acrossomal, há a produção de diacilglicerol (DAG) pela quebra do fosfoinositídeo, onde o DAG estimula a fosfolipase A_2 (PLA) e participa na fusão entre as membranas. A PLA atua sobre fosfolipídeos, dando lisofosfolipídeos, ácido aracdônico e outros ácidos graxos, os quais são fusogênicos. O cálcio também pode atuar diretamente na carga negativa da membrana lipídica, pela neutralização dos fosfolipídeos aniônicos ou sulfato de colesterol. Isto induz a desestabilização da membrana e intermediários fusogênicos que levam à reação acrossomal em contato com a zona pelúcida do oócito (MARTINEZ; MORROS, 1996).

A ligação do espermatozóide à zona pelúcida causa a ativação do AMPc/PKA (proteína quinase A) e proteína quinase C (PKC). A PKC abre canais de cálcio na membrana

plasmática e, a PKA juntamente com o IP_3 ativam canais de cálcio na membrana acrossomal externa, os quais levam ao aumento de cálcio citosólico. A depleção de cálcio no acrossomo irá ativar um mecanismo de entrada de cálcio estoque-operado (entrada de cálcio capacitativa) na membrana plasmática, gerando um grande aumento de cálcio intracelular, resultando na fusão da membrana externa acrossomal com a membrana plasmática, completando assim a reação acrossomal (BREITBART, 2003).

Em geral, uma vez capacitado, o espermatozóide penetra entre as células foliculares e liga-se à zona pelúcida. A glicoproteína ZP_3 é responsável pela ligação espécie-específica, e induz o espermatozóide à reação acrossomal, onde o conteúdo do acrossomo é liberado. A ligação com a ZP_3 causa o influxo do cálcio extracelular para o citosol do espermatozóide, evento necessário para ocorrer a reação acrossomal (ALBERTS et al., 2002). A ZP_3 ativa canais de cátion não seletivos que levam à despolarização da membrana, e conseqüentemente, à abertura dos canais de cálcio voltagem-dependentes (BALDI et al., 1996; FLESH; GARDELLA, 2000).

2.2 CANAIS DE ÍONS CÁLCIO NO ESPERMATOZÓIDE

Pesquisas indicaram que os espermatozoides de mamíferos possuem um mecanismo para a entrada de cálcio com a mesma sensibilidade farmacológica dos canais de cálcio voltagem-dependentes de músculos esqueléticos e cardíacos (BABCOCK; PFIFFER, 1987; COX; PETERSON, 1989). Os canais de cálcio voltagem-dependentes são os iniciadores para que ocorra a reação acrossomal (BENOFF, 1998).

Durante a reação acrossomal podem estar envolvidos dois tipos de canais de cálcio: os canais de alta voltagem-dependência (tipo-*L*) (despolarização $> -20\text{mV}$ e condução $> +10\text{mV}$), e os canais de baixa voltagem-dependência (tipo-*T*) (despolarização -60mV e condução -30 a -20mV), podendo ser diferenciados de maneira farmacológica (BENOFF, 1998; FLORMAN et al., 1998).

Estudos eletrofisiológicos em espermatozóides evidenciaram a existência de ambos os canais de cálcio, de alta voltagem-dependência (tipo-*L*) e de baixa voltagem-dependência (tipo-*T*). A corrente do tipo-*T* apresenta baixa voltagem para o início de sua ativação, inativação rápida e extensa inativação negativa, enquanto que as correntes do tipo-*L* são de alta voltagem de ativação e de inativação lenta (BENOFF, 1998).

Os canais de cálcio voltagem-dependentes presentes na membrana espermática de mamíferos são importantes durante a reação acrossomal. No início das pesquisas, estes canais foram identificados como do tipo-*L*, sensíveis a concentrações micromolares de diidropiridinas (nifedipina), porém, esta concentração também bloqueia os canais do tipo-*T* (DARSZON et al., 1999).

Darszon et al. (1999) afirmaram que a membrana plasmática do espermatozóide expressa genes de canais voltagem-dependentes presentes na musculatura cardíaca (tipo-*L*) e vascular (tipo-*T*).

Em células espermatogênicas murinas foram detectadas somente canais do tipo-*T*, porém, durante a espermatogênese há a expressão de genes para canais de alta voltagem, mas com baixo número de cópias ou na forma inativa (FLORMAN et al., 1998).

Embora a presença de canais do tipo-*T* seja detectada em células espermatogênicas imaturas e estes canais estejam envolvidos na regulação da reação acrossomal, análises moleculares indiretas das correntes de canais de cálcio em espermatozóides maduros detectaram três tipos de correntes, incluindo uma similar, mas não idêntica aos canais do tipo-

L, e não semelhante aos do tipo-*T*. Estes foram voltagem-sensíveis e inibidos pelas diidropiridinas (BENOFF, 1998).

De forma geral, dependendo da subunidade que é expressa no canal de cálcio (α_1 (segmento transmembrana $S_1, S_2, S_3, S_4, S_5, S_6$; domínios I, II, III), α_2, β, δ), haverá uma sensibilidade ao íon e aos tipos de bloqueadores de canais de cálcio voltagem-dependentes, por isso, o canal do tipo-*T* age diferentemente em cada tipo celular, com ou sem sítios de ligação para diidropiridinas (expressado por α_1). Com isso, há uma grande variação na resposta entre as espécies e até mesmo entre laboratórios (BENOFF, 1998).

Analisando células espermato gênicas de camundongos, por transcrição reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), Liévano et al. (1996) testaram a expressão dos tipos de canais de cálcio $\alpha_{1A}, \alpha_{1B}, \alpha_{1C}, \alpha_{1D}$ e α_{1E} . Todos os subtipos foram expressos, porém, com maior intensidade o α_{1E} , seguido pelo α_{1A} . Com isso, concluíram que apenas canais de cálcio voltagem-dependentes do tipo-*T* com sensibilidade a diidropiridina estão presentes em espermátides e envolvidos na reação acrossomal.

Os bloqueadores farmacológicos de canais de cálcio voltagem-dependentes do tipo-*L* inibem o influxo de cálcio no espermatozóide e, conseqüentemente, a reação acrossomal. Os antagonistas também se ligam com alta afinidade a preparações de membrana espermática, podendo sugerir que o espermatozóide expressa canais do tipo-*L*. Porém, os canais de cálcio do tipo-*T* possuem características próprias, como a sensibilidade a alguns íons (níquel > cádmio) e a altas concentrações de bloqueadores de canais de cálcio do tipo-*L*, entre outras, sendo ambos, canais regulados pela fosforilação da proteína tirosina e proteína G. Por isso, inicialmente, muitos grupos de pesquisas primeiro caracterizaram os canais de cálcio voltagem-dependentes em espermatozóides como do tipo-*L* e, posteriormente, como *T*. Em células somáticas, tanto o tipo-*L* quanto o tipo-*T* participam de processos de exocitose (BENOFF, 1998).

O canal tipo-*T-like* ou tipo-*L-like* caracteriza-se por ser de baixa voltagem e apresentar sensibilidade à nifedipina. Quando identificado em espermatozóides humanos e murinos por RT-PCR, ficou demonstrada que a subunidade α_{1C} do canal de cálcio voltagem-dependente tipo-*L* é expressa tanto em testículos como em espermatozóides de mamíferos e, esta subunidade participa da reação acrossomal (BENOFF, 1998).

Goodwin et al. (2000) estudando o RNA mensageiro (RNAm) de espermatozóide humano, observaram que a região α_{1C} da subunidade do canal de cálcio voltagem-dependente do tipo-*L* expressava-se, como também encontrava-se no tecido germinativo.

Entretanto, as células germinativas de roedores também expressam canais de baixa voltagem-dependência (tipo-*T*) que é regulada pelo potencial de membrana e estabelece o mecanismo de influxo de cálcio no espermatozóide induzido pela ZP_3 . Em humanos, canais semelhantes são expressos, porém a sua função na indução à reação acrossomal ainda não está estabelecida. Canais de cálcio de alta voltagem-dependência (tipo-*L*) aparentemente também estão presentes e são expressos em espermatozóides de roedores e humanos, mas o seu papel ainda não é conhecido (JAGANNATHAN; PUBLICOVER; BARRATT, 2002).

A abertura de canais de cálcio voltagem-dependentes do tipo-*T* parece ser responsável pelo influxo de cálcio requerido na reação acrossomal, porém outros tipos de canais estão presentes na membrana espermática, mas não está claro se participam da exocitose do acrossomo (FLESH; GARDELLA, 2000).

Santi, Darszon e Hernández-Cruz (1996), determinaram que o principal canal de cálcio presente em espermátócitos primários de camundongos é o do tipo-*T* sensível à diidropiridina, e este participa da divisão e da diferenciação celular.

Arnoult, Villaz e Florman (1998), após testes com agentes farmacológicos (pimozida, mibefrabil, amiloride, nifedipina, verapamil, níquel, cádmio), observaram que as propriedades

dos canais de cálcio do tipo-*T* em células espermatogênicas murinas diferem das células somáticas, sugerindo uma diversidade de canais de cálcio de baixa voltagem-dependência.

A reação acrossomal de espermatozóides humanos está altamente associada a canais de cálcio do tipo-*T*, pois a análise de produtos da reação em cadeia da polimerase (PCR) revela que a subunidade α_{1H} é expressa (SON; LEE; HAN, 2000). Também, em murinos são expressos os canais do tipo-*T* α_{1C} , α_{1G} e α_{1H} (ESPINOSA et al., 1999).

Durante a capacitação, ocorre a hiperpolarização da membrana plasmática pelo influxo de potássio (K^+) e mudança do pH, e com isso, há a abertura de canais de cálcio voltagem-dependentes do tipo-*T*, recrutando e preparando a condutância dos mesmos para a fertilização. O influxo de cálcio através deste canal quando ativado pela ZP_3 , leva à reação acrossomal. Embora pelo menos dois tipos de canais de cálcio voltagem-dependentes estejam presentes no espermatozóide, as suas funções na capacitação ainda não são totalmente entendidas (DARSZON et al., 2001).

Durante a reação acrossomal, o contato com a zona pelúcida ativa uma resposta de cálcio transitória no espermatozóide envolvendo canais de cálcio de baixa voltagem-dependência. Estes canais são sensíveis aos antagonistas diidropiridina, pimizida, difenilbutilpiperidine, níquel, lantânio e cádmio. O estado de condutância dos canais originada na capacitação pode ser a característica central da atuação dos bloqueadores de canais de cálcio na inibição da reação acrossomal (ARNOULT et al., 1999).

O estímulo da ZP_3 no espermatozóide ativa os canais de cálcio voltagem-dependentes do tipo-*T*, resultando na despolarização da membrana espermática de $\cong -60mV$ para $\cong -30mV$, abrindo estes canais e elevando o cálcio intracelular para que ocorra a reação acrossomal. É proposto que a abertura dos canais de cálcio do tipo-*T* induzida pela ZP_3 cause a elevação de cálcio intracelular sustentada pelos estoques internos, provavelmente via IP_3 e seus receptores (FLORMAN et al., 1998, WASSARMAN, 1999). Os efeitos da despolarização e

alcalinização parecem abrir os canais de cálcio voltagem-dependentes do tipo-*T* (ARNOULT et al., 1996; DARSZON et al., 1999).

De forma geral, um primeiro aumento de cálcio intracelular, provavelmente mediado por canais de cálcio do tipo-*T*, induz a uma segunda elevação deste íon para ocorrer a reação acrossomal. Embora a conexão entre as duas elevações não esteja totalmente clara, há a hipótese de que o primeiro aumento de cálcio ative a PLC, que, por sua vez, produz IP₃ que irá atuar em receptores presentes na membrana do estoque intracelular, representado pelo acrossomo. Com a depleção deste pequeno estoque, irá abrir canais de cálcio estoque-operados na membrana plasmática que gerará e sustentará o segundo aumento de cálcio; ativando, ainda, proteínas (SNAREs - Rab3A), responsáveis pela fusão das duas membranas e pela reação acrossomal. Estas proteínas de fusão são dependentes do efluxo de cálcio pela membrana externa do acrossomo, via receptores para IP₃ (DE BLAS et al., 2002; O'TOOLE et al., 2000).

O aumento de cálcio sustentado após o contato do espermatozóide com a ZP₃ é devido a persistente ativação de mecanismos de influxo de cálcio (via de estoque depleção-operados) após a depleção dos estoques intracelulares, chamado de mecanismo secundário. O primeiro contato com a ZP₃, mecanismo primário, gera uma elevação temporária de cálcio pela abertura de canais de cálcio de baixa voltagem-dependência do tipo-*T*. Esta etapa é obrigatória para poder induzir o aumento de cálcio sustentado. Ao se utilizar 50μM de verapamil (bloqueador tipo-*L*) no meio com espermatozoides de murino, não houve a entrada de cálcio estimulada pela ZP₃ (>50%), mostrando a habilidade deste antagonista agir em canais tipo-*T*, ou que outros tipos de canais de cálcio voltagem-dependentes estão envolvidos no processo; porém, quando o verapamil foi acrescido ao meio 15s após o contato com a ZP₃, ocorreu a elevação sustentada de cálcio (>90%), e conseqüentemente, a reação acrossomal. Com isso, concluiu-se que os canais de cálcio voltagem-dependentes são importantes para o

início da reação acrossomal, mas a entrada posterior de cálcio é realizada também por outras vias (O'TOOLE et al., 2000).

2.3 EFEITOS DOS BLOQUEADORES CANAIS DE CÁLCIO NO ESPERMATOZÓIDE

Desde a década de 80, há relatos de interações de bloqueadores de canais de cálcio com a função espermática em tratamentos *in vitro*. Em 1994, Benoff et al. relataram que a terapia anti-hipertensiva com a nifedipina causou uma infertilidade reversível em humanos. Esta revisão está de forma cronológica para o melhor entendimento dos avanços das pesquisas neste assunto, visto que há uma diversidade entre espécies e métodos de análise utilizados para o estudo da interferência destes fármacos na capacitação espermática e reação acrossomal.

A ação da nifedipina, do verapamil e do diltiazem é efetiva em células que possuem canais de cálcio do tipo-L. Em testes *in vitro*, o verapamil a 0,25µM reduzia a motilidade espermática em humanos em 33% (HONG et al., 1985), a 4µM, em 75% e, a 20 - 40µM imobilizava-os irreversivelmente (FAKIH et al., 1986).

Babcock e Pfeiffer (1987) trataram espermatozóides de carneiros com nifedipina (20µM), verapamil (60µM) e diltiazem (30µM) e apesar de haver alcalinização, os antagonistas apresentaram apenas 50% de efetividade no bloqueio do influxo de cálcio, portanto, inibindo a reação acrossomal.

Quando Fraser e McIntyre (1989) incubaram espermatozóides de camundongos por 120 minutos com verapamil (5-50µM) ou nifedipina (1-100µM) houve inibição significativa da resposta da reação acrossomal estimulada pelo cálcio, quando comparada ao controle.

Neste experimento, o espermatozóide sofreu capacitação induzida pelo cálcio, apesar da contínua presença dos antagonistas de canais de cálcio, indicando que estes fármacos foram capazes de inibir esta indução ao cálcio apenas no final do processo de capacitação e início da reação acrossomal. Com isso, os bloqueadores reduziram a habilidade dos espermatozóides em fertilizar os oócitos *in vitro* e, ainda, espermatozóides incubados com 50 μ M de verapamil induziram estágios iniciais de ativação em oócitos, como a extrusão dos grânulos corticais, mas não houve a fusão oócito-espermatozóide na zona pelúcida pela ausência da reação acrossomal.

Juneja et al. (1990a) trataram *in vivo* porquinhos-da-índia machos com verapamil (1, 5 ou 10mg/kg) por 4 ou 12 semanas, e observaram que houve redução no peso testicular, na produção, no ATP e na motilidade espermática e no teste de penetração na zona pelúcida. A histopatologia testicular revelou menor número de espermatozóides no lúmen do túbulo seminífero e degeneração no epitélio germinativo, porém, em tecidos cardíacos e vasos deferentes não foram notadas alterações. Como conclusão, a terapia com o verapamil teve um potencial efeito de antifertilidade dose e tempo dependentes, e, quando cessou a administração do medicamento, a recuperação parcial ou total se deu após 4 a 6 semanas. Posteriormente, utilizando-se o mesmo material biológico, Juneja et al. (1990b) notaram que o verapamil não inibiu a elevação de cálcio nas preparações de membrana plasmática isolada, descartando o envolvimento de canais de cálcio em espermatozóides de porquinhos-da-índia; entretanto, apresentou um efeito estimulatório na entrada de cálcio, concluindo que talvez tenham ocorrido mudanças na estrutura lipofílica da membrana com o tratamento, aumentando a permeabilidade ao íon.

Okamura et al. (1992) estudando o influxo e o efluxo de cálcio na membrana plasmática de espermatozóides de suínos presentes no epidídimo, observaram que a nifedipina

(1mM) e o diltiazem (1mM) bloquearam o influxo e o efluxo de cálcio, e que o verapamil (1mM) inibiu o influxo sem afetar a saída do íon para o meio extracelular.

A mudança do potencial de membrana ativa canais de cálcio voltagem-dependentes, eleva a concentração de cálcio intracelular, culminando com a exocitose acrossomal. Quando espermatozóides de camundongos, touros e carneiros foram expostos aos antagonistas de canais de cálcio do tipo-*L*, nifedipina (0,6μM), verapamil (0,8μM) e diltiazem (1μM), houve a inibição de 50% na reação acrossomal induzida, tanto pela hiperpolarização da membrana quanto pela presença da ZP₃, indicando a importância destes canais neste processo fisiológico. Em concentrações maiores (20μM de nifedipina, 30μM de diltiazem e 60μM de verapamil) houve o bloqueio total dos canais de cálcio voltagem-dependentes (FLORMAN et al., 1992).

Anand, Kanwar e Sanyal (1994) trataram *in vitro* espermatozóides de humanos com verapamil (0,5, 5 e 50μM), havendo redução de motilidade e inibição do influxo do cálcio extracelular. Na concentração de 50μM de verapamil, os espermatozóides apresentaram imobilidade, alterações na membrana plasmática (fluidez) e alterações morfológicas (cauda enrolada, decapitação e ruptura de membrana plasmática em cabeça e cauda) após a exposição por 30 minutos.

Benoff et al. (1994) relataram que a administração terapêutica de nifedipina (30mg/d) para o controle de hipertensão humana causou uma infertilidade reversível no homem, detectada quando o espermatozóide do paciente foi submetido a um programa de fecundação *in vitro*. O retorno da fertilidade só foi obtido após três meses da retirada do medicamento. Em trabalho consecutivo, foi verificado o sucesso da concepção na segunda tentativa após a detecção da fertilidade dos espermatozóides (HERSHLAG; COOPER; BENOFF, 1995).

Os antagonistas de canais de cálcio podem também atuar nas características da membrana espermática. A natureza lipofílica do bloqueador de cálcio permite que ele se insira na membrana plasmática, comprometendo sua fluidez, inibindo a expressão de receptores de

manose e a exteriorização da proteína ligante à zona pelúcida na cabeça do espermatozóide durante a capacitação (BENOFF et al., 1994).

A elevação do cálcio intracelular na reação acrossomal é sustentada por canais de cálcio voltagem-dependentes farmacologicamente idêntico ao tipo-*L*, pois após a incubação de espermatozóides bovinos com nifedipina (10 μ M) houve a inibição da elevação do cálcio intracelular e, conseqüentemente, da reação acrossomal induzida pela ZP₃ (FLORMAN, 1994).

Stauss, Votta e Suarez (1995) incubaram espermatozóides de hamsters na presença ou não de verapamil (100 μ M) por 30 min a 37°C para averiguar a importância do movimento de hiperativação na penetração através da zona pelúcida. Com este tratamento, os espermatozóides não penetraram em nenhum oócito e o movimento de hiperativação foi reduzido.

A adição de nifedipina (10 μ M) em meio de cultivo de espermatozóides bovinos não inibiu a capacitação (transição F para B na coloração com clortetraciclina), porém bloqueou a reação acrossomal (transição B para AR), sugerindo que o cálcio é requerido para a mudança funcional. Desta forma, a capacitação é dependente de uma modulação no cálcio intracelular via Ca⁺²-ATPase, mas a exocitose acrossomal ocorre com o influxo deste íon, controlado pelos canais de cálcio (FRASER; ABEYDEERA; NIWA, 1995).

Arnoult et al. (1996) observaram em espermatozóides murinos, que o influxo de cálcio e a reação acrossomal foram inibidos pelos bloqueadores de canais de cálcio voltagem-dependentes do tipo-*T* (pimozide e amilorida) e do tipo-*L* (nifedipina, verapamil e diltiazem).

Katsoff e Check (1997) detectaram que espermatozóides de homens sob tratamento de bloqueadores de canais de cálcio (nifedipina, verapamil e diltiazem) por seis meses, apresentaram problemas na expressão de receptores de ligação de manose, impedindo a união do gameta à zona pelúcida quando da fertilização *in vitro* (FIV).

Na espermatogênese, a corrente de cálcio no canal *T* é inibida pela nifedipina (0,4 μ M) e pelo verapamil (70 μ M). O contato do espermatozóide com a ZP₃ gera fraca despolarização, estimulando os canais tipo-*T*, sendo esta fase também sensível aos antagonistas de canais de cálcio (FLORMAN et al., 1998).

Pesquisas apontam que antagonistas de canais de cálcio voltagem-dependentes adicionados antes do estímulo da ZP₃ inibem a elevação de cálcio intracelular, sua sustentação e, conseqüentemente, a reação acrossomal. A presença de diidropiridinas (nifedipina), benzotiazepinas (diltiazem) ou fenilalquilaminas (verapamil) bloqueou o aumento de cálcio intracelular no espermatozóide de touros, carneiros, humanos e camundongos, inibindo a reação acrossomal (DARSZON et al., 1999).

Estes antagonistas inibem com alta afinidade a condutância pelo fechamento dos canais de cálcio de baixa voltagem-dependência em células germinativas. As diidropiridinas inibem a fertilização com alta eficácia apenas após a capacitação espermática (ARNOULT et al., 1999).

Shirakawa e Miyazaki (1999) estudaram, em espermatozóides de hamsters, o aspecto espaço-temporal do aumento de cálcio durante a reação acrossomal induzida pelo contato da zona pelúcida. Uma rápida elevação no cálcio intracelular ocorreu imediatamente após o contato com a ZP₃. Este aumento sempre se iniciou na cabeça do espermatozóide, mesmo quando o primeiro contato com a zona pelúcida foi dada pela cauda. A exocitose acrossomal foi detectada aproximadamente 20 segundos após o início do aumento do cálcio no citosol. A elevação de cálcio intracelular foi completamente abolida sob condições de meio extracelular livre de cálcio, indicando a importância do influxo deste íon do meio extra para o intracelular no processo de reação acrossomal. Quando expostos à nifedipina, não ocorreu a fase de elevação de cálcio em resposta à zona pelúcida, inibindo a exocitose acrossomal.

Para os bloqueadores de canais do tipo-*T* (mibefradil a 1 μ M) são necessárias baixas doses para a inibição da reação acrossomal, enquanto que os antagonistas do tipo-*L* (nifedipina a 60 μ M) só bloqueiam em doses mais elevadas (SON; LEE; HAN, 2000).

Kirkman-Brown, Barratt e Publicover (2003) ao exporem espermatozóides de humanos à nifedipina (1, 10 ou 50 μ M) notaram que houve inibição da reação acrossomal induzida pela progesterona, devido à redução da duração do pico de cálcio, mas não de sua amplitude, principalmente a partir da concentração de 10 μ M.

Em resumo, muitos trabalhos foram realizados em diversas espécies utilizando-se bloqueadores de canais de íons cálcio, tanto como ferramenta para a pesquisa da fisiologia espermática (testes *in vitro*), como para averiguar os efeitos colaterais destes fármacos quando utilizados em terapias anti-hipertensivas e cardíacas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos para a avaliação dos efeitos causados por bloqueadores de canais de cálcio sobre espermatozóides de hamsters foram desenvolvidos no Laboratório de Reprodução Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP - Câmpus de Jaboticabal - SP e no Laboratório de Fotoquímica e Fotobiologia do Departamento de Química - FFCLRP- USP - Câmpus de Ribeirão Preto-SP.

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados como modelo experimental, hamsters Golden (*Mesocricetus auratus*) machos e fêmeas, adultos, de 2 a 6 meses de idade, pertencentes ao biotério do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, Câmpus de Jaboticabal - SP. A alimentação dos animais foi *ad libidum* com ração comercial peletizada para roedores, suplementada com abóbora e semente de girassol.

3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os experimentos foram realizados em espermatozóides (tratamento *in vitro*) e em hamsters machos (tratamento *in vivo*). Foram utilizados, como bloqueadores de canais de íons cálcio, os fármacos Verapamil, Nifedipina e Diltiazem. Os grupos experimentais foram avaliados pela comparação Controle x Tratado, dentro de cada experimento (*in vivo* e *in vitro*), compostos por:

Experimento	Bloqueadores de Canais de Cálcio
	Grupos
Tratamentos <i>In Vitro</i> (Espermatozoides)	Controle
	Verapamil
	Nifedipina
	Diltiazem
Tratamentos <i>In Vivo</i> (Hamsters machos)	Controle
	Verapamil
	Nifedipina
	Diltiazem

3.3 COLHEITA E CAPACITAÇÃO DOS ESPERMATOZÓIDES

Para a obtenção de espermatozóides, hamsters machos foram sacrificados por deslocamento cervical, tendo seus epidídimos dissecados e removidos. A cauda do epidídimo foi isolada e imersa sob óleo mineral, em uma placa de Petri de plástico (35mm), e repetidamente puncionada com uma agulha 30x7 (22g) na sua porção distal. O conteúdo da

cauda do epidídimo (CCE) foi colhido de acordo com a descrição de Bavister (1989). Foram transferidos 20µL do CCE para 2mL de meio TL-HEPES-PVA (ANEXO A) a 37°C e, após a verificação da viabilidade espermática (motilidade e vigor), 2µL de CCE foram transferidos para placas de Petri de plástico (35mm) contendo 2mL de meio TALP-PVA (ANEXO B) (aproximadamente 2×10^4 spz/mL) e 20 µL de solução de penicilamina, hipotaurina e epinefrina (PHE) (ANEXO C), e cobertas com 2mL de óleo de mineral. As placas contendo a suspensão de espermatozóides foram incubadas em estufa úmida a 37°C com 5% de CO₂ em ar, onde o tempo de capacitação para a fertilização *in vitro* foi de três horas. A motilidade e a hiperatividade espermática foram avaliadas na própria placa por microscopia óptica com contraste de fase.

3.4 PROCEDIMENTOS PARA A FECUNDAÇÃO *IN VITRO*

3.4.1 Obtenção dos oócitos

Para a aquisição de oócitos, hamsters fêmeas pesando entre 90 e 150g foram superovuladas com uma injeção intraperitoneal de 60UI de gonadotrofina coriônica eqüina (eCG) (Folligon[®] 1000UI, Intervet, Boxmeer, Holanda) pela manhã do dia 1 e, 54 a 58 horas após, receberam uma injeção intraperitoneal de 60UI de gonadotrofina coriônica humana (hCG) (Profasi[®] 2000UI, Serono, Aubonne, Suíça). Após 16 horas da administração da hCG, estas fêmeas foram sacrificadas por deslocamento cervical, tendo seu aparelho reprodutivo dissecado, os ovidutos isolados e as ampolas dilaceradas em placas de Petri de plástico

(35mm) com duas agulhas 30x7 (22g), sob microscópio estereoscópio. Os complexos *cumulus*-oócitos (CCO) foram transferidos para placas de Petri de plástico contendo meio TL-HEPES-PVA. Em seguida, a matriz celular dos CCOs foi dissolvida em meio TL-HEPES-PVA contendo 2mg/mL de hialuronidase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, H-4272). Os oócitos, então desnudos, foram lavados por três vezes em meio TL-HEPES-PVA e transferidos para as microgotas de fecundação (BAVISTER, 1989).

3.4.2 Fecundação *in vitro*

Os procedimentos para a fecundação *in vitro* foram realizados segundo Bavister (1989). Placas de Petri de plástico (35mm) contendo microgotas de 90µL de meio TALP-PVA e 2µL de PHE, sob óleo mineral, receberam 15 a 20 oócitos por gota, que foram inseminados com 1µL de suspensão de espermatozóides capacitados (item 3.3; aproximadamente 100 a 200 sptz/oócitos) e, em seguida, incubados em estufa a 37°C e 5% de CO₂ em ar durante seis horas.

3.5 AVALIAÇÃO DA FERTILIZAÇÃO DOS OÓCITOS

Para averiguar se houve ou não a fecundação dos oócitos inseminados, estes foram avaliados após seis horas da fertilização *in vitro*. A zona pelúcida dos oócitos foi removida com pronase (Sigma-Aldrich, P-6141) a 0,5% em PBS (ANEXO D) e, em seguida, foram

lavados por três vezes no meio TL-HEPES-PVA e corados por 15 minutos com Hoechst 33342 (10µg/mL) (Sigma-Aldrich, B-2261) diluído neste mesmo meio. Os oócitos foram colocados entre lâmina e lamínula, onde os pronúcleos masculino e feminino (oócitos fecundados) ou a metáfase (oócitos não fecundados) foram observados sob microscopia de epifluorescência (excitação 355nm, emissão 465nm) (Olympus BX 60, Japan).

3.6 AVALIAÇÃO DA CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA

Para a avaliação da capacitação espermática em função do tempo, os espermatozóides foram colhidos e transferidos para placas de Petri de plástico (35mm), conforme descrito no item 3.3. A avaliação da capacitação espermática foi realizada em cinco tempos: no momento da colheita, uma, duas, três e quatro horas após a incubação. Os espermatozóides foram corados com clortetraciclina (CTC) (Sigma-Aldrich, C-4881) e avaliados, sob lâmina e lamínula, por microscopia epifluorescente (excitação 395nm, emissão 560nm), conforme descrito por Cardullo e Florman (1993) (ANEXO E). Foram analisados e classificados 100 espermatozóides por lâmina.

Os espermatozóides corados com CTC foram classificados em quatro padrões:

- **F:** quando a fluorescência apresenta-se uniforme na cabeça, indicando que o espermatozóide não sofreu a capacitação e apresenta acrossomo intacto;
- **B:** região pós-acrossomal sem fluorescência e coloração em forma de banda, indicando início de capacitação, mas com o acrossomo ainda intacto;
- **S:** cabeça escura com pontos fluorescentes, indicando etapas finais da capacitação, porém ainda incompleta;
- **AR:** cabeça totalmente sem fluorescência, indicando que houve a reação acrossomal.

3.7 EXPERIMENTO I – TRATAMENTO *IN VITRO* DOS ESPERMATOZÓIDES COM OS BLOQUEADORES DE CANAIS DE CÁLCIO

Para a pesquisa dos efeitos dos bloqueadores de canais de cálcio verapamil, nifedipina e diltiazem em tratamentos *in vitro*, espermatozóides colhidos (item 3.3) foram incubados durante o período de capacitação com um dos três antagonistas de cálcio nas concentrações de 10 μ M, 100 μ M e 1mM. Os parâmetros avaliados foram motilidade, hiperatividade e capacitação espermáticas e taxa de fecundação *in vitro*.

O verapamil (Sigma-Aldrich, V-4629) e o diltiazem (Sigma-Aldrich, D-2521) foram diluídos diretamente no meio de capacitação, e a nifedipina (Sigma-Aldrich, N-7634) foi pré-diluída em uma solução com etanol a 0,5%.

Para o teste de capacitação espermática (item 3.6), foram realizadas seis repetições para cada concentração do fármaco e, quatro repetições para a avaliação da motilidade, da hiperatividade e da fertilização *in vitro* (item 3.4) com um total de 1.307 oócitos.

O CCE de um mesmo animal foi dividido entre os tratamentos controle e as três concentrações do fármaco, para melhor comparação dos resultados.

As análises estatísticas foram conduzidas empregando-se o programa computacional SAS (2000). As variáveis capacitação, motilidade e hiperatividade espermáticas foram avaliadas por um delineamento em parcelas (grupos) subdivididas no tempo. Quando a interação grupo x tempo foi significativa pelo teste F, as médias dos grupos em cada tempo foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As taxas de fecundação *in vitro* foram comparadas pelo teste de Qui-Quadrado (χ^2), com nível de significância de 5%.

3.8 EXPERIMENTO II – TRATAMENTO *IN VIVO* DOS MACHOS COM BLOQUEADORES DE CANAIS DE CÁLCIO

Para se verificar os efeitos dos bloqueadores de canais de cálcio em tratamentos *in vivo*, foram realizados testes de fertilidade *in vivo* (acasalamento), capacitação espermática e fecundação *in vitro*.

Hamsters machos (n=100), pesando de 95 a 160g e divididos em lotes uniformes, foram tratados com bloqueadores de canais de cálcio: verapamil (Vepamil[®], Neo Química, Anápolis, Go), nifedipina (Adalat[®], Bayer, São Paulo, SP) ou diltiazem (Balcor[®], Baldacci, São Paulo, SP). Estes fármacos foram administrados pela via oral (sistema de gavagem), duas vezes ao dia, iniciando-se 60 dias antes da realização dos testes de habilidade de fecundação. O grupo controle recebeu água como placebo.

As doses utilizadas foram 40mg/kg/dia de verapamil, 50mg/kg/dia de nifedipina e 40mg/kg/dia de diltiazem, calculadas com analogia à espécie humana e respeitando-se a DL₅₀ para hamsters. As drogas verapamil e diltiazem foram diluídas em água destilada e a nifedipina, em água com 0,5% de Tween 80 (Sigma-Aldrich, P-4780), no momento do uso.

Para o teste de fertilidade *in vivo* foram utilizados oito animais por grupo, para o de capacitação espermática (item 3.6), oito hamsters machos por grupo e, para o de fecundação *in vitro* (item 3.4), cinco animais por grupo, num total de 1.667 oócitos.

O acasalamento foi realizado com duas fêmeas para cada macho em um período de oito dias, referindo-se a dois ciclos estrais. Neste teste *in vivo*, os machos continuaram a receber o medicamento durante toda a fase experimental (período de acasalamento). Após 16 dias (período de gestação), o número de filhotes por ninhada foi registrado.

A variável capacitação espermática foi analisada utilizando-se um delineamento em parcelas (grupos) subdivididas no tempo. Quando a interação grupo x tempo foi significativa

pelo teste F, as médias dos grupos em cada tempo foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. O número de filhotes por ninhada foi analisado por um modelo que incluiu os efeitos de tratamento (grupos) e animal, sendo o efeito de tratamento significativo pelo teste F, as médias dos grupos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As taxas de fecundação *in vivo* e *in vitro* foram comparadas pelo teste de χ^2 , com nível de significância de 5%.

3.9 EXPERIMENTO III – DOSAGEM DE CÁLCIO INTRACELULAR EM ESPERMATOZÓIDES

Para se averiguar a influência dos bloqueadores de canais de íons cálcio sobre espermatozóides de hamsters, a quantidade do íon cálcio foi mensurada no meio intracelular deste gameta.

Espermatozóides foram colhidos (item 3.3) e 30 μ L do CCE foram transferidos para 1mL de meio TALP (ANEXO F), livre de cálcio e vermelho fenol (pH 7,4), a 37°C e, após a verificação da viabilidade espermática (motilidade e vigor), a concentração espermática foi ajustada para 35 x 10⁶ sptz/mL. Esta mistura, contendo os espermatozóides, foi colocada em um microtubo e acrescido de 10 μ M de Fluo 3-AM (Sigma-Aldrich, F-6142) ao meio, e levada à estufa úmida a 37°C com 5% de CO₂ em ar por 30 minutos, para o carregamento da sonda nos gametas.

Após decorrido este tempo, esta mistura foi centrifugada por quatro minutos a 300xg (1500 rpm) e descartado o sobrenadante. Os espermatozóides foram ressuspensos em 6mL de meio TALP livre de cálcio (aproximadamente 6x10⁶ sptz/mL), acrescido de BSA

(3mg/mL) e de PHE (10 μ L/mL). Desta suspensão, 2mL foram colocados em uma cubeta de quartzo para a mensuração do cálcio intracelular no espectrofluorímetro (Hitachi F-4500, Japan) (excitação 496nm, emissão 525nm) com temperatura controlada a 37°C, sob agitação magnética.

A adição dos bloqueadores de canais de cálcio (verapamil, nifedipina ou diltiazem, a 50 μ M), bem como do íon cálcio (cálcio extracelular) e do cálcio ionóforo A23187 (3 μ M) (Sigma-Aldrich, C-7522), foi realizada como mostra o esquema do delineamento experimental para o grupo controle e tratado em cada experimento, respectivamente:

A variação da intensidade de fluorescência do Fluo 3-AM foi registrada de forma temporal por 720 segundos.

Foram realizadas cinco repetições (animais) para cada experimento, sempre se comparando Grupo Controle x Grupo Bloqueador de Cálcio. Para se conseguir o mesmo

padrão de carregamento da sonda Fluo-3AM, os espermatozóides de um mesmo animal foram utilizados tanto para o grupo controle como para o tratado, assim, obtendo-se resultados mais fidedignos.

O valor obtido da leitura da intensidade de fluorescência foi lançado na seguinte fórmula para se calcular a concentração do cálcio intracelular (GRYNKIEWICZ; POENIE; TSIEN, 1985).

$$[Ca^{+2}]_{IC} = K_d \times \left(\frac{F - F_{min}}{F_{max} - F} \right)$$

onde,

K_d = constante de dissociação *in vitro* do Fluo 3-AM (=390)

F = razão de fluorescência obtida por excitação em 496nm e emissão em 525nm.

F_{min} = razão de fluorescência obtida em concentração nula de cálcio.

F_{max} = razão de fluorescência em presença saturante de cálcio (adição de cálcio ionóforo).

A análise estatística da variação das concentrações de cálcio intracelular foi realizada no tempo de 100 segundos após a administração do cálcio exógeno, dada a estabilização do sistema biológico no espectrofluorímetro.

A variável cálcio intracelular, previamente transformada em log, foi analisada no tempo 100 segundos, utilizando um modelo que incluiu os efeitos de tratamentos (controle x bloqueador) e animal. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4 RESULTADOS

4.1 EXPERIMENTO I - TRATAMENTOS *IN VITRO* DOS ESPERMATOZÓIDES COM BLOQUEADORES DE CANAIS DE CÁLCIO

4.1.1 Capacitação espermática *in vitro* na presença de bloqueadores de canais de cálcio

Este experimento teve como objetivo averiguar a interferência dos bloqueadores de canais de cálcio verapamil, nifedipina e diltiazem na capacitação espermática, fazendo-se uso de tratamentos *in vitro*.

A avaliação da capacitação espermática pela coloração da CTC (Figura 04) foi de maneira temporal: no momento da colheita, uma, duas, três e quatro horas no meio de capacitação. Os espermatozóides foram classificados como **F** (espermatozóide que não sofreu capacitação e com o acrossomo intacto), **B** (início de capacitação), **S** (etapa final de capacitação, mas ainda incompleta) e **AR** (reação acrossomal).

O grupo controle apresentou maior porcentagem de gametas ($p < 0,001$) que sofreram capacitação espermática e acrossomo reagido ao longo do tempo em relação aos grupos tratados *in vitro* com os antagonistas de íon cálcio.

No momento da colheita, a quantidade de espermatozóides que não sofreram a capacitação (**F**) dos grupos controle x tratado em três concentrações foram semelhantes por ser cada repetição do mesmo animal. Ao longo do período de capacitação, os grupos tratados

com os bloqueadores de canais de cálcio verapamil (Tabela 01 e Figura 01), nifedipina (Tabela 02 e Figura 02) e diltiazem (Tabela 03 e Figura 03) a 10 μ M e a 100 μ M conseguiram iniciar a capacitação espermática. Porém, em menor velocidade e quantidade em relação ao grupo controle, alguns até alcançaram o final da capacitação, representada pelos padrões de coloração **B** e **S**, mas poucos concluíram a reação acrossomal (padrão **AR**).

No entanto, os espermatozóides incubados com verapamil a 1mM não conseguiram iniciar sua capacitação e tão pouco atingir a reação acrossomal, e os tratados com nifedipina e diltiazem a 1mM esta foi desencadeada, porém, em menor número.

Os bloqueadores de canais de cálcio verapamil, nifedipina e diltiazem, nas concentrações 10 μ M, 100 μ M e 1mM, atuaram negativamente na capacitação e na reação acrossomal dos espermatozóides, de forma dose-dependente; o grupo controle apresentou resultados de capacitação espermática e de reação acrossomal estatisticamente superiores ($p<0,001$).

- Verapamil

Tabela 01 - Classificação de espermatozóides de hamsters quanto à capacitação (porcentagem média), na presença de verapamil nas concentrações de 10 μ M, 100 μ M e 1mM, no momento da colheita, uma, duas, três e quatro horas no meio de capacitação. Jaboticabal-SP, 2004

Tempo de capacitação	Padrão de coloração	Concentração de Verapamil			
		Controle	10 μ M	100 μ M	1mM
Momento da colheita	F	97,0 ^a	98,2 ^a	98,3 ^a	97,8 ^a
	B	1,0 ^a	0,3 ^a	0,4 ^a	0,4 ^a
	S	0,8 ^a	0,3 ^a	0,3 ^a	0,5 ^a
	AR	1,2 ^a	1,2 ^a	1,0 ^a	1,3 ^a
1 hora	F	78,0 ^a	89,0 ^b	92,3 ^b	95,6 ^b
	B	11,2 ^a	6,7 ^b	3,0 ^b	1,0 ^b
	S	5,8 ^a	2,8 ^b	2,0 ^b	1,7 ^b
	AR	5,0 ^a	1,5 ^b	2,4 ^b	1,7 ^b
2 horas	F	61,0 ^a	83,4 ^b	86,5 ^b	95,4 ^c
	B	20,2 ^a	10,0 ^b	6,2 ^b	0,5 ^c
	S	11,8 ^a	3,0 ^b	3,0 ^b	2,0 ^c
	AR	7,0 ^a	3,6 ^b	4,3 ^b	2,1 ^c
3 horas	F	49,4 ^a	74,3 ^b	76,5 ^b	93,2 ^c
	B	22,6 ^a	11,6 ^b	9,5 ^b	1,5 ^c
	S	14,8 ^a	8,4 ^b	7,6 ^b	2,5 ^c
	AR	13,2 ^a	5,7 ^b	6,4 ^b	2,8 ^c
4 horas	F	35,0 ^a	60,4 ^b	67,6 ^b	92,3 ^c
	B	25,2 ^a	19,3 ^b	14,2 ^b	1,5 ^c
	S	19,0 ^a	12,8 ^b	10,0 ^b	2,6 ^c
	AR	20,8 ^a	7,5 ^b	8,2 ^b	3,6 ^c

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem-se estatisticamente entre si (p<0,001).

F (sptz não capacitado), **B** (início de capacitação), **S** (capacitação incompleta) e **AR** (reação acrossomal).

Letras diferentes no mesmo gráfico diferem-se estatisticamente entre si ($p < 0,001$).

F (sptz não capacitado), **B** (início de capacitação), **S** (capacitação incompleta) e **AR** (reação acrossomal).

Figura 01 - Avaliação classificatória da capacitação espermática (porcentagem média) na presença de verapamil nas concentrações de 10 μ M, 100 μ M e 1mM, no momento da colheita, uma, duas, três e quatro horas no meio de capacitação.

- Nifedipina

Tabela 02 - Classificação de espermatozóides de hamsters quanto à capacitação (porcentagem média), na presença de nifedipina nas concentrações de 10 μ M, 100 μ M e 1mM, no momento da colheita, uma, duas, três e quatro horas no meio de capacitação. Jaboticabal-SP, 2004

Tempo de capacitação	Padrão de coloração	Concentração de Nifedipina			
		Controle	10 μ M	100 μ M	1mM
Momento da colheita	F	96,6 ^a	97,4 ^a	98,0 ^a	97,5 ^a
	B	1,0 ^a	1,0 ^a	0,3 ^a	0,7 ^a
	S	0,8 ^a	0,5 ^a	0,3 ^a	0,5 ^a
	AR	1,6 ^a	1,1 ^a	1,4 ^a	1,3 ^a
1 hora	F	79,2 ^a	95,8 ^b	94,8 ^b	93,5 ^b
	B	7,6 ^a	1,4 ^b	1,3 ^b	1,5 ^b
	S	7,4 ^a	1,0 ^b	1,4 ^b	2,5 ^b
	AR	5,8 ^a	1,8 ^b	2,5 ^b	2,5 ^b
2 horas	F	64,8 ^a	84,5 ^b	88,8 ^b	88,0 ^b
	B	15,2 ^a	5,2 ^b	3,2 ^b	3,8 ^b
	S	11,4 ^a	5,5 ^b	3,8 ^b	4,2 ^b
	AR	8,6 ^a	4,8 ^b	4,2 ^b	4,0 ^b
3 horas	F	48,5 ^a	74,3 ^b	82,0 ^b	82,8 ^b
	B	20,1 ^a	10,4 ^b	5,5 ^b	5,5 ^b
	S	16,4 ^a	8,1 ^b	6,0 ^b	5,5 ^b
	AR	15,0 ^a	7,2 ^b	6,5 ^b	6,2 ^b
4 horas	F	35,1 ^a	61,8 ^b	68,2 ^b	76,6 ^b
	B	21,1 ^a	15,0 ^b	11,7 ^b	7,2 ^b
	S	25,2 ^a	12,4 ^b	10,0 ^b	7,0 ^b
	AR	18,8 ^a	10,8 ^b	10,1 ^b	9,2 ^b

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem-se estatisticamente entre si (p<0,001).

F (sptz não capacitado), **B** (início de capacitação), **S** (capacitação incompleta) e **AR** (reação acrossomal).

Letras diferentes no mesmo gráfico diferem-se estatisticamente entre si ($p < 0,001$).

F (sptz não capacitado), **B** (início de capacitação), **S** (capacitação incompleta) e **AR** (reação acrossomal).

Figura 02 - Avaliação classificatória da capacitação espermática (porcentagem média) na presença de nifedipina nas concentrações de 10 μ M, 100 μ M e 1mM, no momento da colheita, uma, duas, três e quatro horas no meio de capacitação.

- Diltiazem

Tabela 03 - Classificação de espermatozóides de hamsters quanto à capacitação (porcentagem média), na presença de diltiazem nas concentrações de 10 μ M, 100 μ M e 1mM, no momento da colheita, uma, duas, três e quatro horas no meio de capacitação. Jaboticabal-SP, 2004

Tempo de capacitação	Padrão de coloração	Concentração de Diltiazem			
		Controle	10 μ M	100 μ M	1mM
Momento da colheita	F	95,8 ^a	95,9 ^a	96,8 ^a	97,5 ^a
	B	1,8 ^a	1,9 ^a	1,4 ^a	0,5 ^a
	S	1,0 ^a	0,6 ^a	0,6 ^a	0,6 ^a
	AR	1,4 ^a	1,6 ^a	1,2 ^a	1,4 ^a
1 hora	F	73,6 ^a	86,2 ^b	91,2 ^b	91,9 ^b
	B	11,6 ^a	6,2 ^b	3,8 ^b	1,9 ^b
	S	8,4 ^a	3,6 ^b	2,0 ^b	2,6 ^b
	AR	6,4 ^a	4,0 ^a	3,0 ^a	3,6 ^a
2 horas	F	55,6 ^a	80,8 ^b	84,6 ^b	90,5 ^b
	B	19,6 ^a	8,4 ^b	7,5 ^b	2,0 ^c
	S	15,6 ^a	6,0 ^b	4,0 ^b	3,4 ^b
	AR	9,2 ^a	4,8 ^b	3,9 ^b	4,1 ^b
3 horas	F	41,0 ^a	72,6 ^b	79,0 ^b	85,6 ^b
	B	23,2 ^a	11,4 ^b	10,4 ^b	4,0 ^b
	S	20,8 ^a	8,8 ^b	5,3 ^b	4,2 ^b
	AR	15,0 ^a	7,2 ^b	5,3 ^b	6,2 ^b
4 horas	F	29,6 ^a	65,5 ^b	69,9 ^b	83,2 ^b
	B	22,8 ^a	13,4 ^b	14,3 ^b	4,6 ^c
	S	26,4 ^a	11,8 ^b	8,6 ^b	5,0 ^b
	AR	21,2 ^a	9,3 ^b	7,2 ^b	7,2 ^b

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem-se estatisticamente entre si (p<0,001).

F (sptz não capacitado), **B** (início de capacitação), **S** (capacitação incompleta) e **AR** (reação acrossomal).

Letras diferentes no mesmo gráfico diferem-se estatisticamente entre si ($p < 0,001$).

F (sptz não capacitado), **B** (início de capacitação), **S** (capacitação incompleta) e **AR** (reação acrossomal).

Figura 03 - Avaliação classificatória da capacitação espermática (porcentagem média) na presença de diltiazem nas concentrações de 10 μ M, 100 μ M e 1mM, no momento da colheita, uma, duas, três e quatro horas no meio de capacitação.

Figura 04 - Espermatozoides de hamsters corados com clortetraciclina e observados em microscópio de epifluorescência. **(a)** Padrão **F**, quando a fluorescência apresenta-se uniforme na cabeça, indicando espermatozóide que não sofreu capacitação e acrossomo intacto; **(b)** Padrão **B**, região pós-acrossomal sem fluorescência e coloração em forma de banda, indicando início de capacitação e acrossomo intacto; **(c)** Padrão **S**, cabeça escura com pontos fluorescentes, indicando etapas finais da capacitação, porém ainda incompleta; e **(d)** Padrão **AR**, cabeça totalmente sem fluorescência, indicando que houve a reação acrossomal. Imagens digitalizadas.

4.1.2 Capacitação espermática *in vitro* na presença de bloqueadores de canais de cálcio e fertilização *in vitro*

O objetivo deste experimento foi avaliar se o tratamento *in vitro* de espermatozóides de hamsters com bloqueadores de canais de cálcio durante a capacitação poderia alterar a motilidade e hiperatividade espermáticas, e a taxa de fecundação *in vitro* em oócitos de hamsters.

Os fármacos nas concentrações de 10 μ M e de 100 μ M reduziram a motilidade e hiperatividade espermáticas e a taxa de fertilização *in vitro*, porém, a concentração de 1mM praticamente bloqueou estes parâmetros, principalmente a motilidade e a hiperatividade com o verapamil e o diltiazem.

Os antagonistas verapamil, nifedipina e diltiazem, nas concentrações de 10 μ M, 100 μ M e 1mM, atuaram negativamente na motilidade e na hiperatividade dos espermatozóides durante a capacitação espermática por três horas (Tabelas 04, 06 e 08), de forma dose-dependente, como também na taxa de fecundação *in vitro* (Tabelas 05, 07 e 09 e Figuras 05 e 06). A taxa de fecundação do grupo controle foi estatisticamente superior ($p < 0,01$), pelo teste do χ^2 , quando comparado aos grupos tratados *in vitro* com os bloqueadores de canais de cálcio.

- Tratamento a 10 μ M

Tabela 04 - Motilidade espermática inicial e motilidade e hiperatividade espermáticas (porcentagem média) após três horas de incubação com 10 μ M do bloqueador de canal de íon cálcio. Jaboticabal-SP, 2004

Parâmetros	Motilidade	Três Horas de Capacitação			
	Inicial	Controle	Verapamil	Nifedipina	Diltiazem
Motilidade (%)	97,0	85,0 ^a	80,0 ^b	76,7 ^b	78,4 ^b
Hiperatividade (%)	-	83,4 ^a	73,4 ^b	73,4 ^b	53,4 ^c

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem-se estatisticamente entre si (p<0,01).

Tabela 05 - Número de oócitos e porcentagem da fertilidade *in vitro* (taxa de fecundação e polispermia) de espermatozóides incubados com 10 μ M do bloqueador de canal de íon cálcio. Jaboticabal-SP, 2004

Tratamento	Fecundado n (%)	Não Fecundado n (%)	Polispermia n (%)	Número de Oócitos
Controle	94 (94,0) ^a	6 (6,0) ^a	0 ^a	100
Verapamil	90 (83,4) ^b	14 (12,9) ^b	4 (3,7) ^a	108
Nifedipina	78 (81,3) ^b	16 (16,6) ^b	2 (2,1) ^a	96
Diltiazem	52 (78,9) ^b	14 (21,1) ^b	0 ^a	66
Total	-	-	-	370

Números seguidos de letras diferentes na mesma coluna diferem-se estatisticamente entre si (p<0,01).

- Tratamento a 100 μ M

Tabela 06 - Motilidade espermática inicial e motilidade e hiperatividade espermáticas (porcentagem média) após três horas da incubação com 100 μ M do bloqueador de canal de íon cálcio. Jaboticabal-SP, 2004

Parâmetros	Motilidade	Três Horas de Capacitação			
	Inicial	Controle	Verapamil	Nifedipina	Diltiazem
Motilidade (%)	97,5	86,7 ^a	73,4 ^b	66,7 ^b	66,0 ^b
Hiperatividade (%)	-	85,0 ^a	56,7 ^b	46,7 ^b	30,0 ^c

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem-se estatisticamente entre si ($p < 0,001$).

Tabela 07 - Número de oócitos e porcentagem da fertilidade *in vitro* (taxa de fecundação e polispermia) de espermatozóides incubados com 100 μ M do bloqueador de canal de íon cálcio. Jaboticabal-SP, 2004

Tratamento	Fecundado n (%)	Não Fecundado n (%)	Polispermia n (%)	Número de Oócitos
Controle	182 (86,7) ^a	30 (12,4) ^a	2 (0,9) ^a	214
Verapamil	18 (10,4) ^c	156 (89,6) ^c	0 ^a	174
Nifedipina	40 (31,2) ^b	88 (68,8) ^b	0 ^a	128
Diltiazem	4 (6,0) ^c	63 (94,0) ^c	0 ^a	67
Total	-	-	-	583

Números seguidos de letras diferentes na mesma coluna diferem-se estatisticamente entre si ($p < 0,001$).

- Tratamento a 1mM

Tabela 08 - Motilidade espermática inicial e motilidade e hiperatividade espermáticas (porcentagem média) após três horas da incubação com 1mM do bloqueador de canal de íon cálcio. Jaboticabal-SP, 2004

Parâmetros	Motilidade	Três Horas de Capacitação			
	Inicial	Controle	Verapamil	Nifedipina	Diltiazem
Motilidade (%)	95,0	90,0 ^a	0 ^d	70,0 ^b	15,0 ^c
Hiperatividade (%)	-	85,0 ^a	0 ^d	45,0 ^b	3,4 ^c

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem-se estatisticamente entre si (p<0,001).

Tabela 09 - Número de oócitos e porcentagem da fertilidade *in vitro* (taxa de fecundação e polispermia) de espermatozóides incubados com 1mM do bloqueador de canal de íon cálcio. Jaboticabal-SP, 2004

Tratamento	Fecundado n (%)	Não Fecundado n (%)	Polispermia n(%)	Número de Oócitos
Controle	72 (92,3) ^a	6 (7,7) ^a	0 ^a	78
Verapamil	0 ^b	100 (100) ^b	0 ^a	100
Nifedipina	3 (4,7) ^b	61 (95,3) ^b	0 ^a	64
Diltiazem	2 (1,8) ^b	110 (98,2) ^b	0 ^a	112
Total	-	-	-	354

Números seguidos de letras diferentes na mesma coluna diferem-se estatisticamente entre si (p<0,001).

Letras diferentes no mesmo gráfico, a taxa de fecundados diferem-se estatisticamente entre si ($p < 0,001$).

Figura 05 - Fertilidade *in vitro* (taxa de fecundação e polispermia) de espermatozóides capacitados por três horas com os bloqueadores de canais de íon cálcio verapamil, nifedipina ou diltiazem nas concentrações de 10 μ M, 100 μ M e 1mM.

Figura 06 - Oócitos corados com Hoechst 33342. (a) Oócito fecundado; (b) Oócito não fecundado; (c) Polispermia. Imagens digitalizadas.

4.2 EXPERIMENTO II - TRATAMENTO *IN VIVO* DE HAMSTERS MACHOS COM BLOQUEADORES DE CANAIS DE CÁLCIO

4.2.1 Fertilidade *in vivo* de machos tratados com bloqueadores de canais de cálcio

Após o tratamento com os bloqueadores de canais de cálcio, por via oral durante 60 dias, referente ao período aproximado de uma espermatogênese, oito machos por grupo foram acasalados com fêmeas não tratadas. Cada macho acasalou com duas fêmeas no período de dois ciclos estrais (oito dias), perfazendo 16 fêmeas por grupo, que foram avaliadas quanto à prenhez e ao número de filhotes (Tabela 10).

Tabela 10 - Fertilidade *in vivo* de fêmeas acasaladas com machos tratados com bloqueadores de canais de cálcio por via oral durante 60 dias, e número médio de filhotes por ninhada. Jaboticabal-SP, 2004

Parâmetros	Controle (%)	Verapamil (%)	Nifedipina (%)	Diltiazem (%)
Fertilidade	16/16 (100) ^a	9/16 (56,25) ^b	11/16 (68,75) ^b	15/16 (93,75) ^a
Filhotes por ninhada	12,1 ^a	9,78 ^a	10,73 ^a	11,2 ^a

Números seguidos de letras diferentes na mesma linha diferem-se estatisticamente entre si ($p < 0,05$).

Nos grupos verapamil e nifedipina houve uma redução do número de parições ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle, não ocorrendo com o grupo diltiazem. Não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) com relação ao número de filhotes por ninhada entre os grupos experimentais.

4.2.2 Capacitação *in vitro* dos espermatozóides de machos tratados com bloqueadores de canais de cálcio

Espermatozóides de hamsters machos, tratados com bloqueadores de canais de cálcio por 60 dias, foram submetidos ao teste de capacitação espermática *in vitro* para se avaliar os possíveis efeitos causados pela terapia de anti-hipertensivos.

A média da motilidade e da hiperatividade dos espermatozóides dos grupos verapamil (78,5% e 70%, respectivamente) e nifedipina (75,5% e 69%), após três horas de capacitação, apresentaram menor qualidade estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação aos grupos controle (87,5% e 84,5%) e diltiazem (83,5% e 80%).

Poucos espermatozóides, pertencentes a machos dos grupos que receberam os antagonistas de cálcio, iniciaram a capacitação espermática (**B**), apresentaram capacitação incompleta (**S**) e concluíram a reação acrossomal (**AR**). Também, a capacitação espermática ocorreu em menor velocidade e quantidade ($p < 0,001$) ao longo do tempo em relação ao grupo controle (Tabela 11 e Figura 07).

Desta forma, o grupo controle, que recebeu água como placebo pela via oral, teve maior porcentagem ($p < 0,001$) de espermatozóides que sofreram capacitação e reação acrossomal em relação aos grupos tratados com os antagonistas de cálcio, indicando que houve redução da habilidade de fecundação com esta terapia. As imagens digitalizadas dos espermatozóides corados com clortetraciclina são visualizadas na Figura 04.

Tabela 11 - Classificação da capacitação espermática *in vitro* (porcentagem média) de hamsters machos submetidos à terapia oral com bloqueadores de canais de cálcio por 60 dias, no momento da colheita, uma, duas, três e quatro horas no meio de capacitação. Jaboticabal-SP, 2004

Tempo de capacitação	Padrão de coloração	Grupos Experimentais			
		Controle	Verapamil	Nifedipina	Diltiazem
Momento da colheita	F	92,6 ^a	92,7 ^a	90,0 ^a	91,4 ^a
	B	1,6 ^a	1,0 ^a	2,4 ^a	2,0 ^a
	S	2,7 ^a	2,3 ^a	3,4 ^a	2,6 ^a
	AR	3,0 ^a	4,0 ^a	4,2 ^a	4,0 ^a
1 hora	F	67,7 ^a	89,0 ^b	83,4 ^b	86,2 ^b
	B	13,7 ^a	3,6 ^b	7,8 ^b	4,4 ^b
	S	11,6 ^a	3,6 ^b	5,0 ^b	4,8 ^b
	AR	7,0 ^a	3,8 ^b	3,8 ^b	4,6 ^b
2 horas	F	44 ^a	72,8 ^b	79,4 ^b	83,4 ^b
	B	20,4 ^a	11,4 ^b	8,2 ^b	4,2 ^b
	S	20,0 ^a	8,2 ^b	5,7 ^b	5,0 ^b
	AR	15,5 ^a	7,6 ^b	6,7 ^b	7,4 ^b
3 horas	F	30,3 ^a	62,4 ^b	69 ^b	74,8 ^b
	B	25,3 ^a	15,8 ^b	10,4 ^b	6,8 ^b
	S	25,6 ^a	9,6 ^b	11,0 ^b	10,8 ^b
	AR	18,8 ^a	12,2 ^b	9,6 ^b	7,6 ^b
4 horas	F	18,7 ^a	58,6 ^b	62,0 ^b	69,6 ^b
	B	21,7 ^a	16,8 ^b	8,0 ^b	9,0 ^b
	S	27,3 ^a	13,2 ^b	13,0 ^b	12,0 ^b
	AR	32,3 ^a	11,4 ^b	14,0 ^b	9,4 ^b

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem-se estatisticamente entre si ($p < 0,001$).

F (sptz não capacitado), **B** (início de capacitação), **S** (capacitação incompleta) e **AR** (reação acrossomal).

Letras diferentes no mesmo gráfico diferem-se estatisticamente entre si ($p < 0,001$).

F (sptz não capacitado), B (início de capacitação), S (capacitação incompleta) e AR (reação acrossomal).

Figura 07 - Avaliação classificatória (porcentagem média) da capacitação espermática *in vitro* de machos submetidos à terapia oral com bloqueadores de canais de cálcio por 60 dias, no momento da colheita, uma, duas, três e quatro horas no meio de capacitação.

4.2.3 Fertilidade *in vitro* dos espermatozóides de machos tratados *in vivo* com bloqueadores de canais de cálcio

Com o objetivo de averiguar os efeitos da terapia de bloqueadores de canais de cálcio por 60 dias sobre a fertilidade de hamsters machos, os espermatozóides colhidos foram capacitados *in vitro* por três horas e, posteriormente, realizado o teste de fecundação *in vitro* em oócitos de hamsters.

A taxa de fertilidade *in vitro* de machos tratados com verapamil (37,5%), nifedipina (38,2%) e diltiazem (29,4%) foi inferior estatisticamente ($p < 0,001$) a do grupo controle (91,1%) (Tabela 12 e Figura 08), mostrando que a terapia de bloqueadores de canais de cálcio reduziu a fertilidade em machos.

Tabela 12 - Número de oócitos e porcentagem da fertilidade *in vitro* de espermatozóides de machos submetidos à terapia oral com bloqueadores de canais de cálcio por 60 dias. Jaboticabal-SP, 2004

Tratamento	Fecundado n (%)	Não Fecundado n (%)	Número de Oócitos
Controle	359 (91,1) ^a	35 (8,9) ^a	394
Verapamil	157 (37,5) ^b	261 (62,5) ^b	418
Nifedipina	163 (38,2) ^b	263 (61,8) ^b	426
Diltiazem	126 (29,4) ^b	303 (70,6) ^b	429
Total	-	-	1667

Números seguidos de letras diferentes na mesma coluna diferem-se estatisticamente entre si ($p < 0,001$).

Letras diferentes diferem-se estatisticamente entre si ($p < 0,001$).

Figura 08 - Taxa da fertilização *in vitro* de espermatozoides de hamsters submetidos à terapia oral com bloqueadores de canais de cálcio por 60 dias.

Comparando-se os resultados dos testes de fertilidade *in vivo* (prenhez) (item 4.2.1) e *in vitro* (FIV) (item 4.2.3), a taxa de prenhez (100%) e de FIV (91,1%) no grupo controle não diferiram entre si ($p > 0,05$). Nos grupos que receberam os bloqueadores de canais de cálcio verapamil, nifedipina e diltiazem, as taxas de prenhez (56,25; 68,75 e 93,75%, respectivamente) e as da FIV (37,5; 38,2 e 29,4%, respectivamente), apresentaram diferenças estatísticas significativas ($p < 0,001$).

4.3 EXPERIMENTO III - DOSAGEM DE CÁLCIO INTRACELULAR EM ESPERMATOZÓIDES

A dosagem de cálcio intracelular em espermatozóides teve como objetivo verificar a entrada do íon cálcio do meio extracelular para dentro do gameta na presença de bloqueadores de canais de cálcio.

O grupo controle apresentou concentrações médias superiores estatisticamente ($p < 0,0001$) de cálcio intracelular em espermatozóides quando comparado aos tratamentos com verapamil (Figura 09), nifedipina (Figura 10) e diltiazem (Figura 11).

Os bloqueadores de canais de íon cálcio voltagem-dependentes utilizados reduziram a resposta celular ao cálcio exógeno, impedindo quase por completo a sua entrada no espermatozóide.

A seguir estão apresentados os gráficos obtidos das concentrações médias de cálcio intracelular (nM) em espermatozóides durante o tempo (s) nos grupos experimentais:

Figura 09 - Concentrações médias do cálcio intracelular (nM) em espermatozóides nos grupos controle e verapamil por 200 segundos.

A concentração média de cálcio intracelular no tempo de 100 segundos, após a administração do cálcio exógeno, no grupo controle foi de $3,62\mu\text{M}$ e no grupo verapamil foi de $0,45\mu\text{M}$ ($p < 0,0001$).

Figura 10 - Concentrações médias do cálcio intracelular (nM) em espermatozóides nos grupos controle e nifedipina por 200 segundos.

A concentração média de cálcio intracelular no tempo de 100 segundos, após a administração do cálcio exógeno, no grupo controle foi de $1,38\mu\text{M}$ e no grupo nifedipina foi de $0,46\mu\text{M}$ ($p < 0,0001$).

Figura 11 - Concentrações médias do cálcio intracelular (nM) em espermatozóides nos grupos controle e diltiazem por 200 segundos.

A concentração média de cálcio intracelular no tempo de 100 segundos, após a administração do cálcio exógeno, no grupo controle foi de $2,51\mu M$ e no grupo diltiazem foi de $0,40\mu M$ ($p < 0,0001$).

Todos os bloqueadores de canais de íons cálcio voltagem dependentes reduziram a resposta celular ao cálcio exógeno.

5 DISCUSSÃO

A literatura mostra que há grandes divergências entre os pesquisadores quanto ao tipo de canal voltagem-dependente que o espermatozóide possui em sua membrana plasmática, se é do tipo-*L* (alta voltagem) ou do tipo-*T* (baixa voltagem), como também se os bloqueadores de canais de cálcio verapamil, nifedipina e diltiazem são específicos ou não para o canal do tipo-*L*.

Gilman et al. (1991) e Janis, Silver e Triggle (1987) definiram bloqueadores de canais de cálcio como fármacos que interferem negativamente nos processos dependentes de cálcio pela inibição do aumento intracelular deste íon. Ainda, que os bloqueadores verapamil, nifedipina e diltiazem agem em canais de cálcio voltagem-dependentes do tipo-*L*, e que são uma das melhores ferramentas para se detectar a presença deste tipo de canal na membrana plasmática. Relataram também, que a nifedipina tem maior especificidade nos canais de cálcio que o verapamil e o diltiazem, estes podendo agir em outros tipos de trocas iônicas envolvendo o cálcio. Já Darszon et al. (2001) consideraram as diidropiridinas (nifedipina) como antagonistas dos canais de cálcio do tipo-*T*.

Os espermatozóides de mamíferos possuem um mecanismo de entrada de cálcio com a mesma sensibilidade farmacológica dos canais de cálcio voltagem-dependentes de músculos esqueléticos e cardíacos (tipo-*L*) (BABCOCK; PFIFFER, 1987; COX; PETERSON, 1989). Já Arnoult, Villaz e Florman (1998) encontraram que as propriedades farmacológicas de canais de baixa voltagem em células espermátogênicas murinas diferem das células somáticas, sugerindo uma grande diversidade de canais.

Vários estudos encontrados na literatura em diversas espécies envolvendo eletrofisiologia, farmacologia e biologia molecular relataram que durante a despolarização da membrana plasmática na reação acrossomal podem estar presentes os canais de cálcio voltagem-dependentes do tipo-*L* e os do tipo-*T* (BENOFF, 1998; DARSZON et al., 1999; FLORMAN et al., 1998).

Os trabalhos de Arnoult et al. (1996), Espinosa et al. (1999), Florman et al. (1998), Liévano et al. (1996) e Santi, Darszon e Hernández-Cruz (1996) em espermatozóides de murinos, Son, Lee e Han (2000) em humanos, e Wassarman (1999) em mamíferos, consideraram o tipo-*T* como o canal de cálcio voltagem-dependente responsável pela reação acrossomal, e Benhoff et al. (1994), Benhoff (1998) e Goodwin et al. (2001) em espermatozóides de roedores e humanos, o tipo-*L*.

Flesh e Gardella (2000) e Jagannathan, Publicover e Barratt (2002) determinaram em espermatozóides de humanos e roedores que o tipo-*T* está envolvido no influxo de cálcio em espermatozóides, porém o tipo-*L* também foi encontrado e sua função ainda não é conhecida.

Benhoff (1998) referiu-se aos canais de cálcio presentes nos espermatozóides como tipo-*T-like* ou tipo-*L-like*, caracterizando-os de baixa voltagem e sensíveis à nifedipina. Relatou, ainda, que tanto o tipo-*L* quanto o tipo-*T* participam de processos de exocitose em células somáticas e, por isso, há uma grande variação na resposta entre as espécies e até mesmo entre laboratórios, podendo existir uma diversidade de canais.

Os resultados deste trabalho detectaram a influência dos bloqueadores de canais de cálcio, verapamil, nifedipina e diltiazem, considerados do tipo-*L*, sobre os espermatozóides de hamsters, sem a preocupação da identificação do tipo de canal envolvido. Embora tenha um maior número de pesquisadores que acreditaram no tipo-*T* estar envolvido na reação acrossomal, os argumentos dos que relataram a existência e a participação do tipo-*L* também foram concretos.

A discussão dos resultados obtidos será exposta dentro de cada experimento realizado:

- (I) Tratamento *in vitro* dos espermatozóides com bloqueadores de canais de cálcio;
- (II) Tratamento *in vivo* de hamsters machos com bloqueadores de canais de cálcio; e
- (III) Dosagem de cálcio intracelular em espermatozóides.

Como discussão geral, também será realizada uma interação entre os resultados encontrados nos três experimentos.

5.1 EXPERIMENTO I - TRATAMENTO *IN VITRO* DOS ESPERMATOZÓIDES COM BLOQUEADORES DE CANAIS DE CÁLCIO

5.1.1 Capacitação espermática *in vitro* na presença de bloqueadores de canais de cálcio

Neste experimento, os espermatozóides foram colhidos e, posteriormente, submetidos a três concentrações (10 μ M, 100 μ M e 1mM) de bloqueadores de canais de cálcio (verapamil, nifedipina e diltiazem) em cultivo para o teste de capacitação *in vitro* nos momentos da colheita, uma, duas, três e quatro horas de incubação.

Os resultados de coloração da clortetraciclina para início (B) e final de capacitação (S) e acrossomo reagido (AR) dos espermatozóides do grupo controle ao longo do tempo foram superiores estatisticamente em relação aos grupos tratados com os antagonistas de cálcio. Isto indica que houve o bloqueio de canais de cálcio presentes na membrana espermática para a entrada do cálcio extracelular presente no meio de capacitação *in vitro*, inibindo os processos

de capacitação e de reação acrossomal, concordando com Darszon et al. (1999) que relataram a importância do cálcio intracelular nestes processos.

Segundo os pesquisadores Alberts et al. (1992), Arnoult et al. (1996), Baldi et al. (1996), Darszon et al. (1999), De Blas et al. (2002), Flesh e Gardella (2000), Florman et al. (1992), Fraser e McIntyre (1989), Martinez e Morros (1996), O'Toole et al. (2000), Shirakawa e Miyazaki (1999) e Yanagimachi (1994), o influxo do cálcio extracelular é muito importante no final da capacitação e reação acrossomal. Os canais de cálcio voltagem-dependentes estão envolvidos na entrada de cálcio na célula espermática, e conseqüentemente, no processo de reação acrossomal (ARNOULT et al., 1996; BABCOCK; PFIFFER, 1987; BALDI et al., 1996; BENOFF, 1998; COX; PETERSON, 1989; DARSON; LIÉVANO; BELTRÁN, 1996; DARSZON et al., 1999; FLESH; GARDELLA, 2000; FLORMAN et al., 1992; KIRKMAN-BROWN; BARRATT; PUBLICOVER, 2003; O'TOOLE et al., 2000; SHIRAKAWA; MIYAZAKI, 1999; SON; LEE; HAN, 2000), pois o estoque intracelular (acrossomo) deste íon é insuficiente para todo este processo, esgotando-se rapidamente durante o início da capacitação (DRAGILEVA; RUBINSTEIN; BREITBART, 1999).

Na literatura não está determinada uma concentração mínima e máxima dos fármacos utilizados em experimentos com espermatozóides. O delineamento experimental foi realizado com pequenas, médias e altas concentrações, baseadas em diversos trabalhos. Em testes *in vitro*, foram determinados os tipos de canais de cálcio voltagem-dependentes e suas concentrações mínimas necessárias para os efeitos apenas em musculatura lisa e cardíaca, como: a nifedipina a 30 μ M, o verapamil a 10 μ M e o diltiazem a 80 μ M atuam em canais do tipo-L. O verapamil em concentrações maiores pode atuar em outros sítios de canais de cálcio, como a 100 μ M age no tipo-T (JANIS; SILVER; TRIGGLE, 1987; TRIGGLE, 1981).

Notou-se uma interferência dose-dependente do bloqueador, pois quanto maior a concentração utilizada, menor foi a taxa de capacitação espermática, principalmente a 1mM

no grupo verapamil, seguido pelo diltiazem e pela nifedipina. Okamura et al. (1992), com os mesmos bloqueadores nas mesmas concentrações, observaram forte bloqueio do influxo de cálcio pela membrana plasmática de espermatozóides de suínos. Furukawa et al. (1999) observaram que dependendo da concentração utilizada, os antagonistas de cálcio podem bloquear outros tipos de canais de cálcio, embora os bloqueadores nifedipina, verapamil e diltiazem sejam considerados canais tipo-*L* seletivos. Ainda, sabe-se que estes fármacos podem alterar a fluidez da membrana plasmática no espermatozóide (ANAND, KANWAR; SANYAL, 1994; BENOFF et al., 1994).

Já, em concentrações menores dos antagonistas (10 μ M ou 100 μ M), de forma dose-dependente, alguns espermatozóides conseguiram iniciar a capacitação (coloração B) e outros até finalizá-la (S), porém em menor velocidade em relação ao controle; no entanto, poucos concluíram a reação acrossomal (AR). Este fato pode ser explicado por Baldi et al. (1996), Flesh e Gardella (2000), Fraser, Abeydeera e Niwa (1995), Fraser e McIntyre (1989) e Yanagimachi (1994) que relataram uma duvidosa participação dos canais de cálcio voltagem-dependentes durante a capacitação, mas essencial para o rápido influxo de cálcio durante a reação acrossomal, evento dependente de elevadas concentrações (milimolares) de cálcio intracelular. Ainda, o início da capacitação é dependente apenas de mínimas concentrações (micromolares) de cálcio interno vindas do pequeno estoque intracelular deste íon (DRAGILEVA; RUBINSTEIN; BREITBART, 1999; FLESH; GARDELLA, 2000; PARRISH; SUSKO-PARRISH; GRAHAM, 1999), o qual é repostado através de canais de cálcio receptor-operados (BREITBART, 2003; WASSARMAN; JOVILE; LITSCHER, 2001).

O bloqueio da capacitação e da reação acrossomal ocorreu desde a menor concentração de nifedipina (10 μ M) em hamsters, concordando com Kirkman-Brown, Barratt

e Publicover (2003) em espermatozóides de humanos; porém, Son, Lee e Han (2000) obtiveram êxito somente a partir de 60 μ M em humanos.

O bloqueio da capacitação *in vitro* do antagonista nifedipina foi menor em relação ao diltiazem e o verapamil, concordando com Janis, Silver e Triggle (1987) quando relataram ser a nifedipina mais específica para os canais de cálcio que o verapamil e o diltiazem, e com Furukawa et al. (1999) que observaram 70% de seletividade da nifedipina a 10 μ M aos canais do tipo-*L*. No entanto, o verapamil pode atuar também em outros sítios de canais de cálcio quando excede 10 μ M, onde a 100 μ M age no tipo-*T* (JANIS; SILVER; TRIGGLE, 1987), como observado por O'Toole et al. (2000), que o verapamil a 50 μ M agia em canais do tipo-*T* e, possivelmente, em outros.

Esta influência negativa dos bloqueadores de canais de íon cálcio nas taxas de capacitação espermática e de reação acrossomal *in vitro* também foi relatada por vários pesquisadores: Arnoult et al. (1996), Arnoult et al. (1999), Babcock e Pfeiffer (1987), Darson, Liévano e Beltrán (1996), Darszon et al. (1999), Florman et al. (1992), Florman (1994), Fraser, Abeydeera e Niwa (1995), Fraser e McIntyre (1989), Kirkman-Brown, Barratt e Publicover (2003), O'Toole et al. (2000), Shirakawa e Miyazaki (1999) e Son, Lee e Han (2000).

5.1.2 Capacitação espermática *in vitro* na presença de bloqueadores de canais de cálcio e fertilização *in vitro*

A capacitação *in vitro* dos espermatozóides de hamsters na presença dos bloqueadores de canais de cálcio verapamil, nifedipina e diltiazem a 10 μ M, 100 μ M e 1mM interferiram na motilidade e hiperatividade espermáticas, bem como no teste de fecundação *in vitro*. Isto foi devido à presença de canais de cálcio na membrana plasmática dos espermatozóides sensíveis a estes fármacos, não ocorrendo completamente a capacitação e, posteriormente, bloqueando a reação acrossomal (ARNOULT et al., 1996; BABCOCK; PFIFFER, 1987; BALDI et al., 1996; BENOFF, 1998; COX; PETERSON, 1989; DARSON; LIÉVANO; BELTRÁN, 1996; DARSZON et al., 1999; FLESH; GARDELLA, 2000; FLORMAN et al., 1992; KIRKMAN-BROWN; BARRATT; PUBLICOVER, 2003; O'TOOLE et al., 2000; SHIRAKAWA; MIYAZAKI, 1999; SON; LEE; HAN, 2000), pois não adquiriram competência funcional para a fecundação (ALBERTS et al., 2002; YANAGIMACHI, 1994).

Observou-se neste experimento que a motilidade e a hiperatividade espermáticas foram afetadas pelos bloqueadores de canais de cálcio após três horas de capacitação *in vitro*, ocorrendo de forma dose-dependente. Segundo Darson et al. (1999) e Suarez e Ho, 2003, o cálcio intracelular constituía-se no principal elemento regulador na motilidade flagelar e na hiperatividade espermática. A membrana plasmática apresenta canais de cálcio (voltagem-dependentes e/ou *CatSper*) que participam da hiperativação (SUAREZ; HO, 2003). Ashizawa, Hashiguchi e Tsuzuki (1992) demonstraram a importância da concentração de cálcio intracelular na motilidade e na respiração de espermatozóides de aves.

Outros pesquisadores também encontraram diminuição da motilidade espermática no tratamento *in vitro* com bloqueadores de canais de cálcio em humanos, como Anand, Kanwar

e Sanyal (1994), Fakih et al. (1986) e Hong et al. (1985), e da hiperatividade em hamsters no trabalho de Stauss, Votta e Suarez (1995).

Observou-se no presente trabalho que espermatozóides de hamsters expostos a 100 μ M de verapamil, apresentaram 56,7% de hiperatividade e a 1mM, estes ficaram imóveis. Já Fakih et al. (1986) observaram uma imobilidade irreversível com 20 - 40 μ M deste antagonista em espermatozóides de humanos.

Os efeitos dos bloqueadores de canais de íons cálcio nas características de motilidade, hiperatividade e capacitação espermáticas refletiram na taxa de fertilização *in vitro*. O bloqueio mostrou-se novamente dependente da concentração do antagonista e, os fármacos verapamil e diltiazem apresentaram menores taxas de fecundação, possivelmente por agirem em outros tipos de canais de cálcio (FURUKAWA et al.; 1999; JANIS, SILVER; TRIGGLE, 1987; O'TOOLE et al., 2000).

Tanto a capacitação, especialmente o seu final, quanto a fecundação *in vitro* foram influenciadas pelos bloqueadores de cálcio, porém, Arnoult et al. (1999) relataram que estes fármacos inibem a fertilização com alta eficácia apenas após a capacitação espermática.

A taxa de fecundação *in vitro* dos espermatozóides de hamsters capacitados por três horas com 100 μ M de verapamil foi de 10,4%. Já Stauss, Votta e Suarez (1995), utilizando a mesma espécie e concentração, mas com incubação por 30 min, não obtiveram a penetração em nenhum oócito; também, Fraser e McIntyre (1989) observaram que em espermatozóides de camundongos tratados por 120min com 50 μ M de verapamil não houve a fusão oócito-espermatozóide na zona pelúcida pela ausência da reação acrossomal e, em concentrações menores notaram uma redução da habilidade de fertilizar oócitos *in vitro*.

Os resultados obtidos no Experimento I de capacitação, motilidade e hiperatividade espermáticas e taxa de fecundação *in vitro* são justificados pela literatura. Segundo Alberts et al. (2002), Breitbart (2003) e Darson et al. (1999), para ocorrer a fertilização o

espermatozóide deve ter sofrido capacitação, envolvendo alterações na composição da membrana plasmática, elevação da motilidade e, ainda, aumento de cálcio intracelular para ocorrer sinalização da via ZP_3 , levando à reação acrossomal. Na presença de bloqueadores de canais de cálcio, o contato do espermatozóide com a ZP_3 gera uma despolarização fraca (FLORMAN et al., 1998) e, ainda, estes fármacos podem alterar a fluidez da membrana espermática (ANAND; KANWAR; SANYAL, 1994; BENOFF et al., 1994), influenciando negativamente em todos estes processos ocorridos desde a capacitação espermática até a penetração do espermatozóide no oócito.

5.2 EXPERIMENTO II - TRATAMENTO *IN VIVO* DE HAMSTERS MACHOS COM BLOQUEADORES DE CANAIS DE CÁLCIO

Neste experimento, testou-se a fertilidade de machos hamsters submetidos à terapia com bloqueadores de canais de cálcio via oral durante 60 dias. Os grupos verapamil e nifedipina apresentaram menor fertilidade que os grupos controle e diltiazem; quanto ao número de filhotes por ninhada não houve diferenças significativas entre os grupos. A motilidade, a hiperatividade, a capacitação e a reação acrossomal *in vitro* dos grupos que receberam a terapia anti-hipertensiva foram inferiores em relação ao controle, refletindo negativamente também na fertilidade *in vitro*.

Não foram encontrados na literatura trabalhos que relatassem a fertilidade *in vivo* de animais ou humanos com o uso contínuo de antagonistas de cálcio para o controle de hipertensão arterial. Somente Benoff et al. (1994) e Katsoff e Check (1997) observaram uma subfertilidade temporária em homens com esta terapia, submetidos a programas de FIV e,

Hershlag, Cooper e Benoff (1995) conseguiram a reversão desta infertilidade após três meses da retirada do medicamento, com o sucesso na FIV e nascimento de uma criança sadia.

Os resultados de motilidade e fertilidade *in vitro* dos espermatozóides de hamsters concordaram com os de Juneja et al. (1990a) que administraram verapamil por 4 ou 12 semanas em porquinhos-da-índia e obtiveram um efeito de antifertilidade dose e tempo dependentes.

Poucos espermatozóides de hamsters submetidos à terapia de antagonistas de canais de cálcio conseguiram atingir o final de capacitação e, conseqüentemente, a reação acrossomal. Os trabalhos de Benoff et al. (1994), Juneja et al. (1990a) e Katsoff e Check (1997) relataram que bloqueadores de canais de cálcio alteraram a capacidade dos espermatozóides em realizar a reação acrossomal. Por outro lado, também pode ter ocorrido alterações na estrutura lipofílica da membrana espermática com o tratamento, alterando sua fluidez e afetando o processo fisiológico (BENOFF et al., 1994; JUNEJA et al., 1990b).

Como o cálcio está envolvido em atividade secretória de glândulas, alguns pesquisadores (BARBARINO; MARINIS, 1980; FLECKENSTEIN, 1977; JANIS; SILVER; TRIGGLE, 1987; LIN, 1985) descreveram uma possível influência negativa dos bloqueadores de canais de cálcio quanto à atividade do hipotálamo e da hipófise na atividade hormonal reprodutiva; porém, outros autores (SEMPLE et al., 1984; STRUTHERS et al., 1983; VELDHUIS et al., 1985) não encontraram alterações. Embora não tenha sido objetivo deste trabalho mensurar testosterona sérica ou outros hormônios nos hamsters machos, não foi notada nenhuma alteração nos animais submetidos à terapia oral com bloqueadores de canais de cálcio quanto à libido e à produção espermática.

5.3 EXPERIMENTO III - DOSAGEM DE CÁLCIO INTRACELULAR EM ESPERMATOZÓIDES

O cálcio intracelular em espermatozóides de hamsters foi mensurado após 280 segundos da adição de 50 μ M do bloqueador de cálcio. Após 100 segundos do acréscimo do cálcio extracelular, as diferenças do íon cálcio, livre no citosol, entre o grupo controle e os tratados foram de: 3,17 μ M no grupo do verapamil, 0,92 μ M da nifedipina e 2,11 μ M do diltiazem, refletindo novamente a maior sensibilidade da nifedipina aos canais de cálcio voltagem-sensíveis, em comparação a do verapamil e do diltiazem, dependendo da concentração utilizada do fármaco, concordando com os relatos de Furukawa et al. (1999), Gilman et al. (1991), Janis, Silver, Triggle (1987), Okamura et al. (1992) e Triggle (1981).

Como ainda não está estabelecida uma concentração de bloqueadores de canais de cálcio para espermatozóides em tratamentos *in vitro*, escolheu-se a quantidade de 50 μ M no Experimento III pelo fato da taxa de capacitação e fecundação *in vitro* de espermatozóides tratados *in vivo* (Experimento II) serem próximas às obtidas com os tratamentos *in vitro* a 10 μ M e a 100 μ M dos antagonistas (Experimento I).

Quando foi adicionado o cálcio extracelular, os espermatozóides tratados com os bloqueadores de canais de cálcio apresentaram mínimo influxo de cálcio. O bloqueio da entrada do cálcio para o citosol na presença destes fármacos também foi observado por Arnoult et al. (1996), Florman et al. (1992), Okamura et al. (1992) e Shirakawa e Miyazaki (1999). Em contradição aos resultados obtidos por outra metodologia, Juneja et al. (1990b) não notaram a inibição da elevação de cálcio em preparações de membrana plasmática isoladas de espermatozóides de porquinhos-da-índia tratados *in vivo* com verapamil, descartando o envolvimento de canais de cálcio e, relatando a possibilidade de alterações

lipofílicas da membrana com a terapia e, conseqüentemente, aumento da permeabilidade do íon cálcio.

Ao se comparar os gráficos apresentados (Figuras 09, 10 11), notou-se que as concentrações de cálcio intracelular no grupo controle ocorreram de modo crescente ao longo do tempo, mostrando a entrada gradativa do cálcio extracelular; no grupo da nifedipina, houve esta elevação, porém em menor intensidade e, nos grupos verapamil e diltiazem esta entrada de cálcio foi praticamente bloqueada, pois se pode observar concentrações de cálcio constantes ao longo do tempo. Este fato indica que a ação da nifedipina foi nos canais de cálcio voltagem-dependentes, portanto, sensíveis às diidropiridinas, enquanto que o verapamil e o diltiazem bloquearam os canais de cálcio voltagem-dependentes e, possivelmente, outros tipos de canais responsáveis pelo influxo de cálcio no espermatozóide.

Em resumo, os resultados ocorridos nos Experimentos I, II e III foram complementares. As menores concentrações de íon cálcio intracelular nos espermatozóides expostos aos bloqueadores de canais de cálcio explicam a redução das taxas de motilidade, de hiperatividade, de capacitação espermática, de reação acrossomal e, conseqüentemente, de fecundação *in vitro*. Segundo Alberts et al. (2002), Darszon et al. (1999) e Yanagimachi (1994), o cálcio intracelular no espermatozóide tem um papel fundamental nos processos de capacitação, hiperatividade e reação acrossomal para a fertilização. Da mesma forma, os trabalhos de Arnoult et al. (1996), Arnoult, Zeng e Florman (1996), Florman (1994), Florman et al. (1998) e Wassarman, Jovile e Litscher (2001) mostraram a diferença da concentração do cálcio intracelular em espermatozóide não capacitados e com o acrossomo reagido após estímulo da ZP₃ variou de 250 a 450nM.

Ainda, como suporte para os efeitos dos bloqueadores de canais de cálcio encontrados nos experimentos I, II e III, Janis, Silver e Triggle (1987) relataram que os antagonistas de canais de cálcio somente atuam em uma célula nas seguintes condições: quando a resposta

fisiológica depende do cálcio extracelular, se há canais de cálcio voltagem-dependentes na membrana plasmática, tipo e tempo de despolarização, fatores farmacocinéticos, entre outros.

Segundo Yanagimachi (1994), embora os eventos de capacitação espermática e de reação acrossomal ocorram no trato feminino, sistemas laboratoriais (*in vitro*) são capazes de prever e avaliar mais detalhadamente os requerimentos específicos para o desenvolvimento da habilidade de fecundação. Os resultados de capacitação e fecundação *in vitro* obtidos no Experimento I (*in vitro*) e II (*in vivo*) foram compatíveis e, o Experimento III deu suporte aos efeitos encontrados dos bloqueadores. Somente no Experimento II, as taxas de prenhez (*in vivo*) e de fecundação *in vitro*, dos machos que receberam os antagonistas de cálcio, diferiram entre si, mostrando que os espermatozoides apresentaram desempenhos superiores na fertilidade dentro do sistema biológico (fêmea). Provavelmente, estes encontraram melhores condições para a capacitação e a reação acrossomal, sendo mais susceptíveis no sistema *in vitro* de avaliação.

6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados observados nos experimentos, tendo em vista a metodologia e análise empregadas, pode-se concluir que:

- 1) Nos tratamentos *in vitro*, os bloqueadores de canais de cálcio voltagem-dependentes atuaram negativamente na motilidade e hiperatividade espermáticas e, na taxa de capacitação, de reação acrossomal e de fecundação.
- 2) Houve influência das concentrações utilizadas de verapamil, nifedipina e diltiazem nos parâmetros estudados no tratamento *in vitro*.
- 3) A terapia oral com bloqueadores de canais de cálcio voltagem-dependentes reduziu a fertilidade de machos hamsters.
- 4) Os espermatozóides apresentaram desempenhos superiores na fertilidade dentro do sistema biológico (fêmea), provavelmente encontrando melhores condições para a sua capacitação e reação acrossomal, sendo mais susceptíveis ao sistema *in vitro* de avaliação.
- 5) Os antagonistas de canais de cálcio voltagem-dependentes inibiram a passagem do íon cálcio do meio extracelular para o intracelular, mostrando sua influência e possível bloqueio nos eventos biológicos dependentes de cálcio nos espermatozóides.

- 6) O influxo de íon cálcio bloqueado pelos antagonistas de canais de cálcio voltagem-dependentes explicou as taxas de capacitação, reação acrossomal e de fecundação encontradas nos experimentos.
- 7) Os experimentos não puderam apontar em qual tipo de canal de cálcio voltagem-dependente os fármacos atuaram, porém foi notado que o verapamil e o diltiazem foram mais severos no bloqueio do influxo de cálcio e nos testes de habilidade de fecundação.
- 8) A membrana plasmática de espermatozóides de hamsters possui canais de cálcio voltagem-dependentes sensíveis a verapamil, nifedipina e diltiazem.
- 9) O sistema biológico e a metodologia utilizada foram considerados satisfatórios para indicar que os bloqueadores de canais de cálcio voltagem-dependentes comprometem a fertilidade masculina.

CAPÍTULO II

EFEITO DE BLOQUEADORES DE CANAIS DE ÍONS CÁLCIO VOLTAGEM-DEPENDENTES DO TIPO-*L* SOBRE A FERTILIDADE *IN VIVO* E *IN VITRO* DE OÓCITOS DE HAMSTERS

RESUMO

Efeito de bloqueadores de canais de íons cálcio voltagem-dependentes do tipo-*L* sobre a fertilidade *in vivo* e *in vitro* de oócitos de hamsters

[Effects of type-*L* voltage-dependent calcium ion channel blockers on hamster oocytes in *in vivo* and *in vitro* fertilization].

O processo de fertilização está intimamente relacionado ao íon cálcio. Não há relatos na literatura sobre a influência da terapia anti-hipertensiva com bloqueadores de canais de íons cálcio voltagem-dependentes do tipo-*L* sobre a fertilidade feminina. Este experimento teve como objetivo verificar a influência dos bloqueadores de canais de íons cálcio, verapamil, nifedipina e diltiazem, sobre a fertilidade *in vivo* e *in vitro* de oócitos de hamsters. Fêmeas hamsters foram utilizadas em testes *in vivo* e superovuladas para as avaliações *in vitro*. No Experimento I, oócitos de hamsters foram incubados por 30 min com verapamil (10µM, 100µM, 2mM ou 4mM), nifedipina (10µM, 100µM, 500µM ou 1mM), diltiazem (10µM, 100µM, 2mM ou 4mM), ou com meio livre de fármacos (grupo controle) e, em seguida, fecundados com espermatozóides livres dos fármacos. A fecundação e o comportamento dos grânulos corticais foram avaliados após 6 horas pela coloração com Hoechst 33342 e isotiocianato de fluoresceína (*Lens cullinaris*). No Experimento II, a administração dos fármacos às fêmeas foi realizada duas vezes ao dia por 30 dias pelas vias oral (vo) ou intraperitoneal (ip), com verapamil (vo: 40mg/kg/d e ip: 5mg/kg/d), nifedipina (vo: 50mg/kg/d e ip: 10mg/kg/d) ou diltiazem (vo: 40mg/kg/d e ip: 10mg/kg/d) e posteriormente, analisadas quanto à fertilidade *in vivo*, fecundação *in vitro*, exocitose dos grânulos corticais e ultraestrutura dos oócitos fertilizados *in vitro*. No Experimento III, a concentração intracelular de cálcio foi mensurada em oócitos na presença de 50µM dos bloqueadores de canais de íons

cálcio. Como resultados, no Experimento I os fármacos atuaram de forma dose-dependente, os oócitos tratados mostraram menor taxa de fertilização *in vitro* em relação ao controle e, nos grupos verapamil e diltiazem, ocorreu exocitose parcial dos grânulos corticais e ativação não completa dos oócitos. No Experimento II ficou demonstrado que a fecundação *in vivo* das fêmeas tratadas não variou entre os grupos, porém, a taxa de fertilização *in vitro* dos oócitos de fêmeas tratadas *in vivo* com os antagonistas foi menor em relação ao controle. Tanto a exocitose dos grânulos corticais, quanto a análise ultraestrutural, não revelaram diferenças entre os grupos. As ninhadas de fêmeas que receberam a terapia no início da gestação apresentaram menor peso ao nascimento e maior taxa de mortalidade. No Experimento III, notou-se que os fármacos causaram um bloqueio do influxo de cálcio extracelular nos oócitos. Concluiu-se que os oócitos possuem, em sua membrana plasmática, canais de íons cálcio sensíveis aos bloqueadores de canais de cálcio voltagem-dependentes do tipo-*L*. Nos tratamentos *in vitro*, estes fármacos atuaram negativamente na capacidade de fecundação dos oócitos e, no caso do verapamil e diltiazem, não ocorreu a ativação completa no oócito fertilizado. A terapia com os bloqueadores de canais de cálcio não reduziu a fertilidade das fêmeas hamsters, mas sua administração no início da gestação causou efeitos teratogênicos.

Palavras-chave: Hamsters. Oócitos. Grânulos corticais. Cálcio. Bloqueadores de canais de íons cálcio. Fertilidade.

1 INTRODUÇÃO

O início da fecundação é um processo controlado rigorosamente dependente da integridade nuclear e estrutural do oócito maturado e da penetração pelo espermatozóide. A fertilização induz uma série de oscilações (ondas) intracelulares de cálcio que promovem alterações citoplasmáticas e nucleares do oócito, essenciais para o início da embriogênese. Dentre as principais funções destas elevações periódicas do íon cálcio estão a exocitose dos grânulos corticais, a ativação oocitária e a liberação do segundo corpúsculo polar, assim, completando a segunda divisão meiótica, e realizando a singamia e a preparação para a primeira clivagem embrionária.

Estas ondas de cálcio no oócito são originadas dos estoques intracelulares, localizados no retículo endoplasmático. No momento da penetração pelo espermatozóide, uma cascata de eventos se desencadeia, culminando com a formação do inositol trifosfato (IP_3) que induzirá a liberação de cálcio.

Os bloqueadores de canais de cálcio voltagem-dependentes são medicamentos indicados para o controle da hipertensão arterial, inclusive utilizados por mulheres em idade reprodutiva.

Dada a expressiva importância do íon cálcio no processo de fecundação e a escassa literatura sobre os efeitos desta terapia anti-hipertensiva na fertilidade feminina, seria interessante estudar as possíveis conseqüências nos oócitos expostos aos bloqueadores de canais de íons cálcio voltagem-dependentes com relação à exocitose dos grânulos corticais, ao bloqueio à polispermia, à formação dos pronúcleos, à liberação do segundo corpúsculo polar e ao término da segunda divisão meiótica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 EVENTOS NO OÓCITO E A FUNÇÃO DO ÍON CÁLCIO

Em várias espécies de mamíferos, a penetração do espermatozóide durante a fertilização produz um transitório e periódico aumento de cálcio no oócito, que se propaga por várias horas após este estímulo inicial. O significado biológico destas oscilações nas concentrações de cálcio não é bem conhecido, mas se sabe que os íons cálcio estão envolvidos na exocitose dos grânulos corticais para o bloqueio da polispermia e controlam a progressão do ciclo celular (CRAN; ESPER, 1990; KLINE; KLINE, 1990; MIYAZAKI, 1990).

Esta súbita elevação de cálcio intracelular, causada pelo espermatozóide, desencadeia ondas de cálcio que são responsáveis pelo início da clivagem do embrião (ALBERTS et al., 2002). A frequência da oscilação do cálcio é influenciada pela resposta celular. Quando começa um pequeno pico localizado, as próximas ondas ocorrem por um processo conhecido como liberação de cálcio-induzida por cálcio. Esta liberação depende da combinação positiva ou negativa da retroalimentação dada pelo íon nas vias de canais de cálcio operados por inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) e rianodina no retículo endoplasmático (BOOTMAN et al., 2001; MIYAZAKI et al., 1993). A variação da concentração de cálcio intracelular induz o aumento de forma periódica (ondas) após a fertilização em oócitos de mamíferos como camundongos, hamsters e coelhos (SHIINA et al., 1993).

No início da fertilização, ocorrem hiperpolarizações na membrana plasmática do oócito e uma série de oscilações de cálcio por algumas horas até a formação do pronúcleo. No

embrião de hamsters, os pronúcleos são formados de 5 a 6 horas após a ativação oocitária dada pelo espermatozóide. As oscilações de cálcio continuam durante a primeira clivagem e são muito importantes para garantir o desenvolvimento embrionário normal (BOS-MIKICH; WHITTINGHAM; JONES, 1997). Uma vez iniciado o desenvolvimento após a fertilização, o embrião se divide rapidamente e, cada mitose parece estar associada com um aumento de cálcio intracelular (BERRIDGE, 1993).

Para o mecanismo de liberação do cálcio no oócito, acredita-se que a ligação do espermatozóide à membrana plasmática do oócito ative os receptores de proteínas G (sítios de ligação do GTP), os quais promovem ativação da cascata de fosfoinosítídeos. A fosfolipase C (PLC) induzem a hidrólise do fosfatidil inositol 4,5-bifosfato ($PI4,5P_2$), formando dois mediadores intracelulares: o IP_3 , que se funde no citoplasma e libera picos de cálcio, e o diacilglicerol (DAG), que permanece na membrana plasmática e auxilia a ativação da enzima proteína quinase C (PKC) (ALBERTS et al., 2002; BOOTMAN et al., 2001; CIAPA; CHIRI, 2000; MIYAZAKI, 1990; MIYAZAKI et al., 1993; WASSARMAN; ALBERTINI, 1994; WHITE; YUE, 1996).

O IP_3 difunde-se no citoplasma rapidamente, reage na membrana do retículo endoplasmático e abre seus canais dependentes, liberando o cálcio estocado. Para cessar a liberação de cálcio, o IP_3 é desativado (defosforilado para IP_2 ou fosforilado para IP_4) e o cálcio que entrou no citosol é bombeado para o meio extracelular ou retorna para o retículo endoplasmático (ALBERTS et al., 2002; BOOTMAN et al., 2001; MIYAZAKI, 1990; MIYAZAKI et al., 1993; WASSARMAN; ALBERTINI, 1994; WHITE; YUE, 1996). Há, também, a participação dos receptores de rianodina do retículo endoplasmático que mantêm abertos os canais de cálcio (MIYAZAKI, 1990; WASSARMAN; ALBERTINI, 1994; WHITE; YUE, 1996).

Outra hipótese descrita afirma que as oscilações de cálcio intracelulares são desencadeadas pela liberação de um fator citosólico presente no espermatozóide, após a fusão com a membrana do oócito. Isto pode ser comprovado pela microinjeção de extrato de espermatozóide no citoplasma do oócito, o que provoca picos de cálcio semelhantes à fecundação e à ativação do oócito. A proteína isolada do extrato dos espermatozóides de hamsters, de humanos e de suínos foi denominada oscilina, proteína multimérica com subunidades de 33kDa, localizada no segmento equatorial da cabeça do espermatozóide. Este fator só está presente em espermatozóides maduros; portanto, a qualidade do sêmen interfere na ativação do oócito (WASSARMAN; ALBERTINI, 1994; WHITE; YUE, 1996).

Swann e Parrington (1999) relataram três teorias para a sinalização de cálcio intracelular no oócito durante a fertilização: (I) o espermatozóide atua como um canal de entrada de cálcio no momento da fusão de sua membrana com a do oócito; (II) o espermatozóide age sobre receptores da membrana plasmática do oócito para estimular a produção da PLC que gerará IP_3 ; e/ou (III) após a fusão das membranas, o espermatozóide causa a elevação de cálcio por introduzir um fator protéico solúvel (oscilina) dentro do oócito, tem atividade de fosfolipase C, levando, portanto, à produção de IP_3 .

A ativação da PKC pelo DAG pode também ter função direta no aumento da corrente de cálcio. A fosforilação de canais iônicos por PKC é um importante processo de controle, causando a oscilação de cálcio intracelular no oócito (BOOTMAN et al., 2001; JANIS; SILVER; TRIGGLE, 1987).

O IP_3 é um segundo mensageiro solúvel em água que controla muitos processos celulares, gerando sinais internos de cálcio, operado por receptores. Os canais intracelulares de cálcio exibem o processo regenerativo de liberação de cálcio-induzida por cálcio, responsável por um padrão espaço-temporal complexo de ondas e oscilações de cálcio intracelular. Deste modo, esta via de sinalização dinâmica de IP_3 e cálcio controlam os

eventos da fertilização. Quando um pequeno influxo de cálcio entra pelos canais de cálcio voltagem-dependentes, presentes na membrana plasmática, provoca uma grande liberação dos estoques internos de cálcio representados pelo retículo endoplasmático. No oócito de mamíferos, os receptores do retículo endoplasmático para a liberação do cálcio para o citosol são dependentes de IP_3 (BERRIDGE, 1993; MIYAZAKI et al., 1993).

O IP_3 tem a função principal na sinalização do cálcio, através de receptores para IP_3 na membrana do retículo endoplasmático, e leva a estímulos de liberação do cálcio estocado. Pesquisas sugerem que o IP_3 sozinho ou associado com outros componentes é produzido no oócito fertilizado para promover a sinalização do cálcio. Receptores de rianodina em alguns mamíferos (camundongos, bovinos e humanos) podem também estar presentes na membrana do retículo endoplasmático para a liberação de cálcio (CIAPA; CHIRI, 2000; KLINE, 2000).

Os efeitos do IP_3 podem ser mimetizados utilizando-se o cálcio ionóforo (A23187) ou a ionomicina, que permitem a entrada do cálcio extracelular (BOOTMAN et al., 2001; MIYAZAKI et al., 1993).

Sun et al. (1994) injetaram heparina (bloqueador de IP_3) em oócitos bovinos para averiguar o envolvimento do IP_3 nos receptores presentes no retículo endoplasmático para a liberação de cálcio e, conseqüentemente, ocorrer o bloqueio à polispermia. Não houve diferença significativa após a fertilização entre os picos de cálcio intracelular e a taxa de polispermia entre o grupo controle e tratado, concluindo que há, em oócitos bovinos, estoques de cálcio independentes de IP_3 que podem ser mobilizados para a exocitose dos grânulos corticais. Em trabalho contraditório, Miyazaki et al. (1992) utilizaram anticorpos monoclonais contra IP_3 em oócitos de hamsters e notaram que houve um bloqueio no aumento do cálcio intracelular induzido por IP_3 , sugerindo que o IP_3 é o único fator envolvido na liberação de cálcio dos estoques intracelulares, e sem a participação de receptores para rianodina nesta espécie.

Oócitos imaturos possuem estoques intracelulares de cálcio de tamanho similar aos maduros, porém, estes estoques são menos sensíveis ao IP_3 . O desenvolvimento dos receptores para a liberação de cálcio induzido por IP_3 é pré-requisito para que o oócito tenha habilidade de realizar uma fertilização normal (FUJIWARA et al., 1993; MEHLMANN; KLINE, 1994). A localização do retículo endoplasmático no córtex de oócitos maduros é importante para o influxo capacitativo e a geração das ondas de cálcio (CIAPA; CHIRI, 2000; KLINE, 2000).

Em geral, no momento da fertilização, a penetração do espermatozóide induz alterações na concentração de cálcio intracelular no oócito. Estas elevações iônicas são responsáveis pela exocitose dos grânulos corticais, endurecendo e modificando os receptores da zona pelúcida (reação cortical), levando ao bloqueio à polispermia, pela retomada da meiose pelo oócito e pelo término da segunda divisão meiótica com a extrusão do segundo corpúsculo polar para o espaço perivitelíneo (WASSARMAN; ALBERTINI, 1994; WHITE; YUE, 1996).

Estes aumentos transitórios de cálcio, induzidos pelo espermatozóide, persistem por várias horas. Em camundongo, o primeiro pico ocorre poucos minutos após a fusão do espermatozóide e, os picos secundários ocorrem a intervalos de cinco a vinte minutos; este processo dura em torno de três a seis horas. Esta sucessão de picos cessa no momento da formação dos pronúcleos e reaparecem novamente durante a primeira divisão mitótica. Em suínos, esta flutuação na concentração de cálcio intracelular dura até três horas após a fecundação, em hamsters, apenas 30 minutos, e em bovinos, o primeiro pico, que é o maior, dura quatro minutos e é seguido por picos menores que duram dois minutos cada. Tais elevações são mantidas pela liberação de cálcio dos estoques intracelulares e propagam-se no oócito em forma de onda. No primeiro pico, a onda se inicia no sítio da penetração do espermatozóide no oócito e migra, pelo citoplasma, para o pólo oposto; já nos demais ciclos, as ondas se iniciam no córtex do oócito no hemisfério oposto ao fuso da meiose (local que não

apresenta o retículo endoplasmático em rede), em seguida, propagando-se para todo o citoplasma. O aumento da concentração intracelular de cálcio é pulsátil e periódico, pois o cálcio em altas concentrações, por longos períodos de tempo, é citotóxico e prejudica a organização dos fusos, afetando a formação dos pronúcleos e, conseqüentemente, a clivagem. Os picos de cálcio livre são importantes tanto na ativação do oócito quanto no desenvolvimento embrionário normal (WASSARMAN; ALBERTINI, 1994; WHITE; YUE, 1996).

Na fertilização, o primeiro pico de cálcio intracelular causado pelo espermatozóide atravessa o citoplasma. As ondas são propagadas pela difusão do cálcio pelo citosol, como também do IP_3 . As funções destas repetidas oscilações não são inteiramente entendidas. Há suposições que as ondas de cálcio podem ser necessárias para completa inativação do fator promotor de metáfase (MPF) e dos fatores citostáticos, substâncias que mantêm o oócito em metáfase II *arrest* (KLINE, 2000). Segundo Yanagimachi (1994), o MPF deve ser desativado para que ocorra a formação dos pronúcleos.

Além disso, no oócito, o próprio cálcio controla sua liberação, pois o cálcio livre no citoplasma age em seus canais alterando sua conformação, tornando-os abertos e permitindo a saída de mais cálcio dos estoques internos. Por outro lado, este aumento do cálcio citosólico resulta em inativação dos receptores nos canais de cálcio, provocando a volta do cálcio para os estoques intracelulares, controlando assim seus picos de liberação. Dessa forma, o cálcio exerce uma auto-regulação tanto positiva quanto negativa sobre seus próprios canais (WASSARMAN; ALBERTINI, 1994; WHITE; YUE, 1996).

Miyazaki (1991), estudando as ondas de cálcio em oócitos de hamsters durante a fertilização, estabeleceu que o controle das oscilações está baseado na via IP_3 como desencadeador de liberação de cálcio. Este é um fornecimento contínuo, enquanto que os níveis basais de cálcio intracelular aumentam devido ao influxo de cálcio dado por receptores

induzidos por IP_3 . A liberação de cálcio-induzida por cálcio também é responsável pelo recarregamento de cálcio dos estoques intracelulares.

Quando há depleção dos estoques internos de cálcio, é ativado um influxo deste íon através da membrana plasmática, processo conhecido como “entrada de cálcio capacitativa”, sugerindo que o IP_3 e seus receptores estão envolvidos neste evento. Deste modo, os receptores para IP_3 na membrana do retículo endoplasmático e os canais de cálcio presentes na membrana plasmática são regulados fisiologicamente pelo próprio IP_3 (PUTNEY, 1997).

De forma geral, o processo de sinalização celular de cálcio envolve mudanças reguladas na concentração do cálcio intracelular e em outros compartimentos celulares. Quando a sinalização de cálcio na célula é estimulada, o íon cálcio entra no citoplasma de duas maneiras: pela liberação dos estoques intracelulares ou pela entrada do íon através da membrana plasmática; ambos os processos podem ocorrer simultaneamente ou sequencialmente. Em células não excitáveis, como o oócito, a depleção de estoques intracelulares pela ação do IP_3 , ou outro sinalizador liberador de cálcio, ativa uma via de indução (fator de influxo de cálcio), levando à abertura de canais de cálcio presentes na membrana plasmática, ocorrendo a entrada de cálcio capacitativa (PUTNEY et al., 2001).

As oscilações de cálcio em camundongos e hamsters também são dependentes de cálcio extracelular, pois, experimentos indicam que ocorre depleção dos estoques de cálcio intracelulares nas primeiras ondas pós-fertilização, induzindo a entrada de cálcio capacitativa (KLINE, 2000).

As células em descanso (quiescentes) geralmente contêm entre 50 a 200nM de cálcio intracelular, sendo 10.000 vezes menor que a concentração do meio extracelular (aproximadamente 2mM). Quando há o estímulo da fertilização, os níveis intracelulares podem ficar próximos de 1 a 2 μ M. Para que a concentração de cálcio retorne ao basal novamente, há sistemas sequestradores para o retículo endoplasmático e para o meio

extracelular, através da membrana plasmática e da zona pelúcida. A bomba ativa $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ parece ser um importante mecanismo de homeostase do cálcio intracelular em oócitos de mamíferos (PEPPERELL et al., 1999).

O retículo endoplasmático contém bombas de cálcio, proteínas estocadoras de cálcio intraluminal e canais de liberação de cálcio específicos. Seu sistema de membrana tem função principal de sinalização intracelular de estocagem e liberação de cálcio. Na fertilização, o espermatozóide provoca uma grande liberação de cálcio dos estoques intracelulares, o qual ativa o oócito e inicia o desenvolvimento. A habilidade do oócito para a completa elevação de cálcio depende de mudanças estruturais e bioquímicas durante a maturação oocitária. A localização dos estoques de cálcio também pode contribuir para as longas e duráveis oscilações de cálcio, que são características da fertilização em mamíferos. A ativação oocitária durante a fertilização é dependente da elevação de cálcio intracelular originado do retículo endoplasmático e, se inibida, o oócito não consegue se ativar (retomada da meiose II) por outra via (KLINE, 2000).

Durante a retomada da meiose II, a membrana plasmática de oócitos bovinos sofre uma progressiva despolarização e depleção dos canais de cálcio, sugerindo que a elevação do cálcio intracelular, induzido pelo espermatozóide durante a fertilização, é originado de estoques internos (TOSTI; BONI; CUOMO, 2000).

Quanto ao processo de maturação oocitária, o pico de LH na ovulação induz o aumento de cálcio intracelular no oócito, retomando a meiose I (TOSTI; BONI; CUOMO 2000). Durante a maturação de oócitos de murinos, há picos de cálcio repetidos induzidos por IP_3 , por no mínimo duas horas, levando a quebra da vesícula germinativa e a maturação citoplasmática (BERRIDGE, 1993).

Os canais de cálcio voltagem-dependentes do tipo-*L* estão envolvidos em diversos processos biológicos e foram encontrados em oócitos de invertebrados aquáticos e de mamíferos (TOSTI; BONI; CUOMO, 2000).

2.2 O ÍON CÁLCIO NA LIBERAÇÃO DE GRÂNULOS CORTICAIS E BLOQUEIO À POLISPERMIA

Na fertilização, a elevação do cálcio intracelular e suas oscilações são necessárias e muito importantes para a ativação do oócito, e uma das primeiras reações desencadeadas por este íon é a exocitose dos grânulos corticais (ABBOTT; DUCIBELLA, 2001; SUN, 2003; WESSEL et al., 2001).

A polispermia é a penetração de dois ou mais espermatozóides no oócito, o qual resultará em um desenvolvimento embrionário anormal. Os oócitos da maioria dos mamíferos desenvolvem mecanismos de bloqueio à polispermia durante seu crescimento e maturação. No momento da fertilização, a polispermia é prevenida pela modificação de duas estruturas primárias: a membrana plasmática e a zona pelúcida. A relativa importância da zona pelúcida e da membrana plasmática ao bloqueio da polispermia varia entre as espécies. Na maioria das espécies de mamíferos, acredita-se que a zona pelúcida é a principal estrutura para o bloqueio à polispermia (ABBOTT; DUCIBELLA, 2001; CHERR; DROBNIS; KATZ, 1988; DUCIBELLA, 1996; WANG; DAY; WU, 2003; WESSEL et al., 2001).

Caso ocorra a polispermia, são formados fusos extras ou multipolares, resultando na falha da segregação de cromossomos durante a divisão celular, geralmente, cessando o desenvolvimento embrionário. Há dois mecanismos de bloqueio no oócito para assegurar a

monospermia. O primeiro ocorre pela despolarização da membrana plasmática oocitária causada pela fusão do primeiro espermatozóide, prevenindo temporariamente a penetração de outros. O segundo bloqueio à polispermia, o mais importante em mamíferos, se dá pela extrusão dos grânulos corticais, constituindo-se de um evento permanente e causado por ondas de cálcio (ALBERTS et al., 2002).

Esta exocitose dos grânulos corticais, também chamada de reação cortical, é iniciada pela oscilação de cálcio durante a penetração do espermatozóide. A elevação da concentração do cálcio intracelular induz a fusão da membrana dos grânulos corticais com o ooplasma e o conteúdo dos grânulos corticais é liberado para o espaço perivitelíneo (ABBOTT; DUCIBELLA, 2001; MILLER et al., 1993; WANG; DAY; WU, 2003; WESSEL et al., 2001). Aproximadamente 70 a 80% dos grânulos corticais sofrem exocitose durante a fecundação (DUCIBELLA et al., 1993).

Evidências mostram que a reação cortical é provavelmente mediada pela ativação da cascata do inositol fosfato. A fusão espermatozóide-oócito, mediada pela proteína ligadora-GTP (proteína G), induz a formação dos segundos mensageiros, IP_3 e DAG. Estes, principalmente o IP_3 , são responsáveis pela indução da liberação de cálcio dos estoques intracelulares e, posteriormente, ativa a PKC, levando à exocitose dos grânulos corticais. A proteína calmodulina-dependente quinase II (CaMKII) parece atuar como sinalizador na transdução da sinalização do cálcio (NIXON; MCDOUGALL; JONES, 2000; SUN, 2003).

A elevação do cálcio ativa a CaMKII que tem como funções a inativação dos fatores citostáticos e do fator promotor de maturação (MPF) para a reativação oocitária (DUPONT, 1998, NIXON; MCDOUGALL; JONES 2000), e ainda há indícios na participação da indução da exocitose dos grânulos corticais, extrusão do segundo corpúsculo polar e formação dos pronúcleos (SUN, 2003).

Ducibella e LeFevre (1997) utilizaram inibidores de PKC para avaliar a função desta proteína quinase no comportamento dos grânulos corticais e retomada do ciclo celular. Observaram que, mesmo na presença dos antagonistas, houve a exocitose dos grânulos corticais e que a transição metáfase-anáfase foi apenas temporariamente inibida, concluindo que há outro efeito cálcio-dependente envolvido neste evento biológico.

A zona pelúcida é uma densa matrix glicoprotéica semitransparente (10-15 microns de espessura) envolvendo o oócito e que contém os sítios de ligação ZP₁, ZP₂ e ZP₃. Esta camada tem como principais funções: ligação e penetração do espermatozóide (reconhecimento espécie-específica), ativação da reação acrossomal, bloqueio à polispermia e proteção do desenvolvimento embrionário até o período pré-implantação (DUCIBELLA, 1996; WANG; DAY; WU, 2003; WESSEL et al., 2001). Os grânulos corticais extrusos no espaço vitelínico durante a fertilização, possuem enzimas que modificam a estrutura da zona pelúcida, endurecendo-a por quebra proteolítica da ZP₂ e hidrólise de grupos açúcares da ZP₃ (ALBERTS et al., 2002).

Esta modificação estrutural e química da zona pelúcida pelas enzimas contidas nos grânulos corticais é chamada de reação zonal. As enzimas presentes são: ovoperoxidase, proteases, enzima semelhante à tripsina, glicoconjugados, *N*-acetilglucosaminidase, lecitinas, ativador de plasminogênio e outras proteínas, como p75, 3E10 e proteína placentar ligadora de heparina. Estas enzimas atuam individual ou sinergicamente na zona pelúcida, alterando a sua habilidade em se ligar ao espermatozóide e induzir a reação acrossomal. Estas transformações na zona são permanentes, não havendo penetração de espermatozóides capacitados em oócitos já fecundados. Alguma falha neste mecanismo da reação cortical ou zonal resulta na ocorrência de polispermia (HOODBHOY; TALBOT, 1994; MILLER et al., 1993; WANG; DAY; WU, 2003; WESSEL et al., 2001).

A incidência da polispermia aumenta em casos como: oócitos imaturos, pois não tem boa habilidade em liberar os grânulos corticais; oócitos velhos, provavelmente pela menor atividade enzimática, redução de responsividade da zona pelúcida e/ou degeneração citoplasmática; anormalidades na conformação das camadas de matrix da zona; elevado número de espermatozóides capacitados no sítio de fertilização, não tendo tempo do oócito desencadear o sistema de bloqueio; e, condições no momento da fecundação, como os meios utilizados na fertilização *in vitro* (FIV) (temperatura, pH, suplementos protéicos e concentração de cálcio) (WANG; DAY; WU, 2003).

Em oócitos de ratos maturados *in vitro* e ativados artificialmente, quando estes apresentavam menores concentrações intracelulares de cálcio a liberação dos grânulos corticais ocorria de forma parcial (considerados oócitos não maturados completamente); já em concentrações internas mais altas de cálcio, os oócitos apresentavam reação cortical completa, retomada da meiose e ativação do ciclo celular (oócitos completamente maduros) (RAZ; BEN-YOSEF; SHALGI, 1998).

2.3 EFEITOS DOS BLOQUEADORES CANAIS DE CÁLCIO NO OÓCITO

Os trabalhos envolvendo os efeitos dos bloqueadores de canais de cálcio em oócitos e no seu processo de fecundação são escassos e baseados em experimentos *in vitro*. Esta revisão está de forma cronológica para mostrar a evolução das pesquisas.

Paleos e Powers (1981) estudaram a maturação oocitária em camundongo. Trataram os oócitos em um meio com duas diferentes concentrações de cálcio (1,71 e 10mM) e na presença ou não de verapamil (0,01, 0,05, 0,10, 0,15 e 0,20mM). Durante a maturação, este

antagonista de cálcio inibiu a formação do primeiro corpúsculo polar de forma dose-dependente, mas não influenciou a quebra da vesícula germinativa. No meio contendo alta concentração de cálcio, apresentou maior porcentagem de formação de corpúsculo polar. Concluíram que o cálcio extracelular não foi requerido para a quebra da vesícula germinativa, mas foi importante para completar a primeira divisão meiótica. No entanto, em 1982 estes mesmos autores relataram que havia necessidade de uma concentração mínima de cálcio citoplasmático para que ocorresse a quebra da vesícula germinativa (PALEOS; POWERS, 1982).

Kitai et al. (1985) realizaram uma perfusão em ovários de coelhos com verapamil (100 μ M) e LH (50UI) para estudar a taxa de ovulação e a maturação *in vitro*. O verapamil reduziu significativamente a taxa de ovulação e a de maturação (68,8 e 83,3%, respectivamente) em relação ao controle (95 e 100%, respectivamente), concluindo que houve uma inibição na contração da musculatura lisa ovariana durante a perfusão, porém esta não foi essencial para a ovulação, e que a dinâmica do cálcio influenciava no processo de ovulação e maturação oocitária.

Em um estudo para avaliar os efeitos da alteração no influxo de cálcio na fertilização e na clivagem embrionária em murinos, Blancato e Seyler (1990) incubaram espermatozóides e oócitos com um bloqueador de canal de cálcio (diltiazem a 10 e 30 μ M) e/ou com um antagonista de liberação de cálcio intracelular (TMB-8 a 3, 10 e 30 μ M). Observaram que houve uma menor taxa de fecundação e inibição da progressão do estágio de duas células para blastocisto, mas a motilidade espermática não foi afetada. Sugeriram, então, que o influxo de cálcio em ambos os sítios estudados são importantes para uma fertilização normal, diretamente relacionada ao desenvolvimento pré-implantação inicial.

Shiina et al. (1993) investigaram em oócitos de murinos as características da elevação do cálcio intracelular após a FIV e as relações deste aumento com a extrusão do segundo

corpúsculo polar. Observaram que o intervalo entre os picos de cálcio variou entre 470 ± 180 segundos e a sua frequência foi influenciada pela concentração de cálcio extracelular. Quando os oócitos foram expostos a $10 \mu\text{M}$ de verapamil ou a $30 \mu\text{M}$ de nifedipina, a oscilação periódica de cálcio foi completamente inibida, porém, na concentração de $10 \mu\text{M}$, a nifedipina bloqueava parcialmente os canais de cálcio. Portanto, concluíram que tanto os estoques internos de cálcio como o influxo de cálcio do meio extracelular foram requeridos para os picos de cálcio intracelular, responsáveis pela extrusão do segundo corpúsculo polar.

Lane e Bavister (1998) colheram oócitos de hamsters com 3, 6 ou 9 horas após a fecundação *in vivo* e colocaram em cultivo na presença ou não de verapamil ($50 \mu\text{M}$) ou nifedipina ($10 \mu\text{M}$). A concentração de cálcio intracelular nos embriões 3, 6 e 9 horas pós-fertilização foi determinada em $256,0 \text{ nM}$, $161,2 \text{ nM}$ e $134,1 \text{ nM}$, respectivamente, indicando a importância do cálcio logo após a fecundação. Os embriões de 3 horas pós-fertilização, que permaneceram por 6 horas em cultivo, a concentração de cálcio intracelular foi de $194,3 \text{ nM}$ no meio controle, $135,2 \text{ nM}$ no meio com verapamil e $122,6 \text{ nM}$ na presença de nifedipina ($p < 0,01$). O metabolismo (oxidação de lactato) foi maior na presença dos bloqueadores de cálcio, porém, a taxa de desenvolvimento para mórula/blastocisto não foi afetada em relação ao grupo controle. Desta forma, concluíram que a nifedipina e o verapamil afetaram a concentração de cálcio intracelular por bloquear os canais de cálcio voltagem-dependentes do tipo-L, porém, os efeitos foram amenizados por outros tipos de canais presentes na membrana. E ainda, é possível que esta menor dosagem de cálcio intracelular possa alterar o desenvolvimento embrionário inicial, pois os canais do tipo-L participam da homeostase de cálcio também no embrião.

Em oócitos de ouriço-do-mar, após a exocitose dos grânulos corticais, há a necessidade da recuperação da membrana plasmática, a qual é dependente do cálcio extracelular e envolve canais de cálcio voltagem-dependentes. Quando estes oócitos foram

expostos ao bloqueador ω -conotoxin para canais do tipo-*P*, houve a inibição da recuperação da membrana após a fertilização, o que não foi observado quando na presença de antagonistas de canais de cálcio tipo-*L* (nifedipina) (VOGEL et al., 1999).

Tosti, Boni e Cuomo (2000) incubaram oócitos de bovinos com verapamil (100 μ M) ou nifedipina (100 μ M), durante o período de maturação *in vitro*, para inibir a corrente de cálcio via canais do tipo-*L*. Os antagonistas bloquearam a corrente de cálcio de tipo-*L*, entretanto, apenas no caso do verapamil houve decréscimo na taxa de maturação, concluindo que canais do tipo-*L* não sensíveis a dihidropiridina têm função durante a maturação, ou que a membrana plasmática do oócito possui outros modos de entrada de cálcio durante a maturação oocitária, ou um influxo de cálcio pequeno causado pelo verapamil atuou negativamente na maturação. Ainda, relataram que os canais do tipo-*L* parecem ser importantes na retomada da meiose I, e que a atividade dos canais de cálcio da membrana plasmática se reduzem com a maturação, sendo o cálcio do estoque intracelular o mais importante para a fecundação e ativação oocitária em bovinos.

Ianchii et al. (2000) pesquisaram a maturação *in vitro* de oócitos murinos em meios contendo várias concentrações de verapamil, notaram que a retomada da primeira divisão meiótica e a extrusão do primeiro corpúsculo polar foram inibidas de forma dose-dependente pelo bloqueador. Houtsuliak, Berdyieva e Libert (2002), em experimento semelhante, avaliaram o efeito dos bloqueadores de canais de cálcio do tipo-*T* (mebifrabil, amiloride, NiCl₂) na retomada da meiose e maturação espontânea *in vitro*, havendo uma eficiente supressão na maturação oocitária, sugerindo a possibilidade do uso deste tipo de bloqueador de cálcio associado a novos contraceptivos intrauterinos.

2.4 EFEITOS TERATOGÊNICOS RELACIONADOS AOS BLOQUEADORES DE CANAIS DE CÁLCIO

Burghess e Vere (1989) trataram embriões de *Xenopus* por três dias com verapamil, nifedipina, nicardipina ou diltiazem, e notaram anormalidades no desenvolvimento principalmente no tamanho fetal, no sistema nervoso central (proencéfalo), no intestino e na mandíbula. Relataram ainda que os efeitos teratogênicos destes fármacos são mais brandos em mamíferos, e que alguns defeitos congênitos de desenvolvimento cerebral estão associados ao metabolismo de cálcio (ex. Síndrome de Willians). Estas drogas atravessam a placenta, sendo, portanto, um risco durante a organogênese (FARRAR; BLUMER, 1991).

Chihara et al. (1998) administraram, por via oral, verapamil (30-100mg/kg) ou diltiazem (40-100mg/kg) em ratas prenhez no período de 7 a 17 dias de gestação, sendo que, após o nascimento dos fetos, estes apresentaram menor peso corporal, crescimento retardado, mortalidade neonatal e malformações cardíacas.

A concentração de cálcio intracelular no osteoblasto estimulado pelo hormônio paratireóideo (PTH) foi reduzida na presença de bloqueadores de canais de cálcio do tipo-*L*, comprometendo a formação óssea e mostrando que este evento fisiológico é dependente de canais de cálcio voltagem-dependentes do tipo-*L* em ratos (LI et al., 2003).

Há relatos de malformação fetal em ratos, coelhos, macacos e humanos expostos a bloqueadores de canais de cálcio (diltiazem, felodipina, nicardipina, verapamil e nifedipina). Como há um grande número de mulheres em idade reprodutiva que utilizam os bloqueadores de canais de cálcio para o tratamento de hipertensão arterial, Magee et al. (1996) avaliaram o potencial de teratogenicidade de antagonistas de cálcio em 78 mulheres expostas ao fármaco no primeiro trimestre de gestação. Observaram que houve uma tendência menor do grupo

tratado (79%) ao nascimento de crianças vivas (89% no controle), que 3% apresentaram filhos com malformações, não sendo significativo e nem atribuído aos fármacos, que 28% tiveram parto prematuro (vs 9% do controle) e que o peso ao nascimento foi 334 gramas a menos que no grupo controle. Com isso, concluíram que embora possa haver riscos teratogênicos induzidos pela terapia com bloqueadores de canais de cálcio, estes também podem ser atribuídos a doenças maternas, sugerindo mais estudos. Entretanto, Koren et al. (1989) atribuíram aos antagonistas de cálcio às malformações fetais de 7,3% (4/55) mulheres expostas a estes fármacos no primeiro trimestre de gravidez.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos para a avaliação dos efeitos causados por bloqueadores de canais de cálcio sobre oócitos de hamsters foram desenvolvidos no Laboratório de Reprodução Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP - Câmpus de Jaboticabal - SP e no Laboratório de Fotoquímica e Fotobiologia do Departamento de Química - FFCLRP- USP - Câmpus de Ribeirão Preto-SP.

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados como modelo experimental, hamsters Golden (*Mesocricetus auratus*) machos e fêmeas, adultos, de 2 a 6 meses de idade, pertencentes ao biotério do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, Câmpus de Jaboticabal - SP. A alimentação dos animais foi *ad libidum* com ração comercial peletizada para roedores, suplementada com abóbora e semente de girassol.

3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os experimentos foram realizados em oócitos (tratamento *in vitro*) e em hamsters fêmeas (tratamento *in vivo*). Foram utilizados, como bloqueadores de canais de íon cálcio, os fármacos Verapamil, Nifedipina e Diltiazem. Os grupos experimentais foram avaliados pela comparação Controle x Tratado, dentro de cada experimento (*in vivo* e *in vitro*), compostos por:

Experimento	Bloqueadores de Canais de Cálcio
	Grupos
Tratamentos <i>In Vitro</i> (Oócitos)	Controle
	Verapamil
	Nifedipina
	Diltiazem
Tratamentos <i>In Vivo</i> (Hamsters fêmeas)	Controle
	Verapamil
	Nifedipina
	Diltiazem

3.3 COLHEITA DOS OÓCITOS

Para a aquisição de oócitos, hamsters fêmeas pesando entre 90 e 150g, foram superovuladas com uma injeção intraperitoneal de 60UI de gonadotrofina coriônica eqüina (eCG) (Folligon[®] 1000UI, Intervet, Boxmeer, Holanda) pela manhã do dia 1 e, 54 a 58 horas após, receberam uma injeção intraperitoneal de 60UI de gonadotrofina coriônica humana (hCG) (Profasi[®] 2000UI, Serono, Aubonne, Suíça). Após 16 horas da administração da hCG,

estas fêmeas foram sacrificadas por deslocamento cervical, tendo seu aparelho reprodutivo dissecado, os ovidutos isolados e as ampolas dilaceradas em placas de Petri de plástico (35mm) com duas agulhas 30x7 (22g), sob microscópio estereoscópio. Os complexos *cumulus*-oócitos (CCO) foram transferidos para placas de Petri de plástico contendo meio TL-HEPES-PVA. Em seguida, a matriz celular dos CCOs foi dissolvida em meio TL-HEPES-PVA contendo 2mg/mL de hialuronidase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, H-4272). Os oócitos, então desnudos, foram lavados por três vezes em meio TL-HEPES-PVA e transferidos para as microgotas de fecundação (BAVISTER, 1989).

3.4 PROCEDIMENTOS PARA A FECUNDAÇÃO *IN VITRO*

3.4.1 Colheita e capacitação dos espermatozóides

Para a obtenção de espermatozóides, hamsters machos foram sacrificados por deslocamento cervical, tendo seus epidídimos dissecados e removidos. A cauda do epidídimo foi isolada e imersa sob óleo mineral, em uma placa de Petri de plástico (35mm), e repetidamente puncionada com uma agulha 30x7 (22g) na sua porção distal. O conteúdo da cauda do epidídimo (CCE) foi colhido de acordo com a descrição de Bavister (1989). Foram transferidos 20µL do CCE para 2mL de meio TL-HEPES-PVA (ANEXO A) a 37°C e, após a verificação da viabilidade espermática (motilidade e vigor), 2µL de CCE foram transferidos para placas de Petri de plástico (35mm) contendo 2mL de meio TALP-PVA (ANEXO B) (aproximadamente 2×10^4 spz/mL) e 20 µL de solução de penicilamina, hipotaurina e

epinefrina (PHE) (ANEXO C), e cobertas com 2mL de óleo de mineral. As placas contendo a suspensão de espermatozóides foram incubadas em estufa úmida a 37°C com 5% de CO₂ em ar, onde o tempo de capacitação para a fertilização *in vitro* foi de três horas. A motilidade e a hiperatividade espermática foram avaliadas na própria placa por microscopia óptica com contraste de fase.

3.4.2 Fecundação *in vitro*

Os procedimentos para a fertilização *in vitro* foram realizados segundo Bavister (1989). Placas de Petri de plástico (35mm) contendo microgotas de 90µL de meio TALP-PVA e 2µL de PHE, sob óleo mineral, receberam 15 a 20 oócitos por gota, que foram inseminados com 1µL de suspensão de espermatozóides capacitados (item 3.4.1, aproximadamente 100 a 200 sptz/oócitos) e, em seguida, incubados a 37°C e 5% de CO₂ em ar, durante seis horas.

3.5 AVALIAÇÃO DA FERTILIZAÇÃO DOS OÓCITOS

Para averiguar se houve ou não a fecundação dos oócitos inseminados, estes foram avaliados após seis horas da fertilização *in vitro*. A zona pelúcida dos oócitos foi removida com pronase (Sigma-Aldrich, P-6141) a 0,5% em PBS (ANEXO D) e, em seguida, foram lavados por três vezes no meio TL-HEPES-PVA e corados por 15 minutos com Hoechst

33342 (10µg/mL) (Sigma-Aldrich, B-2261) diluído neste mesmo meio. Os oócitos foram colocados entre lâmina e lamínula, onde os pronúcleos masculino e feminino (oócitos fecundados) ou a metáfase (oócitos não fecundados) foram observados sob microscopia de epifluorescência (excitação 355nm, emissão 465nm) (Olympus BX 60, Japan).

3.6 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DOS GRÂNULOS CORTICAIS

Para a verificação do comportamento dos grânulos corticais, avaliou-se oócitos pré-fecundação (tratados com os bloqueadores de canais de cálcio) e oócitos após seis horas da fertilização *in vitro*. A zona pelúcida foi removida com pronase a 0,5% em PBS e, em seguida, os oócitos foram lavados com TL-HEPES-PVA e fixados por 30 minutos em paraformaldeído a 3% em PBS, em temperatura ambiente. Após a fixação, foram lavados por cinco vezes (3 min cada vez) em solução de bloqueio (PBS com 1mg/mL de BSA, 100mM de glicina e 0,2% de azida sódica) e tratados por 5 min com Triton X-100 a 0,5% nesta solução para a permeabilização, de acordo com o método descrito por Cherr et al. (1988). Os oócitos foram incubados em 10µg/mL de isotiocianato de fluoresceína (*Lens cullinaris*) específica para α -Manose (Sigma-Aldrich, L-9262). Após 15 minutos, os oócitos foram lavados em PBS, colocados entre lâmina e lamínula e examinados sob microscopia epifluorescente (filtro FITC: excitação 490nm e emissão 520nm). A avaliação da cromatina (fecundação ou não) com o corante Hoechst 33342 (item 3.5) foi realizada após a coloração de *Lens cullinaris* para a associação dos eventos.

O experimento avaliou os grânulos corticais de oócitos controle (sem tratamento) e de oócitos tratados *in vitro* com bloqueadores de canais de cálcio, analisados na pré e pós-fecundação, bem como os oócitos pertencentes às fêmeas tratadas *in vivo*.

3.7 ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DOS OÓCITOS FECUNDADOS *IN VITRO*

A avaliação ultraestrutural dos oócitos tratados com bloqueadores de canais de cálcio foi realizada com o objetivo de se estudar os possíveis efeitos no comportamento dos grânulos corticais, estoques de cálcio intracelulares e outras modificações citoplasmáticas.

Após seis horas da fertilização *in vitro* (item 3.4.2), os oócitos foram lavados por três vezes em PBS e inclusos em resina para a sua análise sob microscopia eletrônica de transmissão, de acordo com a técnica descrita por Esper (1986) (ANEXO G).

Os oócitos foram fixados por uma hora em glutaldeído a 1% em tampão cacodilato de sódio 0,15M (pH 7,6). Posteriormente, foram submetidos à pós-fixação em tetróxido de ósmio a 1% por três horas a 4°C. Subseqüentemente, estes foram lavados em água destilada e desidratados em etanol. Em seguida, após uma pré-inclusão, os oócitos foram incluídos em POLY/BED 812 de acordo com os procedimentos padrões e, finalmente, seccionados serialmente em cortes semifinos e ultrafinos. As secções semifinas foram coradas com azul de toluidina e examinadas sobre microscopia ótica (100-400x) (Zeiss, Alemanha). As ultrafinas foram coradas com acetato de uranila e citrato de chumbo e avaliadas sob microscopia eletrônica de transmissão (PHILIPS CM-100, Holanda).

3.8 EXPERIMENTO I - TRATAMENTO *IN VITRO* DOS OÓCITOS COM OS BLOQUEADORES DE CANAIS DE CÁLCIO

Para a pesquisa dos efeitos dos bloqueadores de canais de cálcio verapamil, nifedipina e diltiazem em tratamentos *in vitro*, oócitos foram estudados quanto a sua fertilidade *in vitro* e ao comportamento de seus grânulos corticais.

Após a colheita dos oócitos (item 3.3), os mesmos foram tratados por 30 min em microgotas de 100µL de TL-HEPES-PVA acrescido de um dos bloqueadores de canais de cálcio, sob óleo mineral, e incubados a 37°C e 5% de CO₂ em ar. Após este período, foram lavados por três vezes em TL-HEPES-PVA e passados para as gotas de fecundação (item 3.4.2).

O verapamil (Sigma-Aldrich, V-4629) e o diltiazem (Sigma-Aldrich, D-2521) foram diluídos diretamente no meio TL-HEPES-PVA e a nifedipina (Sigma-Aldrich, N-7634) pré-diluída em uma solução de etanol a 0,5%.

As concentrações utilizadas dos bloqueadores de canais de cálcio foram:

Bloqueadores de Canais de Cálcio	Concentração					
	10µM	100µM	500µM	1mM	2mM	4mM
Verapamil	x	x	-	-	x	x
Nifedipina	x	x	x	x	-	-
Diltiazem	x	x	-	-	x	x

Para o teste de fertilidade *in vitro* (item 3.4.2 e 3.5) foram utilizados 2.850 oócitos e para a análise do comportamento dos grânulos corticais (item 3.6), 1.157 oócitos.

As análises estatísticas foram conduzidas empregando-se o programa computacional SAS (2000) para determinar diferenças entre controle x tratamento. As taxas de fecundação *in*

vitro foram comparadas pelo teste de Qui-Quadrado (χ^2), com nível de significância de 5%. A variável grânulos corticais foi avaliada por estatísticas descritivas.

3.9 EXPERIMENTO II - TRATAMENTO *IN VIVO* DAS FÊMEAS COM BLOQUEADORES DE CANAIS DE CÁLCIO

Para se verificar os efeitos dos bloqueadores de canais de cálcio em tratamentos *in vivo*, foram realizados testes de fertilidade *in vivo* e *in vitro*, avaliado o comportamento dos grânulos corticais e a análise ultraestrutural, sob microscopia de transmissão, de oócitos fertilizados.

3.9.1 Administração por via oral

Fêmeas hamsters (n=72), pesando de 95 a 160g e divididas em lotes uniformes, foram tratadas com bloqueadores de canais de cálcio: verapamil (Vepamil[®], Neo Química, Anápolis, Go), nifedipina (Adalat[®], Bayer, São Paulo, SP) ou diltiazem (Balcor[®], Baldacci, São Paulo, SP). Estes fármacos foram administrados pela via oral (sistema de gavagem), duas vezes ao dia, iniciando-se 30 dias antes da realização dos testes. O grupo controle recebeu água como placebo.

As doses utilizadas foram 40mg/kg/dia de verapamil, 50mg/kg/dia de nifedipina e 40mg/kg/dia de diltiazem, calculadas com analogia à espécie humana e respeitando-se a DL₅₀

para hamsters. As drogas verapamil e diltiazem foram diluídas em água destilada e a nifedipina, em água com 0,5% de Tween 80 (Sigma-Aldrich, P-4780), no momento do uso.

Para o teste de fertilidade *in vivo* foram acasaladas nove fêmeas por grupo; para os testes de fertilização *in vitro* (item 3.4.2 e 3.5) e de comportamento dos grânulos corticais (item 3.6) foram utilizados quatro animais por grupo, num total de 409 oócitos; e para a análise ultraestrutural (item 3.7), três animais por grupo.

O acasalamento foi realizado com duas fêmeas para cada macho em um período de oito dias, referindo-se a dois ciclos estrais. Neste teste *in vivo* as fêmeas continuaram a receber o medicamento até o final do acasalamento. Após 16 dias (período de gestação), o número de filhotes por ninhada foi registrado.

O número de filhotes por ninhada foi analisado utilizando-se um modelo que incluiu os efeitos de tratamento (grupos) e animal, quando o efeito de tratamento foi significativo pelo teste F, as médias dos grupos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As taxas de fecundação *in vivo* e *in vitro* foram comparadas pelo χ^2 , valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo. Os grânulos corticais e a condição ultraestrutural dos oócitos foram analisados por estatísticas descritivas.

3.9.2 Administração por via intraperitoneal

Fêmeas hamsters (n=80), pesando de 95 a 160g e divididos em lotes uniformes, foram tratadas com bloqueadores de canais de cálcio: verapamil (Dilacoron[®], Knoll, Rio de Janeiro, RJ), nifedipina (Adalat[®], Bayer, São Paulo, SP) ou diltiazem (Balcor[®] EV, Baldacci, São Paulo, SP). Estes fármacos foram administrados pela via intraperitoneal, duas vezes ao dia,

iniciando-se 30 dias antes da realização dos testes. No grupo controle foi aplicado solução fisiológica como placebo.

As doses utilizadas foram 5,0mg/kg/dia de verapamil, 10mg/kg/dia de nifedipina e 10mg/kg/dia de diltiazem, respeitando-se a DL₅₀. As drogas verapamil e diltiazem foram diluídas em solução fisiológica e a nifedipina, em solução alcoólica a 15%, no momento do uso.

Para o teste de fertilidade *in vivo* foram acasaladas sete fêmeas por grupo, e para os testes de fertilização *in vitro* (item 3.4.2 e 3.5) e de comportamento dos grânulos corticais (item 3.6) foram utilizados seis animais por grupo, num total de 701 oócitos.

O acasalamento foi realizado com duas fêmeas para cada macho em um período de oito dias. Neste teste *in vivo*, as fêmeas receberam o medicamento até o final do acasalamento. Após 16 dias (período de gestação), o número de filhotes por ninhada foi registrado e, após 20 dias do nascimento, foram averiguados o peso e a taxa de mortalidade.

As variáveis número de filhotes por ninhada e peso dos filhotes aos 20 dias de nascimento foram analisadas por um modelo que incluiu os efeitos de tratamento (grupos) e animal. Quando o efeito de tratamento foi significativo pelo teste F, as médias dos grupos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As taxas de fecundação *in vivo* e *in vitro* foram comparadas pelo χ^2 , valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo. As características grânulos corticais e condição ultraestrutural dos oócitos foram analisadas por estatísticas descritivas.

3.10 EXPERIMENTO III - DOSAGEM DE CÁLCIO INTRACELULAR EM OÓCITOS

Em busca de se encontrar alterações no cálcio intracelular de oócitos mamíferos causados por bloqueadores de canais de cálcio, a quantidade do íon cálcio foi mensurada no meio intracelular deste gameta.

Para esta mensuração, oócitos foram colhidos (item 3.3), e os CCOs transferidos para placas de Petri de plástico (35 mm) contendo TL-HEPES-PVA, livre de cálcio e vermelho fenol (pH 7,4). Em seguida, a matriz celular do CCOs foi dissolvida neste mesmo meio contendo 0,2% de hialuronidase. Após lavar os oócitos por três vezes, agora desnudos, foram colocados em um microtubo contendo 100µL do meio TL-HEPES-PVA (pH 7,4), livre de cálcio, acrescido de 0,02% de pluronic e 10µM de Fluo-3 AM (Sigma-Aldrich, F-6142). Em seguida todo conjunto foi incubado em estufa úmida por 30 min a 37°C e 5% de CO₂ em ar. Após este período, o espectro foi mensurado no espectrofluorímetro (excitação 496nm e emissão 525nm) (Hitachi F-4500, Japan) para se averiguar a incorporação da sonda aos oócitos. Os oócitos foram lavados com o meio livre de cálcio por três vezes e o total dividido igualmente, variando de 40 a 50 gametas por grupo experimental (leitura no aparelho).

Em uma cubeta de quartzo com capacidade de 1mL, os oócitos foram colocados em 600µL do meio sem cálcio para a mensuração do cálcio intracelular no espectrofluorímetro, com temperatura controlada a 37°C.

A adição dos bloqueadores de canais de cálcio (verapamil, nifedipina ou diltiazem, a 50µM), bem como do íon cálcio (cálcio extracelular) e do cálcio ionóforo A23187 (4µM) (Sigma-Aldrich, C-7522), foi realizada como mostra o esquema do delineamento experimental para o grupo controle e tratado em cada experimento, respectivamente:

A variação da intensidade de fluorescência do Fluo 3-AM foi registrada de forma temporal por 720 segundos.

Foram realizadas cinco repetições (*pool* de oócitos) para cada experimento, sempre se comparando Grupo Controle x Grupo Bloqueador de Cálcio. Para se conseguir o mesmo padrão de carregamento da sonda Fluo-3AM, o *pool* de oócitos obtidos de um conjunto de fêmeas foram utilizados tanto para o grupo controle como para o tratado, assim, obtendo-se resultados mais fidedignos.

O valor obtido da leitura da intensidade de fluorescência foi lançado na seguinte fórmula para se calcular a concentração do cálcio intracelular (GRYNKIEWICZ; POENIE; TSIEN, 1985).

$$[Ca^{+2}]_{IC} = K_d \times \left(\frac{F - F_{\min}}{F_{\max} - F} \right)$$

onde,

K_d = constante de dissociação *in vitro* do Fluo 3-AM (=390)

F = razão de fluorescência obtida por excitação em 496nm e emissão em 525nm.

F min = razão de fluorescência obtida em concentração nula de cálcio.

F max = razão de fluorescência em presença saturante de cálcio (adição de cálcio ionóforo).

A variável cálcio intracelular, previamente transformada em log, foi analisada utilizando-se um delineamento em parcelas (grupos) subdivididas no tempo. Na comparação dos grupos (controle x bloqueador), um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4 RESULTADOS

4.1 EXPERIMENTO I - TRATAMENTOS *IN VITRO* DOS OÓCITOS COM BLOQUEADORES DE CANAIS DE CÁLCIO

4.1.1 Incubação dos oócitos com bloqueadores dos canais de cálcio e fertilização *in vitro*

Com o objetivo de se avaliar os efeitos dos bloqueadores de canais de cálcio verapamil, nifedipina e diltiazem sobre a fertilidade de oócitos de hamsters em tratamentos *in vitro*, 2.850 oócitos foram pré-incubados com os antagonistas por 30 min e, em seguida, fertilizados com espermatozóides capacitados livres dos fármacos.

- **Oócitos incubados *in vitro* com verapamil**

As taxas de fecundação *in vitro* dos oócitos tratados com verapamil a 10 μ M, 100 μ M, 2mM e 4mM (Tabela 01 e Figura 01) foram menores estatisticamente ($p < 0,001$) em relação ao grupo controle. Os resultados se mostraram dose-dependentes e, nas concentrações de 10 μ M, 100 μ M e 2mM houve a penetração do espermatozóide, porém não ocorreu a sua descondensação, nem a formação do pronúcleo masculino ou feminino, ou a liberação do segundo corpúsculo polar, indicando a não ativação do oócito (Figura 02). Já, na concentração

de 4mM, a fecundação foi totalmente bloqueada pelo verapamil, havendo alteração de cor e espessura no citoplasma e na zona pelúcida.

Tabela 01 – Número de oócitos e porcentagem da fertilidade *in vitro* (taxa de fecundação, penetração e polispermia sem descondensação) de oócitos tratados com verapamil a 10 μ M, 100 μ M, 2mM e 4mM por 30 minutos antes da fecundação. Jaboticabal-SP, 2004

Tratamento	Fecundado n (%)	Não Fecundado n (%)	Penetração sem Descondensação n (%)	Polispermia sem Descondensação n (%)	Número de Oócitos
Controle	250 (96,1) ^a	10 (3,9) ^a	0 ^a	0 ^a	260
10μM	85 (80,1) ^b	19 (18,0) ^b	1 (0,95) ^a	1 (0,95) ^a	106
100μM	75 (76,5) ^b	17 (17,3) ^b	4 (4,1) ^b	2 (2,1) ^a	98
2mM	32 (16,3) ^c	86 (43,9) ^c	70 (35,7) ^c	8 (4,1) ^b	196
4mM	0 ^d	108 (100) ^d	0 ^a	0 ^a	108
Total	-	-	-	-	768

Números seguidos de letras diferentes na mesma coluna diferem-se estatisticamente entre si ($p < 0,001$).

Letras diferentes indicam que a taxa de fecundados diferem-se estatisticamente entre si ($p < 0,001$).

Figura 01 - Taxa de fecundação *in vitro* de oócitos tratados com verapamil a 10 μ M, 100 μ M, 2mM e 4mM por 30 minutos antes da fecundação.

Figura 02 - Oócitos tratados com verapamil e corados com Hoechst 33342. (a) Oócito fecundado (formação dos pronúcleos masculino e feminino, liberação do corpúsculo polar); (b) Oócito não fecundado (em metáfase); (c) Polispermia (formação de mais de dois pronúcleos, liberação do corpúsculo polar); (d) Oócito com penetração de um espermatozóide, porém sem a sua descondensação; (e) Polispermia sem descondensação dos espermatozoides. Imagens digitalizadas.

- **Oócitos incubados *in vitro* com nifedipina**

As taxas de fecundação *in vitro* dos oócitos tratados com nifedipina a 10 μ M, 100 μ M, 500 μ M e 1mM (Tabela 02 e Figura 03) foram menores estatisticamente ($p < 0,001$) em relação ao grupo controle. Os resultados foram dose-dependentes e, nas concentrações de 500 μ M e 1mM houve uma elevação na taxa de polispermia (Figura 04). Neste grupo não ocorreu o fenômeno da penetração ou da polispermia sem a descondensação do espermatozóide.

Tabela 02 – Número de oócitos e porcentagem da fertilidade *in vitro* (taxa de fecundação e polispermia) de oócitos tratados com nifedipina a 10 μ M, 100 μ M, 500 μ M e 1mM por 30 minutos antes da fecundação. Jaboticabal-SP, 2004

Tratamento	Fecundado n (%)	Não Fecundado n (%)	Polispermia n (%)	Número de Oócitos
Controle	367 (91,3) ^a	30 (7,5) ^a	5 (1,2) ^a	402
10μM	168 (84,8) ^b	30 (15,2) ^b	0 ^a	198
100μM	134 (72,8) ^b	48 (26,1) ^b	2 (1,1) ^a	184
500μM	68 (37,4) ^c	102 (56,0) ^c	12 (6,6) ^b	182
1mM	38 (24,4) ^c	106 (67,9) ^c	12 (7,7) ^b	156
Total	-	-	-	1122

Números seguidos de letras diferentes na mesma coluna diferem-se estatisticamente entre si ($p < 0,001$).

Letras diferentes indicam que a taxa de fecundados diferem-se estatisticamente entre si ($p < 0,001$).

Figura 03 - Taxa de fecundação *in vitro* de oócitos tratados com nifedipina a 10 μ M, 100 μ M, 500 μ M e 1mM por 30 minutos antes da fecundação.

Figura 04 – Oócitos tratados com nifedipina e corados com Hoechst 33342. (a) Oócito fecundado (formação dos pronúcleos masculino e feminino, liberação do corpúsculo polar); (b) Oócito não fecundado (em metáfase); (c) Polispermia (formação de mais de dois pronúcleos, liberação do corpúsculo polar). Imagens digitalizadas.

- Oócitos incubados *in vitro* com diltiazem

As taxas de fecundação *in vitro* dos oócitos tratados com diltiazem a 10 μ M, 100 μ M, 2mM e 4mM (Tabela 03 e Figura 05) foram menores estatisticamente ($p < 0,001$) em relação ao grupo controle. Os resultados foram dose-dependentes e em todas as concentrações testadas houve a penetração do espermatozóide, porém não ocorreu a sua descondensação, nem a formação do pronúcleo masculino ou feminino e, nem a liberação do segundo corpúsculo polar, indicando a não ativação do oócito (Figura 06).

Tabela 03 – Número de oócitos e porcentagem da fertilidade *in vitro* (taxa de fecundação, polispermia, penetração e polispermia sem descondensação) de oócitos tratados com diltiazem a 10 μ M, 100 μ M, 2mM e 4mM por 30 minutos antes da fecundação. Jaboticabal-SP, 2004

Tratamento	Não		Penetração		Polispermia	Número de Oócitos
	Fecundado	Fecundado	Polispermia	Descondensação	Descondensação	
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
Controle	270 (92,5) ^a	16 (5,5) ^a	6 (2,0) ^a	0 ^a	0 ^a	292
10μM	108 (72,0) ^b	20 (13,4) ^b	10 (6,6) ^b	8 (5,4) ^b	4 (2,6) ^b	150
100μM	138 (80,2) ^b	18 (10,5) ^b	2 (1,2) ^a	6 (3,5) ^b	8 (4,6) ^b	172
2mM	24 (12,8) ^c	36 (19,1) ^b	14 (7,4) ^b	62 (33,0) ^c	52 (27,7) ^d	188
4mM	2 (1,3) ^d	60 (38,0) ^c	4 (2,5) ^a	70 (44,3) ^c	22 (13,9) ^c	158
Total	-	-	-	-	-	960

Números seguidos de letras diferentes na mesma coluna diferem-se estatisticamente entre si ($p < 0,001$).

Letras diferentes indicam que a taxa de fecundados diferem-se estatisticamente entre si ($p < 0,001$).

Figura 05 - Taxa de fecundação *in vitro* de oócitos tratados com diltiazem a 10 μ M, 100 μ M, 2mM e 4mM por 30 minutos antes da fecundação.

Figura 06 - Oócitos tratados com diltiazem e corados com Hoechst 33342. (a) Oócito fecundado (formação dos pronúcleos masculino e feminino, liberação do corpúsculo polar); (b) Oócito não fecundado (em metáfase); (c) Polispermia (formação de mais de dois pronúcleos, liberação do corpúsculo polar); (d) Oócito com penetração de um espermatozóide, porém sem a sua descondensação; (e) Polispermia sem descondensação dos espermatozoides. Imagens digitalizadas.

4.1.2 Comportamento dos grânulos corticais após o tratamento *in vitro* dos oócitos com bloqueadores de canais de cálcio e fertilização *in vitro*

O objetivo deste experimento foi verificar se os bloqueadores de canais de cálcio verapamil, nifedipina e diltiazem afetam a exocitose dos grânulos corticais de oócitos expostos por 30 min antes da FIV. Para a associação dos eventos, 1.157 oócitos foram corados simultaneamente com Hoechst 33342 para a visualização da cromatina, e com isotiocianato de fluoresceína (*Lens cullinaris*) para a avaliação dos grânulos corticais. Todos os grupos tratados apresentaram a taxa de fertilização *in vitro* inferior ($p < 0,001$) quando comparado ao grupo controle.

- **Controle**

No grupo controle (Tabelas 04, 05 e 06), a taxa média de fertilização *in vitro* total foi de 92,7% ($n=217$). Nos oócitos fecundados ocorreu a extrusão total dos grânulos corticais, mas nos não fecundados os grânulos corticais não foram liberados, permanecendo em toda a periferia da membrana plasmática (Figura 07).

Figura 07 - Oócitos do grupo controle. **(a)** Oócito não fecundado: **(a₁)** Metáfase, **(a₂)** Grânulos corticais em toda a periferia da membrana plasmática e **(a₃)** Associação dos dois eventos (filtro para as duas colorações); **(b)** Oócito fecundado: **(b₁)** Pronúcleos e corpúsculo polar, **(b₂)** Extrusão total dos grânulos corticais e **(b₃)** Associação dos dois eventos (filtro para as duas colorações). Azul: Hoechst 33342; Verde: isotiocianato de fluoresceína (*Lens cullinaris*). Imagens digitalizadas.

- **Verapamil**

Neste grupo observou-se que o comportamento dos grânulos corticais nos oócitos fecundados e não fecundados foi semelhante ao do grupo controle. Nos oócitos com penetração ou polispermia sem descondensação da cromatina não houve a ativação nem a formação dos pronúcleos e ocorreu uma liberação parcial dos grânulos corticais, apresentando-se em aspecto de grumos (*clusters*) (Figura 08). A presença do verapamil na pré-fecundação teve efeito dose-dependente, influenciando a fertilização *in vitro* (Tabela 04), a exocitose dos grânulos corticais e a ativação oocitária. A taxa de fertilização *in vitro* do grupo controle foi superior estatisticamente ($p < 0,001$) ao do verapamil.

Tabela 04 – Número de oócitos e porcentagem da fertilidade *in vitro* (taxa de fecundação, polispermia, penetração e polispermia sem descondensação) de oócitos tratados com verapamil. Jaboticabal-SP, 2004

Tratamento	Fecundado n (%)	Não Fecundado n (%)	Polispermia n (%)	Penetração sem Descondensação n (%)	Polispermia sem Descondensação n (%)	Número de Oócitos
Controle	74 (93,6) ^a	5 (6,4) ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	79
10μM	55 (78,7) ^b	10 (14,3) ^b	1 (1,4) ^a	2 (2,8) ^a	2 (2,8) ^a	70
100μM	53 (71,6) ^b	10 (13,5) ^b	2 (2,7) ^a	8 (10,8) ^b	1 (1,4) ^a	74
2mM	15 (17,7) ^c	28 (32,9) ^c	8 (9,5) ^b	30 (35,2) ^c	4 (4,7) ^b	85
4mM	0 ^d	63 (98,5) ^d	0 ^a	1 (1,5) ^a	0 ^a	64
Total	-	-	-	-	-	372

Números seguidos de letras diferentes na mesma coluna diferem-se estatisticamente entre si ($p < 0,001$).

Figura 08 - Oócitos tratados com verapamil. (a₁) Polispermia sem descondensação; (a₂), (b₂), (c₂) e (d) Grânulos corticais em grumos (*clusters*); (b₁) e (c₁) Penetração sem descondensação. Azul: Hoechst 33342; Verde: isotiocianato de fluoresceína (*Lens culinaris*). Imagens digitalizadas.

- **Nifedipina**

Na presença da nifedipina, o comportamento dos grânulos corticais foi semelhante ao do grupo controle nos oócitos fecundados, porém, nos não fecundados houve alteração no padrão de coloração da *Lens cullinaris*, ficando menos corados (Figura 09). Os resultados revelaram que o tratamento pré-fecundação dos oócitos com nifedipina influenciou, de forma dose-dependente, a fertilização *in vitro* (Tabela 05), elevando também a proporção de polispermia. A taxa de fertilização *in vitro* do grupo controle foi estatisticamente ($p < 0,001$) maior em relação ao da nifedipina.

Tabela 05 – Número de oócitos e porcentagem da fertilidade *in vitro* (taxa de fecundação e polispermia) de oócitos tratados com nifedipina. Jaboticabal-SP, 2004

Tratamento	Fecundado n (%)	Não Fecundado n (%)	Polispermia n (%)	Número de Oócitos
Controle	65 (91,6) ^a	6 (8,4) ^a	0 ^a	71
10μM	52 (78,8) ^b	13 (19,7) ^b	1 (1,5) ^a	66
100μM	49 (71,0) ^b	19 (27,6) ^b	1 (1,4) ^a	69
500μM	33 (40,2) ^c	43 (52,4) ^c	6 (7,4) ^b	82
1mM	11 (15,3) ^d	56 (77,8) ^d	5 (6,9) ^b	72
Total	-	-	-	360

Números seguidos de letras diferentes na mesma coluna diferem-se estatisticamente entre si ($p < 0,001$).

Figura 09 - Oócitos tratados com nifedipina. **(a₁)** Oócito não fecundado – metáfase, **(a₂)**, **(b)** e **(c)** Falha de coloração na região dos grânulos corticais em oócitos não fecundados. Azul: Hoechst 33342; Verde: isotiocianato de fluoresceína (*Lens cullinaris*). Imagens digitalizadas.

- **Diltiazem**

Os oócitos tratados com diltiazem e avaliados pela técnica da coloração com isotiocianato de fluoresceína (*Lens cullinaris*) apresentaram o comportamento de seus grânulos corticais semelhante ao grupo controle nos oócitos fecundados e não fecundados. Porém, na ocorrência de penetração ou polispermia sem descondensação da cromatina do espermatozóide houve uma liberação parcial dos grânulos corticais, apresentando umas faixas com grânulos (Figura 10). A presença do diltiazem na pré-fecundação teve efeito dose-dependente, influenciando a fertilização *in vitro* (Tabela 06), a exocitose dos grânulos corticais e a ativação oocitária. A taxa de fecundação *in vitro* do grupo controle foi estatisticamente superior ($p < 0,001$) aos grupos tratados com diltiazem.

Tabela 06 – Número de oócitos e porcentagem da fertilidade *in vitro* (taxa de fecundação, polispermia, penetração e polispermia sem descondensação) de oócitos tratados com diltiazem. Jaboticabal-SP, 2004

Tratamento	Não			Penetração sem	Polispermia sem	Número de Oócitos
	Fecundado n (%)	Fecundado n (%)	Polispermia n (%)	Descondensação n (%)	Descondensação n (%)	
Controle	78 (92,8) ^a	6 (7,2) ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	84
10μM	57 (71,2) ^b	10 (12,6) ^b	5 (6,2) ^b	5 (6,2) ^b	3 (3,8)	80
100μM	45 (60,0) ^c	17 (22,7) ^c	1 (1,3) ^a	6 (8,0) ^b	6 (8,0)	75
2mM	15 (15,6) ^d	20 (20,8) ^c	2 (2,1) ^a	27 (28,1) ^c	32 (33,4)	96
4mM	3 (3,4) ^e	32 (35,5) ^d	1 (1,1) ^a	44 (48,9) ^d	10 (11,1)	90
Total	-	-	-	-	-	425

Números seguidos de letras diferentes na mesma coluna diferem-se estatisticamente entre si ($p < 0,001$).

Figura 10 - Oócitos tratados com diltiazem. (a₁) Penetração sem descondensação; (a₂), (b₂) e (c₂) Grânulos corticais em faixas e grumos; (b₁) e (c₁) Polispermia sem descondensação; (a₃) e (b₃) Associação dos dois eventos (filtro para as duas colorações). Azul: Hoechst 33342; Verde: isotiocianato de fluoresceína (*Lens culinaris*). Imagens digitalizadas.

4.2 EXPERIMENTO II - TRATAMENTO *IN VIVO* DAS FÊMEAS COM BLOQUEADORES DE CANAIS DE CÁLCIO

4.2.1 Tratamento por via oral das fêmeas com bloqueadores de canais de cálcio

4.2.1.1 Fertilidade *in vivo* das fêmeas submetidas à terapia oral

Após a terapia oral com bloqueadores de canais de cálcio por 30 dias, nove fêmeas hamsters por grupo foram acasaladas com machos não tratados. As fêmeas receberam os bloqueadores de canais de cálcio até a remoção dos machos (8 dias). Decorrido o tempo de gestação foi avaliada a fertilidade e o número de filhotes por ninhada (Tabela 07).

Tabela 07 – Fertilidade *in vivo* e número médio de filhotes por ninhada de fêmeas tratadas com bloqueadores de canais de cálcio por via oral durante 30 dias. Jaboticabal-SP, 2004

Parâmetros	Controle	Verapamil	Nifedipina	Diltiazem
Fertilidade	9/9 (100) ^a	6/9 (66,6) ^a	8/9 (88,9) ^a	7/9 (77,7) ^a
Filhotes por ninhada	10,5 ^a	6,83 ^b	10 ^a	10,28 ^a

Números seguidos de letras diferentes na mesma linha diferem-se estatisticamente entre si ($p < 0,05$).

Com relação à fertilidade *in vivo*, não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre o grupo controle e os tratados. Apenas o grupo verapamil apresentou uma redução ($p < 0,05$) do número de filhotes por ninhada em relação ao grupo controle.

4.2.1.2 Fertilidade *in vitro* e comportamento dos grânulos corticais dos oócitos de fêmeas submetidas à terapia oral com bloqueadores de canais de cálcio

Após o tratamento, durante 30 dias por via oral, quatro fêmeas por grupo foram superovuladas e seus oócitos submetidos à fertilização *in vitro*, para a avaliação da taxa de fecundação e do comportamento dos grânulos corticais, com o objetivo de averiguar os possíveis efeitos da terapia anti-hipertensiva.

A taxa de fecundação *in vitro* dos oócitos destas fêmeas (Tabela 08 e Figura 11) do grupo controle foi superior estatisticamente ($p < 0,001$) em relação a dos grupos verapamil, nifedipina e diltiazem.

Tabela 08 – Número de oócitos e porcentagem da taxa de fecundação *in vitro* de oócitos de fêmeas submetidas à terapia oral com bloqueadores de canais de cálcio por 30 dias. Jaboticabal-SP, 2004

Tratamento	Fecundado n (%)	Não Fecundado n (%)	Polispermia n (%)	Número de Oócitos
Controle	117 (90,7) ^a	11 (8,5) ^a	1 (0,7) ^a	129
Verapamil	80 (74,1) ^b	28 (25,9) ^b	0 ^a	108
Nifedipina	65 (79,3) ^b	17 (20,7) ^b	0 ^a	82
Diltiazem	60 (66,7) ^b	30 (33,3) ^b	0 ^a	90
Total	-	-	-	409

Números seguidos de letras diferentes na mesma coluna diferem-se estatisticamente entre si ($p < 0,001$).

Letras diferentes indicam que a taxa de fecundados diferem-se estatisticamente entre si ($p < 0,001$).

Figura 11 - Taxa de fecundação *in vitro* de oócitos de fêmeas submetidas à terapia oral com bloqueadores de canais de cálcio por 30 dias.

Com relação ao comportamento dos grânulos corticais, não foi detectada diferença entre aos grupos pela técnica de coloração utilizada, ou seja, a exocitose dos grânulos corticais nos oócitos fecundados dos grupos submetidos à terapia anti-hipertensiva ocorreu de forma semelhante a do grupo controle.

4.2.1.3 Análise ultraestrutural de oócitos fertilizados de fêmeas submetidas à terapia oral com bloqueadores de canais de cálcio

As fêmeas tratadas com os antagonistas de cálcio, durante 30 dias por via oral, foram superovuladas e seus oócitos foram submetidos à fertilização *in vitro*. Após seis horas, foram preparados para a análise ultraestrutural por microscopia eletrônica de transmissão, em busca de alterações citoplasmáticas causadas pela terapia.

A análise das eletronmicrografias dos oócitos com relação aos grânulos corticais, aspecto citoplasmático, retículo endoplasmático, membrana plasmática e zona pelúcida não detectou alterações com esta técnica entre o grupo controle (Figura 12) e os grupos tratados pela via oral com verapamil (Figura 13), nifedipina (Figura 14) e diltiazem (Figura 15).

Figura 12 - Eletronmicrografias de oócitos, após seis horas de fecundação *in vitro*, de fêmeas submetidas à terapia oral com bloqueadores de canais de cálcio por 30 dias - Grupo Controle. **(a)** Nota-se um citoplasma rico em retículo endoplasmático granular (RE), mitocôndrias (Mt) em *clusters*, vesículas (V) e microvilosidades (Mv), 7.750X; **(b)** Presença de espermatozóides (Sp) no espaço perivitelíneo (EV) e microvilosidades, 17.000X; **(c)** Mitocôndrias sem cristas (ortodoxa), retículo endoplasmático granular, vesículas e microvilosidades, 31.500X; **(d)** Mitocôndrias ortodoxas, retículo endoplasmático granular, vesículas, microvilosidades e grânulo cortical (GC) em exocitose na periferia do oócito, 77.500X.

Figura 13 - Eletronmicrografias de oócitos, após seis horas de fecundação *in vitro*, de fêmeas submetidas à terapia oral com bloqueadores de canais de cálcio por 30 dias - Grupo Verapamil. **(a)** Nota-se um citoplasma rico em retículo endoplasmático granular (RE), mitocôndrias (Mt) em *clusters* e microvilosidades (Mv), 7.750X; **(b)** Retículo endoplasmático granular, poucas mitocôndrias, presença de um grânulo cortical (GC) na periferia do oócito e microvilosidades, 23.000X; **(c)** Mitocôndrias sem cristas (ortodoxa), retículo endoplasmático granular, grânulo cortical e microvilosidades, 31.500X; **(d)** Muitos grânulos corticais na periferia, retículo endoplasmático granular, vesículas (V) e microvilosidades, 77.500X.

Figura 14 - Eletronmicrografias de oócitos, após seis horas de fecundação *in vitro*, de fêmeas submetidas à terapia oral com bloqueadores de canais de cálcio por 30 dias - Grupo Nifedipina. (a) Nota-se grande quantidade de retículo endoplasmático granular (RE), mitocôndrias (Mt) sem cristas (ortodoxas) e algumas vezes sob a forma de *hooded* (*), vesícula (V), grânulos corticais (GC) na periferia do oócito e microvilosidades (Mv), 31.500X; (b) Retículo endoplasmático granular, mitocôndrias sem cristas (ortodoxa), grânulos corticais, presença do complexo de Golgi (CG) e microvilosidades, 42.000X; (c) Mitocôndrias, retículo endoplasmático granular e grânulo cortical, 77.500X.

Figura 15 - Eletronmicrografias de oócitos, após seis horas de fecundação *in vitro*, de fêmeas submetidas à terapia oral com bloqueadores de canais de cálcio por 30 dias - Grupo Diltiazem. **(a)** Nota-se um citoplasma rico em retículo endoplasmático granular (RE), mitocôndrias (Mt) em *clusters*, e microvilosidades (Mv), 7.750X; **(b)** Retículo endoplasmático granular, mitocôndrias sem cristas (ortodoxa), presença de grânulos corticais (GC) na periferia do oócito, vesícula (V) e microvilosidades, 31.500X e **(c)** Mitocôndrias ortodoxas em *clusters*, retículo endoplasmático granular e microvilosidades, 31.500X.

4.2.2 Tratamento pela via intraperitoneal das fêmeas com bloqueadores de canais de cálcio

4.2.2.1 Fertilidade *in vivo* das fêmeas submetidas à terapia intraperitoneal

Após a terapia com bloqueadores de canais de cálcio, por via intraperitoneal durante 30 dias, sete fêmeas hamsters por grupo foram acasaladas durante oito dias com machos não tratados. As fêmeas receberam os bloqueadores de canais de cálcio até a remoção dos machos. Decorrido o tempo de gestação foram avaliados a fertilidade e o número de filhotes por ninhada (Tabela 09). A taxa de prenhez do grupo controle foi maior ($p < 0,10$) em relação ao grupo nifedipina, mas sem diferenças significativas com relação aos demais.

Apesar de não haver a redução ($p > 0,05$) do número de filhotes por ninhada entre os grupos, durante o período de amamentação, uma aparente deficiência de crescimento foi observada entre os animais de uma mesma ninhada e entre as ninhadas dos grupos tratados, como também alguma mortalidade. Como manejo habitual do biotério, após 20 dias de idade, os filhotes foram sexados e separados, quando se notou uma grande diversidade de tamanho entre irmãos e entre ninhadas nos grupos verapamil, nifedipina e diltiazem, não ocorrendo o mesmo no grupo controle (Figura 16), ainda letargia e incoordenação motora. A partir desta observação, os pesos dos filhotes vivos foram registrados (Tabela 09). A mortalidade e o peso médio no grupo controle diferiram estatisticamente ($p < 0,05$) que os grupos tratados. Não houve desvio entre os sexos.

Tabela 09 - Fertilidade *in vivo* de fêmeas tratadas com bloqueadores de canais de cálcio pela via intraperitoneal por 30 dias, número médio de filhotes por ninhada, mortalidade média (%) e peso médio (g) aos 20 dias do nascimento. Jaboticabal-SP, 2004

Parâmetros	Controle	Verapamil	Nifedipina	Diltiazem
Fertilidade	7/7 (100) ^A	7/7 (100) ^A	4/7 (57,2) ^B	5/7 (71,5) ^A
Filhotes por ninhada	10,8 ^a	8,3 ^a	9,25 ^a	9,4 ^a
Nº total de filhotes	76	58	37	47
Mortalidade	2 (1,6) ^a	15 (25,9) ^b	8 (21,6) ^b	11 (23,4) ^b
Peso médio	54,3 ^a	40,2 ^b	32 ^b	29,8 ^b

Números seguidos de letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem-se estatisticamente entre si ($p < 0,10$). Números seguidos de letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem-se estatisticamente entre si ($p < 0,05$).

Figura 16 – Filhotes com 20 dias de idade de fêmeas hamsters tratadas por 30 dias com verapamil, nifedipina ou diltiazem e por mais 8 dias durante o acasalamento. (a) Grupo controle; (b), (c) e (d) Grupos tratados com bloqueadores de canais de cálcio, apresentando uma diversidade de tamanho de filhotes da mesma ninhada (b e c) e entre ninhadas. Imagens digitalizadas.

4.2.2.2 Fertilidade *in vitro* e comportamento dos grânulos corticais de oócitos de fêmeas submetidas à terapia intraperitoneal com bloqueadores de canais de cálcio

Após o tratamento durante 30 dias pela via intraperitoneal, seis fêmeas por grupo foram superovuladas e seus oócitos submetidos à fertilização *in vitro* para a avaliação da taxa de fecundação e do comportamento dos grânulos corticais, com o objetivo de averiguar os possíveis efeitos da terapia anti-hipertensiva.

A taxa de fecundação *in vitro* de oócitos destas fêmeas do grupo controle foi superior estatisticamente ($p < 0,001$) em relação aos grupos tratados com verapamil, nifedipina e diltiazem (Tabela 10 e Figura 17).

Tabela 10 – Número de oócitos e porcentagem da taxa de fecundação *in vitro* de oócitos de fêmeas submetidas à terapia intraperitoneal de bloqueadores de canais de cálcio por 30 dias. Jaboticabal-SP, 2004

Tratamento	Fecundado n (%)	Não Fecundado n (%)	Número de Oócitos
Controle	144 (90,0) ^a	16 (10,0) ^a	160
Verapamil	11 (65,3) ^b	59 (34,7) ^b	170
Nifedipina	125 (61,9) ^b	77 (38,1) ^b	202
Diltiazem	107 (63,3) ^b	62 (36,7) ^b	169
Total	-	-	701

Números seguidos de letras diferentes na mesma coluna diferem-se estatisticamente entre si ($p < 0,001$).

Letras diferentes indicam que a taxa de fecundados diferem-se estatisticamente entre si ($p < 0,001$).

Figura 17 - Taxa de fecundação *in vitro* de oócitos de fêmeas submetidas à terapia intraperitoneal com bloqueadores de canais de cálcio por 30 dias.

Com relação ao comportamento dos grânulos corticais, não houve diferença entre os grupos pela técnica de coloração utilizada, visualizando-se a extrusão dos grânulos corticais nos oócitos fecundados e a presença dos grânulos em toda a periferia da membrana plasmática nos oócitos não fecundados.

Comparando-se os resultados dos testes de fertilidade *in vivo* (prenhez), via oral (item 4.2.1.1) e via intraperitoneal (item 4.2.2.1), e *in vitro* (FIV), via oral (item 4.2.1.2) e via intraperitoneal (4.2.2.2), as taxas de fertilidade *in vivo* x *in vitro* entre cada grupo experimental não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$), exceto no grupo nifedipina, onde as taxas de fertilidade *in vitro* pela via oral (79,3%) e pela via intraperitoneal (61,9%) diferiram estatisticamente ($p = 0,0053$) entre si.

4.3 EXPERIMENTO III - DOSAGEM DE CÁLCIO INTRACELULAR EM OÓCITOS

A dosagem de cálcio intracelular em oócitos teve como objetivo verificar se os antagonistas de canais de cálcio bloqueiam a entrada do íon cálcio do meio extracelular para dentro do oócito.

O grupo controle mostrou concentrações médias de cálcio intracelular em oócitos superiores estatisticamente ($p < 0,05$) quando comparado aos tratamentos verapamil (Figura 18), nifedipina (Figura 19) e diltiazem (Figura 20).

Os bloqueadores de canais de íons cálcio voltagem-dependentes utilizados reduziram a resposta celular ao cálcio exógeno, impedindo a sua entrada no oócito.

A seguir estão apresentados os gráficos obtidos das concentrações médias de cálcio intracelular (nM) em oócitos durante o tempo (s) nos grupos experimentais:

Figura 18 - Concentrações médias do cálcio intracelular (nM) em oócitos nos grupos controle e verapamil por 300 segundos.

A concentração média de cálcio intracelular no grupo controle em todos os tempos foi de 94,56nM e no grupo verapamil foi de 19,45nM.

Figura 19 - Concentrações médias do cálcio intracelular (nM) em oócitos nos grupos controle e nifedipina por 300 segundos.

A concentração média de cálcio intracelular no grupo controle em todos os tempos foi de 94,89nM e no grupo nifedipina foi de 32,51nM.

Figura 20 - Concentrações médias do cálcio intracelular (nM) em oócitos nos grupos controle e diltiazem por 300 segundos.

A concentração média de cálcio intracelular no grupo controle em todos os tempos foi de 134,38nM e no grupo diltiazem foi de 66,36nM.

Todos os bloqueadores de canais de íons cálcio reduziram a resposta celular ao cálcio exógeno.

5 DISCUSSÃO

Não foram encontrados na literatura trabalhos específicos sobre os tipos de canais de cálcio existentes na membrana plasmática de oócitos como foi descrito em espermatozóides. Há apenas algumas pesquisas *in vitro* envolvendo farmacologia, que consiste em expor a célula a bloqueadores de canais de cálcio voltagem-dependentes, por exemplo, o verapamil, a nifedipina e o diltiazem, conhecidos como do tipo-*L* (JANIS; SILVER; TRIGGLE, 1987), para se estudar algumas funções do cálcio nos eventos de maturação e de fecundação. Porém, não há descrições sobre a influência dos antagonistas na fertilidade de oócitos *in vivo*.

No entanto, baseando-se na revisão de literatura referente às células espermáticas de mamíferos, não há um consenso sobre qual ou quais canais de cálcio voltagem-dependentes estão realmente envolvidos na capacitação e na reação acrossomal e, ainda, criou-se uma dúvida sobre a sensibilidade e a seletividade dos bloqueadores de cálcio utilizados, quanto a sua atuação no tipo de canal de íon cálcio, como também na sua concentração (ARNOULT et al., 1996; ARNOULT; VILLAZ; FLORMAN, 1998; BENNOFF et al., 1994; BENOFF, 1998; DARSZON et al., 1999; DARSZON et al., 2001; ESPINOSA et al., 1999, FLESH; GARDELLA, 2000; FLORMAN et al., 1998; GOODWIN et al., 2001, JAGANNATHAN; PUBLICOVER; BARRATT, 2002; LIÉVANO et al., 1996; SANTI; DARSZON; HERNÁNDEZ-CRUZ, 1996; SON; LEE; HAN, 2000; WASSARMAN, 1999), porém, não foram encontrados estudos nestes aspectos em oócitos.

Embora os bloqueadores de canais de cálcio sejam empregados com sucesso em doenças cardiovasculares e hipertensão arterial, há fortes evidências de que eles exerçam suas ações em outras células que possuem canais de cálcio voltagem-dependentes, influenciando a

entrada de cálcio (JANIS; SILVER; TRIGGLE, 1987) e podendo prejudicar a fisiologia destas células.

A discussão dos resultados obtidos será exposta da seguinte maneira:

- (I) Tratamento *in vitro* dos oócitos com bloqueadores de canais de cálcio e (III) Dosagem de cálcio intracelular em oócitos; e
- (II) Tratamento *in vivo* das fêmeas hamsters com bloqueadores de canais de cálcio.

Como discussão geral, também será realizada uma interação entre os resultados encontrados nos três experimentos.

5.1 EXPERIMENTOS I E III - TRATAMENTO *IN VITRO* DOS OÓCITOS COM BLOQUEADORES DE CANAIS DE CÁLCIO E DOSAGEM DE CÁLCIO INTRACELULAR

No Experimento I, os oócitos colhidos foram submetidos ao tratamento *in vitro* com os bloqueadores verapamil (10 μ M, 100 μ M, 2mM e 4mM), nifedipina (10 μ M, 100 μ M, 500 μ M e 1mM) e diltiazem (10 μ M, 100 μ M, 2mM e 4mM), 30 minutos antes da fecundação *in vitro*. Os efeitos dos bloqueadores de canais de cálcio voltagem-dependentes em oócitos foram avaliados quanto à fertilidade e à capacidade de realizar a exocitose dos grânulos corticais. Já, no Experimento III, verificou-se a influência dos bloqueadores (50 μ M) no influxo de cálcio extracelular em oócitos.

Vale ressaltar que, a nifedipina não pôde ser utilizada em maiores concentrações, como nos outros fármacos, dada sua solubilidade ser em álcool, mas se saturando em pouca quantidade. Como o álcool promove a ativação oocitária, preocupou-se em limitar a

concentração alcoólica final em 0,5% no meio, a qual é insuficiente para induzir este processo.

A presença dos bloqueadores de canais de cálcio em tratamentos *in vitro* influenciou negativamente a fecundação no Experimento I, como também o influxo de cálcio no III. As diferenças do íon cálcio livre no citosol, encontradas no experimento III, entre o grupo controle e os tratados foram de: 75,11nM no grupo do verapamil, 63,38nM da nifedipina e 68,02nM do diltiazem, mostrando que os bloqueadores de canais de cálcio voltagem-dependentes do tipo-*L* reduziram significativamente o influxo do cálcio exógeno para o oócito.

Da mesma forma, vários pesquisadores (LANE; BAVISTER, 1998; SHIINA et al., 1993; TOSTI; BONI; CUOMO, 2000; VOGEL et al., 1999) também observaram que os bloqueadores de canais de cálcio voltagem-dependentes interferiram no influxo de cálcio no oócito.

Desde o início da vida, a fecundação e o desenvolvimento embrionário são regulados pelo cálcio (BOOTMAN et al., 2001). Sabe-se que o cálcio está envolvido na exocitose dos grânulos corticais para o bloqueio da polispermia (reação cortical), na ativação, na retomada da meiose pelo oócito, na formação dos pronúcleos e no término da segunda divisão meiótica, com a extrusão do segundo corpúsculo polar para o espaço perivitelíneo (controle da progressão do ciclo celular) e com a clivagem do embrião (ABBOTT; DUCIBELLA, 2001; ALBERTS et al., 2002; BOS-MIKICH; WHITTINGHAM; JONES, 1997; CRAN; ESPER, 1990; KLINE; KLINE, 1990; MIYAZAKI, 1990; SUN, 2003; WASSARMAN; ALBERTINI, 1994; WESSEL et al., 2001; WHITE; YUE, 1996). Ainda, Lane e Bavister (1998) observaram que a concentração de cálcio intracelular nos embriões 3, 6 e 9 horas pós-fertilização foi de 256,0nM, 161,2nM e 134,1nM, respectivamente, indicando a importância do cálcio logo após a fecundação.

É descrito na literatura que, com o estímulo (espermatozóide), o íon cálcio aumenta no citoplasma de duas maneiras: pela liberação dos estoques intracelulares ou pela entrada do íon através da membrana plasmática, podendo ocorrer simultaneamente ou sequencialmente (PUTNEY et al., 2001). Há três teorias para a sinalização do aumento de cálcio intracelular no oócito durante a fecundação: (I) o espermatozóide atua como um canal de entrada de cálcio durante sua penetração (SWANN; PARRINGTON, 1999); (II) o espermatozóide age sobre receptores da membrana plasmática do oócito para produzir IP_3 (ALBERTS et al., 2002; BOOTMAN et al., 2001; CIAPA; CHIRI, 2000; MIYAZAKI, 1990; MIYAZAKI et al., 1993; WASSARMAN; ALBERTINI, 1994; WHITE; YUE, 1996; SWANN; PARRINGTON, 1999); e/ou (III) o espermatozóide introduz um fator no oócito que induz a produção de IP_3 (SWANN; PARRINGTON, 1999; WASSARMAN; ALBERTINI, 1994; WHITE; YUE, 1996).

Os oócitos dos grupos tratados *in vitro* com verapamil, nifedipina ou diltiazem apresentaram menor taxa de fecundação, que foi dependente da concentração do fármaco utilizado. Provavelmente, os bloqueadores de canais de cálcio voltagem-dependentes reduziram o influxo de cálcio intracelular, pois a elevação deste íon no citosol e suas oscilações são necessárias e muito importantes para que ocorra a fertilização (ABBOTT; DUCIBELLA, 2001; KLINE, 2000; MILLER et al., 1993; WESSEL et al., 2001; SUN, 2003; WANG; DAY; WU, 2003). Blancato e Seyler (1990) também observaram que o influxo de cálcio foi bloqueado pelo diltiazem durante a fecundação e a clivagem embrionária em murinos, concluindo que este influxo foi importante para uma fertilização normal e para o início do desenvolvimento embrionário.

Por outro lado, os antagonistas também podem ter interferido na indução e/ou formação do IP_3 e, conseqüentemente, na liberação de cálcio dos estoques intracelulares, pois se sabe que o cálcio liberado em forma de ondas para o citosol é originado de estoques

intracelulares (retículo endoplasmático) que possuem receptores operados por IP_3 (ALBERTS et al., 2002; BERRIDGE, 1993; BOOTMAN et al., 2001; CIAPA; CHIRI, 2000; MIYAZAKI, 1990; MIYAZAKI, 1991; MIYAZAKI et al. 1992; MIYAZAKI et al., 1993; WASSARMAN; ALBERTINI, 1994; WHITE; YUE, 1996).

Bootman et al. (2001) e Miyazaki et al. (1993) relataram que a frequência da oscilação do cálcio no oócito é influenciada pela resposta celular. Portanto, os bloqueadores de canais de cálcio podem também ter alterado a fluidez e a estrutura da membrana plasmática do oócito, como é descrito em espermatozóides (ANAND, KANWAR; SANYAL, 1994; BENOFF et al., 1994), como também, da zona pelúcida. Isto pode implicar em: alteração dos sítios de ligação (ZP_1 , ZP_2 e ZP_3) presentes na zona pelúcida, e com isso, não induzindo a reação acrossomal, a ligação e a penetração do espermatozóide, conseqüentemente a não fecundação; e/ou modificação da membrana plasmática, impedindo a ativação da proteína G e da cascata do inositol, não produzindo, portanto, IP_3 para a liberação de cálcio dos estoques intracelulares. Embora Sun et al. (1994) tenham relatado a existência de estoques intracelulares independentes de IP_3 em oócitos de bovinos.

Acredita-se que, na maioria das espécies de mamíferos, a zona pelúcida seja a principal estrutura para o bloqueio à polispermia, pois, ainda não foi comprovada a importância da despolarização da membrana neste processo, como é em invertebrados (ALBERTS et al., 2002; ABBOTT; DUCIBELLA, 2001; CHERR; DROBNIS; KATZ, 1988; DUCIBELLA, 1996; WESSEL et al., 2001; WANG; DAY; WU, 2003).

No Experimento I, observou-se que a taxa de polispermia elevou-se com os antagonistas nifedipina a 500 μ M e a 1mM, verapamil a 2mM (sem descondensação do espermatozóide) e diltiazem a 10 μ M, 100 μ M, 2mM e 4mM (com e sem descondensação do espermatozóide). Segundo Miller et al. (1993), Hoodbhoy e Talbot (1994), Sun (2003), Wessel et al. (2001) e Wang, Day e Wu (2003), o bloqueio da polispermia é dependente da

oscilação de cálcio intracelular induzida por IP_3 , onde, se alguma falha ocorre no mecanismo da reação cortical ou zonal, resulta na penetração de dois ou mais espermatozóides no oócito.

Os grânulos corticais de oócitos não fecundados do grupo nifedipina apresentaram-se menos corados com *Lens cullinaris*, provavelmente, pela nifedipina ter influenciado na permeabilidade do oócito ao corante, mesmo após o tratamento com Triton-X; já nos oócitos fecundados, esta técnica de coloração não possibilitou detectar nenhuma alteração causada pelo tratamento do antagonista de cálcio em comparação ao grupo controle.

Nos oócitos tratados com os bloqueadores verapamil e diltiazem houve um evento que se caracterizou como: penetração de um ou mais espermatozóides no oócito, porém estes não se descondensaram para formar o pronúcleo masculino, a cromatina do oócito manteve-se em metáfase, não completando a meiose II (formação do pronúcleo feminino e liberação do segundo corpúsculo polar) e, a exocitose dos grânulos corticais ocorreu de forma parcial, apresentado-se em grumos (*clusters*). Na literatura pertinente não foi encontrado nenhum relato semelhante ao descrito. Portanto, com base na fisiologia, pode-se deduzir que o espermatozóide induziu a formação do IP_3 , havendo a liberação de cálcio dos estoques intracelulares, que iniciou a exocitose dos grânulos corticais de maneira suficiente ou não para o bloqueio da polispermia. Porém, este cálcio liberado do retículo endoplasmático não foi o bastante para promover a retomada da progressão do ciclo celular, permanecendo o oócito em metáfase II da meiose II, pois a entrada de cálcio do meio extracelular estava bloqueada pelos antagonistas.

Segundo Kline (2000), as oscilações de cálcio em camundongos e hamsters também são dependentes de cálcio extracelular, pois, quando ocorre depleção dos estoques de cálcio intracelulares nas primeiras ondas pós-fertilização, há a indução da entrada de cálcio capacitativa, ou seja, do meio extra para o intracelular.

Explicando mais detalhadamente este evento de penetração sem descondensação do espermatozóide e não ativação do oócito, houve a exocitose dos grânulos corticais, mesmo que parcial, porque uma das primeiras reações desencadeadas por este íon é a exocitose dos grânulos corticais (ABBOTT; DUCIBELLA, 2001; DUCIBELLA et al., 1993; MILLER et al., 1993; WESSEL et al., 2001; SUN, 2003; WANG; DAY; WU, 2003). E ainda, há indícios que a elevação do cálcio intracelular ative a proteína calmodulina-dependente quinase II (CaMKII) que participa da indução da exocitose dos grânulos corticais (SUN, 2003).

A não retomada da meiose II pelo oócito fecundado pode ser explicada pelos seguintes fatos: a reativação oocitária é dependente da elevação de cálcio intracelular e, se inibida, o oócito não consegue se ativar por outra via (KLINE, 2000); há suposições que a propagação das ondas de cálcio pelo oócito são necessárias para a completa inativação do fator promotor de metáfase (MPF) e dos fatores citostáticos, substâncias que mantêm o oócito em metáfase II *arrest* (KLINE, 2000); a elevação do cálcio ativa a CaMKII que tem como funções a inativação do MPF e dos fatores citostáticos (DUPONT, 1998, NIXON; MCDUGALL; JONES 2000; SUN, 2003).

Shiina et al. (1993), em oócitos de murinos tratados *in vitro* com verapamil ou nifedipina, demonstraram que as oscilações de cálcio intracelular responsáveis pela extrusão do segundo corpúsculo polar estão relacionadas aos estoques internos e ao influxo de cálcio do meio extra para o intracelular, e estes foram dependentes da concentração dos fármacos. Desta forma, comparando-se os resultados dos experimentos com oócitos de hamsters, a liberação do segundo corpúsculo polar não ocorreu nos grupos tratados com o verapamil e o diltiazem, igualmente de forma dose-dependente, também ficando bloqueado o influxo de cálcio extracelular. No entanto, Tosti, Boni e Cuomo (2000) relataram, em bovinos, que a atividade dos canais de cálcio da membrana plasmática se reduzem com a maturação,

tornando o cálcio do estoque intracelular o mais importante para a fecundação e a ativação oocitária nesta espécie.

As oscilações de cálcio pelo citosol do oócito são necessárias para induzir a formação dos pronúcleos (descondensação da cromatina) e a liberação do segundo corpúsculo polar. Para isso, o MPF deve ser inativado (YANAGIMACHI, 1994), provavelmente pela CaMKII que apresenta indícios de estar envolvida neste processo (SUN, 2003). Ducibella e LeFevre (1997) bloqueando a PKC em oócitos, a exocitose dos grânulos corticais ocorreu normalmente e a transição metáfase-anáfase foi apenas temporariamente inibida, concluindo que outro efeito cálcio-dependente deva estar envolvido neste evento biológico, contradizendo Bootman et al. (2001) e Janis, Silver e Triggle (1987) que relataram a importância da PKC no controle da oscilação de cálcio no oócito.

É referido na literatura que, quando há depleção de cálcio nos estoques intracelulares, há necessidade da entrada de cálcio extracelular (entrada de cálcio capacitativa) através da membrana plasmática do oócito para continuar as oscilações deste íon durante a fecundação, podendo a abertura dos canais de cálcio presentes na membrana plasmática ser regulados fisiologicamente pelo próprio IP_3 , ou outro sinalizador de cálcio indutor de influxo de cálcio (KLINE, 2000; PUTNEY, 1997; PUTNEY et al., 2001). Por outro lado, a ativação de oócitos pode ser cessada por componentes que interferem na responsividade dos canais de íons para a elevação de cálcio dos estoques intracelulares (DARSON; LIÉVANO; BELTRÁN, 1996). Provavelmente, nos oócitos tratados no Experimento I, não houve reposição do estoque intracelular de cálcio, pelo fato dos canais deste íon da membrana plasmática estarem bloqueados pelos antagonistas de canais de cálcio voltagem-dependentes do tipo-L, demonstrado no experimento III.

Se os bloqueadores de canais de cálcio causaram alguma modificação na estrutura da membrana plasmática do oócito, isto, possivelmente, pode ter levado também a alterações do

mecanismo de auto-regulação para evitar a citotoxicidade do íon cálcio. Esta auto-regulação é um evento fisiológico relatado por Alberts et al. (2002), Bootman et al. (2001), Miyazaki (1990), Miyazaki et al. (1993), Pepperell et al. (1999), Wassarman e Albertini (1994) e White e Yue (1996). Portanto, altas concentrações de cálcio prejudicam a organização dos fusos, afetando a formação dos pronúcleos e, conseqüentemente, a clivagem (WASSARMAN; ALBERTINI, 1994; WHITE; YUE, 1996).

Os resultados encontrados nos oócitos de hamsters tratados *in vitro* com os bloqueadores de canais de cálcio voltagem-dependentes (Experimento I) podem ser comparados aos achados de Raz, Ben-Yosef e Shalgi (1998) em oócitos de murinos maturados *in vitro* e ativados artificialmente, onde os não completamente maturados apresentaram menores concentrações intracelulares de cálcio e liberação parcial dos grânulos corticais; já os de maturação completa, as concentrações internas de cálcio foram mais altas, ocorrendo normalmente a reação cortical, a retomada da meiose e a ativação do ciclo celular. Em analogia aos fatos ocorridos, pode-se considerar que os oócitos de hamsters tratados com os antagonistas de cálcio se comportaram de maneira semelhante aos de camundongos com maturação incompleta e, o grupo controle, aos oócitos com maturação e ativação completa.

Tosti, Boni e Cuomo (2000) mostraram a existência de canais de cálcio voltagem-dependentes do tipo-*L* em oócitos de invertebrados aquáticos e de mamíferos. Portanto, pode-se dizer que os bloqueadores de canais de cálcio voltagem-dependentes do tipo-*L*, em tratamento *in vitro* de oócitos de hamsters, atuaram nestes canais presentes na membrana plasmática, afetando os eventos dependentes do íon cálcio.

Alguns experimentos *in vitro* mostraram a influência negativa dos bloqueadores de canais de cálcio voltagem-dependentes do tipo-*L* (IANCHII et al., 2000; KITAI et al., 1985; PALEOS; POWERS, 1981; PALEOS; POWERS, 1982; TOSTI; BONI; CUOMO, 2000) e antagonistas de canais do tipo-*T* (HOUTSULIAK; BERDYIEVA; LIBERT, 2002) durante a

maturação oocitária, a liberação do primeiro corpúsculo polar e na quebra da vesícula germinativa. Portanto, pode se considerar que os oócitos necessitam dos canais de cálcio presentes na membrana para efetuar eventos relacionados ao íon cálcio.

No Experimento III, a presença dos bloqueadores de canais de cálcio interferiu na resposta à adição de cálcio extracelular, refletida na sua concentração intracelular. Este pode ser comparado aos achados de Lane e Bavister (1998), onde oócitos, após três horas da fecundação *in vivo* e permanecendo em cultivo com verapamil ou nifedipina por seis horas, apresentaram quantidades de cálcio intracelular inferiores às do grupo controle. Desta forma, os antagonistas bloquearam os canais de cálcio voltagem-dependentes do tipo-*L* e, ainda, esta menor concentração de cálcio intracelular poderia alterar o desenvolvimento embrionário inicial, pois os canais do tipo-*L* participam também da homeostase de cálcio no embrião.

Os bloqueadores de canais de cálcio atuaram negativamente na taxa de fecundação e na exocitose dos grânulos corticais, de forma dose-dependente, e na resposta ao cálcio extracelular, onde os antagonistas verapamil e diltiazem apresentaram maiores efeitos no oócito em relação à nifedipina, como também relatado por Lane e Bavister (1998), Shiina et al. (1993) e Tosti, Boni e Cuomo (2000).

Em resumo, baseado na literatura e nos resultados encontrados nos Experimentos I e III, os mecanismos de fecundação são dependentes de cálcio e mostram que há a necessidade do cálcio extracelular para completar seus estoques intracelulares utilizando-se de canais de cálcio voltagem-dependentes presentes na membrana plasmática, sendo estes do tipo-*L* sensíveis ou não às diidropiridinas ou do tipo-*T*, dependendo da espécie.

5.2 EXPERIMENTO II - TRATAMENTO *IN VIVO* DAS FÊMEAS COM BLOQUEADORES DE CANAIS DE CÁLCIO

Neste experimento, testou-se a fertilidade *in vivo* e *in vitro* de fêmeas hamsters submetidas à terapia com bloqueadores de canais de cálcio, via oral ou intraperitoneal, por 30 dias e por mais oito dias durante o período de acasalamento.

Como não está relatado na literatura uma dose efetiva dos bloqueadores de canais de cálcio em hamsters, optou-se por realizar a administração tanto pela via oral como pela intraperitoneal, devido ao relato de que em humanos, estes fármacos podem levar de cinco a sete horas para serem absorvidos pela via oral (JANIS; SILVER; TRIGGLE, 1987).

A taxa de fertilidade *in vivo* (prenhez) e o número de filhotes por ninhada não diferiram entre os grupos tanto na administração por via oral quanto na intraperitoneal dos fármacos, exceto o grupo nifedipina intraperitoneal que apresentou menor taxa de fecundação e o grupo do verapamil oral com menor número de filhotes nascidos por ninhada. Neste caso, notou-se que a terapia anti-hipertensiva não afetou a fecundidade das fêmeas hamsters (exceto a nifedipina intraperitoneal) nem a prolificidade (exceto o verapamil oral), pois todas foram concebidas e pariram. Com relação aos resultados, não foram encontrados na literatura experimentos ou relatos semelhantes que pudessem esclarecer os fatos ocorridos.

No entanto, os filhotes nascidos de fêmeas tratadas por via intraperitoneal apresentaram maior taxa de mortalidade e menor peso aos 20 dias do nascimento. Isto ocorreu com maior intensidade nas fêmeas que emprenharam nos primeiros dias do período de acasalamento, pois receberam o bloqueador de canal de cálcio durante quase metade da gestação; as que foram fecundadas somente após o quinto dia, não foram notadas estas alterações na ninhada. Efeitos teratogênicos semelhantes dos antagonistas de canais de cálcio

também foram encontrados por Burghess e Vere (1989) em embriões de *Xenopus* cultivados *in vitro* e Chihama et al. (1998) que administraram estes fármacos em ratas prenhes no período de 7 a 17 dias de gestação.

Os efeitos teratogênicos da terapia de canais de cálcio relatados na literatura são vários: anormalidades no desenvolvimento, principalmente no tamanho fetal, no sistema nervoso central (proencéfalo), no intestino e na mandíbula, malformações cardíacas, menor peso corporal, crescimento retardado, mortalidade neonatal, entre outros (BURGHESS; VERE, 1989; CHIHAMA et al., 1998). Alguns defeitos congênitos são associados ao metabolismo de cálcio (FARRAR; BLUMER, 1991).

Ainda, em humanos, Magee et al. (1996) relataram uma tendência para maior mortalidade e 3% com malformações, porém não foi atribuído aos fármacos. Também observaram aumento de partos prematuros e redução do peso ao nascimento, concluindo que há riscos teratogênicos causados pela terapia anti-hipertensiva, mas estes podem ser atribuídos a outras doenças maternas. Entretanto, Koren et al. (1989) atribuíram as malformações fetais aos bloqueadores de canais de cálcio em mulheres expostas a estes fármacos no primeiro trimestre de gravidez.

As conseqüências da terapia dos bloqueadores de canais de cálcio do tipo-*L* em hamsters notadas foram: letargia, incoordenação motora, alta taxa de mortalidade, menor peso médio aos 20 dias de nascimento e uma grande diversidade de tamanho entre irmãos e entre ninhadas. Estes efeitos teratogênicos podem ser explicados por Farrar e Blumer (1991) pelo fato destes antagonistas de cálcio atravessarem a placenta, sendo, portanto, um risco durante a organogênese, onde os canais do tipo-*L* participam da homeostase de cálcio no embrião (LANE; BAVISTER, 1998). Ainda, Li et al. (2003) relataram que estes bloqueadores do tipo-*L* comprometem a formação óssea, pois, o evento fisiológico do estímulo do PTH no osteoblasto para a elevação da concentração de cálcio intracelular é dependente de canais de

cálcio voltagem-dependentes do tipo-L. Segundo Bootman et al. (2001), o cálcio é um segundo mensageiro intracelular universal, que regula numerosos fenômenos celulares fisiológicos, mas também pode desencadear e participar de eventos patológicos que levam à injúria celular, tanto na escassez como em excesso.

Com relação à fecundação *in vitro*, houve menor taxa de fertilização nos oócitos expostos *in vivo* aos bloqueadores administrados por via oral ou intraperitoneal, mas não apresentaram alterações na exocitose dos grânulos corticais, nem na formação dos pronúcleos ou extrusão do segundo corpúsculo polar. Na análise das eletronicografias, também não houve alterações aparentes no citoplasma, grânulos corticais, retículo endoplasmático, membrana plasmática e zona pelúcida.

Esta não fecundação *in vitro* dos oócitos do Experimento II pode ser devido aos bloqueadores de canais de cálcio terem influenciado a maturação oocitária, a liberação do primeiro corpúsculo polar e a quebra da vesícula germinativa (HOUTSULIAK; BERDYIEVA; LIBERT, 2002; IANCHII et al., 2000; KITAI et al., 1985; PALEOS; POWERS, 1981; PALEOS; POWERS, 1982; TOSTI; BONI; CUOMO, 2000). Porém, no momento da colheita dos oócitos (ovulação estimulada por LH exógeno), o primeiro corpúsculo polar estava presente e, ao se avaliar a fecundação e a exocitose dos grânulos corticais, não se notou indícios de oócitos imaturos.

Embora a taxa de fertilidade *in vivo* não tenha apresentado diferenças significativas entre os grupos (exceto nifedipina intraperitoneal) e, as taxas de fecundação *in vitro* das fêmeas tratadas sejam estatisticamente diferentes do grupo controle, esta aparente diferença entre as provas *in vivo* e *in vitro* não foi confirmada pela estatística, pois, ao se testar dentro de cada grupo (bloqueador) a fertilidade (via oral) *in vivo* x *in vitro* x fertilidade (via intraperitoneal) *in vivo* x *in vitro*, não houve diferenças entre os tipos de avaliação da fertilidade, exceto entre as taxas de FIV oral x FIV intraperitoneal no grupo da nifedipina.

Nas fêmeas hamsters tratadas, a taxa de fertilidade *in vivo* não apresentou diferença entre os grupos, porém, na fertilidade *in vitro*, houve uma superioridade do grupo controle em relação aos tratados. Isto pode ser devido ao sistema biológico (oviduto) proporcionar vias alternativas para os processos relacionados à fecundação, o mesmo não ocorrendo no sistema *in vitro* (FIV).

Embora a taxa de fertilidade *in vivo* do grupo da nifedipina intraperitoneal e a quantidade de filhotes nascidos no grupo verapamil oral tenham sido menores estatisticamente que seus controles, este fato também pode ser atribuído a alterações fisiológicas adversas na homeostase causadas pelos fármacos, comprometendo indiretamente a reprodução. Além disso, estes resultados não se repetiram na outra forma de administração dos antagonistas de cálcio.

Sabe-se que o cálcio está envolvido em atividade secretória de glândulas, alguns pesquisadores (BARBARINO; MARINIS, 1980; FLECKENSTEIN, 1977; JANIS; SILVER; TRIGGLE, 1987) relataram uma possível influência negativa dos bloqueadores de canais de cálcio quanto à atividade do hipotálamo e da hipófise na função hormonal reprodutiva; porém, outros autores (STRUTHERS et al., 1983; VELDHUIS et al., 1985) não encontraram alterações. Já, Tsang e Carnege (1984) demonstraram que a produção de progesterona pelas células da granulosa em cultivo foi reduzida na presença do verapamil. Mesmo não sendo o objetivo deste trabalho, não foi notada nenhuma alteração nas fêmeas hamsters submetidas à terapia oral ou intraperitoneal com bloqueadores de canais de cálcio quanto à quantidade de oócitos ovulados, com estímulo hormonal (fecundação *in vitro*) ou não (acasalamento), exceto no grupo do verapamil (via oral), onde houve redução do número de filhotes nascidos, e no grupo da nifedipina (via intraperitoneal) que apresentou menor fertilidade *in vivo*, podendo estes resultados ser explicados por falha de produção hormonal.

Em resumo, os bloqueadores de canais de cálcio do tipo-*L* afetaram a fecundação de oócitos de hamsters tratados *in vitro*, e não a alteraram nos tratados *in vivo*. Nos Experimentos I e III, foi confirmada a presença de canais de cálcio voltagem-dependentes sensíveis aos antagonistas de cálcio do tipo-*L* utilizados. Porém, no Experimento II isto não pôde ser relatado, pois, os bloqueadores não afetaram a fertilidade. Uma possibilidade de explicação aos fatos encontrados pode ser devido aos bloqueadores, durante a terapia, não agirem nos ovários ou não estarem em concentrações suficientes neste órgão para levar a alterações. No entanto, atuaram no útero no início da gestação, pois causaram efeitos teratogênicos.

Kitai et al. (1985) notaram, em ovários de coelhos perfundidos com verapamil e LH, que houve redução da taxa de ovulação e da maturação oocitária, inibição na contração da musculatura lisa ovariana durante a perfusão, mesmo esta não sendo essencial para a ovulação. Comparando este experimento *in vitro* com o *in vivo* do Experimento II, não se notou alteração na ovulação nem na maturação, novamente colocando em dúvida se os bloqueadores atuam e/ou são distribuídos neste sítio; ainda, vale lembrar que a taxa de fecundação não foi afetada, nem o processo de capacitação e de reação acrossomal realizado pelos espermatozóides dentro destas fêmeas tratadas.

Os resultados dos Experimentos I e III se complementam, porém, não conseguem explicar os eventos encontrados no Experimento II.

Respostas também podem ser encontradas com os relatos de Janis, Silver e Triggle (1987), onde a ação do bloqueador de canal de cálcio voltagem-dependente é influenciada: quando a mobilização de cálcio para o efeito fisiológico da célula é de origem intra ou extracelular; pelo tipo de canal de cálcio envolvido na célula; pelo tempo e frequência de despolarização da membrana plasmática; pelos fatores farmacodinâmicos (absorção, metabolização e biodistribuição); pelos efeitos não específicos; pelo estado patológico (alteração de despolarização da membrana); e pela homeostase.

6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados observados nos experimentos, tendo em vista a metodologia e análise empregadas, pode-se concluir que:

- 1) Nos tratamentos *in vitro*, os bloqueadores de canais de cálcio voltagem-dependentes atuaram negativamente na fecundação *in vitro*.
- 2) Houve influência das concentrações utilizadas de verapamil, nifedipina e diltiazem nos parâmetros estudados no tratamento *in vitro*.
- 3) Os bloqueadores de canais de cálcio voltagem-dependentes inibiram a passagem do íon cálcio do meio extracelular para o intracelular, mostrando sua influência e possível bloqueio nos eventos biológicos dependentes de cálcio nos oócitos.
- 4) A membrana plasmática de oócitos de hamsters possui canais de cálcio voltagem-dependentes sensíveis ao verapamil, à nifedipina e ao diltiazem.
- 5) Nos tratamentos *in vitro* dos grupos verapamil e diltiazem, houve estímulo do espermatozóide na fecundação, iniciando a exocitose dos grânulos corticais, porém a ativação não conseguiu ser completa por falta de cálcio intracelular.

- 6) Em oócitos de hamsters o cálcio extracelular é necessário para completar os eventos envolvidos durante a fecundação.
- 7) Os experimentos não puderam apontar em qual tipo de canal de cálcio voltagem-dependente os fármacos atuaram, porém se notou que o verapamil e o diltiazem foram mais severos no bloqueio do influxo de cálcio e nos testes de fecundação *in vitro*.
- 8) A terapia com bloqueadores de canais de cálcio voltagem-dependentes não influenciou a fertilidade de fêmeas hamsters.
- 9) A administração de bloqueadores de canais de cálcio voltagem-dependentes no início da gestação causou efeitos teratogênicos.
- 10) O sistema biológico e a metodologia utilizada foram considerados satisfatórios para se testar a influência dos bloqueadores de canais de cálcio voltagem-dependentes sobre a fertilidade feminina.

REFERÊNCIAS ¹

ABBOTT, A. L.; DUCIBELLA, T. Calcium and the control of mammalian cortical granule exocytosis. **Frontiers in Bioscience**, v. 6, p. d792-d806, July, 2001.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RALFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular biology of the cell**, 4. ed., New York: Garland Science, 2002. 1463 p.

ANAND, R. J. K.; KANWAR, U.; SANYAL, S. N. Calcium channel antagonist verapamil modulates human spermatozoal functions. **Research Experimental Medicine**, v. 194, n. 3, p. 165-178, 1994.

ARNOULT, C.; CARDULLO, R. A.; LEMOS, J. R.; FLORMAN, H. M. Activation of mouse sperm T-type Ca^{2+} channels by adhesion to the egg zona pellucida. **Proceeding National Academic Science USA**, v. 93, p. 13004-13009, Nov., 1996.

ARNOULT, C.; KAZAM, I. G.; VISCONTI, P. E.; KOPF, G. S.; VILLAZ, M.; FLORMAN, H. M. Control of the low voltage-activated calcium channel of mouse sperm by egg ZP_3 and by membrane hyperpolarization during capacitation. **Proceeding National Academic Science USA**, v. 96, p. 6757-6762, June, 1999.

ARNOULT, C.; VILLAZ, M.; FLORMAN, H. M. Pharmacological properties of the T-type Ca^{2+} current of mouse spermatogenic cells. **Molecular Pharmacology**, v. 53, p. 1104-1111, 1998.

ARNOULT, C.; ZENG, Y.; FLORMAN, H. M. ZP_3 -dependent activation of sperm cation channels regulates acrossomal secretion during mammalian fertilization. **Journal of Cell Biology**, v. 134, n. 3, p. 637-645, 1996.

ASHIZAWA, K.; HASHIGUHI, A.; TSUZUKI, Y. Intracellular free Ca^{+2} concentration in fowl spermatozoa and its relationship to motility and respiration in spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 96, p. 395-405, 1992.

¹ Conforme as diretrizes para apresentação de dissertações e teses na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. 4 ed. São Paulo: FMVZ-USP, 2003. 84p.

BABCOCK, D. F.; PFEIFFER, D. R. Independent elevation of cytosolic $[Ca^{2+}]$ and pH of mammalian sperm by voltage-dependent and pH sensitive mechanisms. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 31, p. 15041-15047, 1987.

BALDI, E.; LUCONI, M.; BONACCORSI, L.; KRAUSZ, C.; FORTI, G. Human sperm activation during capacitation and acrosome reaction: role of calcium, protein phosphorylation and lipid remodeling pathways. **Frontiers in Bioscience**, v. 1, p. d189-d205, Aug., 1996.

BARBARINO, A.; MARINIS, L. Calcium antagonists and hormone release. II. Effects of verapamil on basal, gonadotropin-releasing hormone and thyrotropin-releasing hormone-induced pituitary hormone release in normal subjects. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 51, n. 4, p. 749-753, 1980.

BAVISTER, B. D. A consistently successful procedure for *in vitro* fertilization of golden hamster eggs. **Gamete Research**, v. 23, p. 139-158, 1989.

BENOFF, S.; COOPER, G. W.; HURLEY, I.; MANDEL, F. S.; ROSENFELD, D. L.; SCHOLL, G. M.; GILBERT, B. R.; HERSHLAG, A. The effect of calcium ion channels blockers on sperm fertilization potential. **Fertility and Sterility**, v. 62, n. 3, p. 606-617, 1994.

BENOFF, S. Voltage dependent calcium channels in mammalian spermatozoa. **Frontiers in Bioscience**, v. 3, p. d1220-d1240, Dec., 1998.

BERRIDGE, M. J. Inositol trisphosphate and calcium signaling. **Nature**, v. 361, p. 315-325, Jan., 1993.

BLANCATO, J. K.; SEYLER, D. E. Effect of calcium-modifying drugs on mouse *in vitro* fertilization and preimplantation development. **International Journal of Fertility**, v. 35, n. 3, p. 171-176, 1990. Disponível em <<http://www.periodicos.capes.org.br>>. Acesso em: 20 ago. 2003. Summary.

BOOTMAN, M. D.; COLLINS, T. J.; PEPPIATT, C. M.; PROTHERO, L. S.; MACKENZIE, L.; DE SMET, P.; TRAVERS, M.; TOVEYS, S. C.; SEO, J. T.; BERRIDGE, M. J.; CICCOLINI, F.; LIPP, P. Calcium signaling - an overview. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 12, p. 3-10, 2001.

BOS-MIKICH, A.; WHITTINGHAM, D. G.; JONES, K. T. Meiotic and mitotic Ca^{2+} oscillation affect cell composition in resulting blastocyst. **Developmental Biology**, v. 182, p. 172-179, 1997.

BREITBART, H. Signaling pathways in sperm capacitation and acrosomal reaction. **Cellular and Molecular Biology**, v. 49, n. 3, p. 321-327, 2003.

BURGHESS, A. M. C.; VERE, D. W. Teratogenic effects of some calcium channel blocking agents in *Xenopus* embryos. **Pharmacology and Toxicology**, v. 64, p. 78-82, 1989.

CARDULLO, R. A.; FLORMAN, H. M. Strategies and methods for evaluating acrosome reaction. In: WASSARMAN; DEPAMPHILIS **Methods in enzymology – guide to techniques in mouse development**, San Diego: Academic Press, Inc., v. 225, 1993. p.148-153.

CHERR, G. N.; DROBNIS, E. Z.; KATZ, D. F. Localization of cortical granule constituents before and after exocytosis in the hamster egg. **Journal of Experimental Zoology**, v. 246, p. 81-93, 1988.

CIAPA, B.; CHIRI, S. Egg activation: upstream of the fertilization calcium signal. **Biology of the Cell**, v. 92, p. 215-233, 2000.

CHIHARA, K.; FUNABASHI, H.; MUKUMOTO, K.; IMURA, Y.; MATSUOKA, N. Effects of calcium channel blockers on embryo-fetal development in rats. **Toxicology Letters**, v. 95, suppl., p. 209-210, July, 1998.

COX, T.; PETERSON, R. N. Identification of calcium conducting channels in isolated boar sperm plasma membranes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 161, n. 1, p. 162-168, 1989.

CRAN, D. G.; ESPER, C. R. Cortical granules and the cortical reaction in mammals. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 42, suppl., p. 177-188, 1990.

DARSZON, A.; BELTRÁN, C.; FELIX, R.; NISHIGAKI, T.; TREVIÑO, C. L. Ion transport in sperm signaling. **Developmental Biology**, v. 240, n. 1, p. 1-14, 2001.

DARSZON, A.; LABARCA, P.; ISHIGAKI, T.; ESPINOSA, F. Ion channels in sperm physiology. **Physiological Review**, v. 79, n. 2, p. 481-510, 1999.

DARSZON, A.; LIÉVANO, A.; BELTRÁN, C. Ions channels: key elements in gamete signaling. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 34, p. 117-167, 1996.

DE BLAS, G.; MICHAUT, M.; TREVIÑO, C. L.; TOMES, C. N.; YUNES, R.; DARSZON, A.; MAYORGA, L. S. The intraacrosomal calcium pool plays a direct role in acrosomal exocytosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 51, p. 49326-49331, 2002.

DRAGILEVA, E.; RUBINSTEIN, S.; BREITBART, H. Intracellular Ca^{+2} - Mg^{+2} -ATPase regulates calcium influx and acrosomal exocytosis in bull and ram spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 61, p. 1226-1234, 1999.

DUCIBELLA, T. The cortical reaction and development of activation competence in mammalian oocytes. **Human Reproduction Update**, v. 2, n. 1, p. 29-42, 1996.

DUCIBELLA, T.; LEFEVRE, L. Study of protein kinase C antagonists on cortical granule exocytosis and cell-cycle resumption in fertilized mouse eggs. **Molecular Reproduction and Development**, v. 46, p. 216-226, 1997.

DUCIBELLA, T.; KURASAWA, S.; DUFFY, P.; KOPF, G. S.; SCHULTZ, R. M. Regulation of polyspermy block in the mouse egg: maturation-dependent differences in cortical granule exocytosis and zona pellucida modifications induced by inositol 1,4,5-trisphosphste and an activator of protein kinase C. **Biology of Reproduction**, v. 48, p. 1251-1257, 1993.

DUPONT, G. Link between fertilization-induced Ca^{+2} oscillations and relief from metaphase II arrest in mammalian eggs: a model based on calmodulin-dependent kinase II activation. **Biophysical Chemistry**, v. 72, p. 153-167, 1998.

ESPER, C. R. **Avaliação dos efeitos da congelação sobre blastocistos bovinos**. 1986. 32f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1986.

ESPINOSA, F.; LOPEZ-GONZALEZ, I.; SERRANO, C. J.; GASQUE, G.; VEGA-BELTRAN, J. L.; TREVINO, C. L.; DARSZON, A. Anion channel blockers differentially affect T-type Ca^{2+} currents of mouse spermatogenic cells, alfal_E currents expressed in *Xenopus* oocytes and the sperm acrosome reaction. **Developmental Genetic**, v. 25, n. 2, p. 103-14, 1999. Disponível em <<http://www.periodicos.capes.org.br>>. Acesso em: 20 ago. 2003. Summary.

FAKIH, H.; MACLUSKY, N.; DECHERNEY, A.; WALLIMANN, T.; HUSZAR, G. Enhancement of human sperm motility and velocity *in vitro*: effects of calcium and creatine phosphate. **Fertility and Sterility**, v. 46, n. 5, p. 938-944, 1986.

FARRAR, H. C.; BLUMER, J. L. Fetal effects of maternal drug exposure. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 31, p. 525-547, 1991.

FLECKENSTEIN, A. Specific pharmacology of calcium in myocardium, cardiac pacemakers, and vascular smooth muscle. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 17, p. 149-166, 1977.

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

FLORMAN, H. M. Sequential focal and global elevations of sperm intracellular Ca^{2+} are initiated by the zona pellucida during acrossomal exocytosis. **Developmental Biology**, v. 165, p. 152-162, 1994.

FLORMAN, H. M.; ARNOULT, C.; KAZAM, I. G.; LI, C.; O'TOOLE, C. M. B. A perspective on the control of mammalian fertilization by egg-activated ion channels in sperm: a tale of two channels. **Biology of Reproduction**, v. 59, p. 12-16, 1998.

FLORMAN, H. M.; CORRON, M. E.; KIM, T. D. H.; BABCOCK, D. F. Activation of voltage-dependent calcium channels of mammalian sperm is required for zona pellucida-induced acrossomal exocytosis. **Developmental Biology**, v. 152, p. 304-314, 1992.

FRASER, L. R.; ABEYDEERA, L. R.; NIWA, K. Ca^{2+} -regulating mechanism that modulate bull sperm capacitation and acrossomal exocytosis as determined by chlortetracycline analysis. **Molecular Reproduction and Development**, v. 40, p. 233-241, 1995.

FRASER, L. R.; MCINTYRE, K. Calcium channel antagonists modulate the acrosome reaction but not capacitation in mouse spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 86, p. 223-233, 1989.

FUJIWARA, T.; NAKADA, K.; SHIRAKAWA, H.; MIYAZAKI, S. Development of inositol trisphosphate-induced calcium release mechanism during maturation of hamster oocytes. **Developmental Biology**, v. 156, p. 69-79, 1993.

FURUKAWA, T.; YAMAKAWA, T.; MIDERA, T.; SAGAWA, T.; MORI, Y.; NUKADA, T. Selectivities of dihydropyridine derivatives in blocking Ca^{2+} channel subtypes expressed in *Xenopus* oocytes. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 291, n. 2, p. 464-473, 1999.

GILMAN, A. G.; RALL, T. W.; NIES, A. S.; TAYLOR, P. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 8. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. 1232p.

GOODWIN, L. O.; KARABINUS, D. S.; PERGOLIZZI, R. G.; BENOFF, S. L-type voltage-dependent calcium channel α_1C subunit mRNA is present in ejaculated human spermatozoa. **Molecular Human Reproduction**, v. 6, n. 2, p. 127-136, 2000.

GRYNKIEWICZ, G.; POENIE, M.; TSIEN, R. A new generation of Ca^{+2} indicators with greatly improved fluorescence properties. **Journal of Biological Chemistry**, v. 260, n. 6, p. 3440-3450, 1985.

HERSHLAG, A.; COOPER, G. W.; BENOFF, S. Pregnancy following discontinuation of a calcium channel blocker in the male partner. **Human Reproduction**, v. 10, n. 3, p. 599-606, 1995.

HONG, C. Y.; CHIANG, B. N.; KU, J.; WEI, Y. H.; FONG, J. C. Calcium antagonists stimulate sperm motility in ejaculated human semen. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 19, n. 1, p. 45-9, 1985.

HOODBHOY, T.; TALBOT, P. Mammalian cortical granules: contents, fate and function. **Molecular Reproduction and Development**, v. 39, p. 439-448, 1994.

HOUTSULIAK, I. A. M.; BERDYIEVA, T. K.; LIBERT, S. V. Effects of T-type calcium channel blockers on spontaneous meiotic maturation of mouse ovarian oocytes *in vitro*. **Fiziologicheskii Zhurnal**, v. 48, n. 1, p. 98-101, 2002. Disponível em <<http://www.periodicos.capes.org.br>>. Acesso em: 20 ago. 2003. Summary.

IANCHII, R. I.; BLASHKIV, T. V.; VOZNESENS'KA, T. I.; PORTNYCHENKO, A. H.; SANDULIAK, V. N.; BIDZILIA, I. P. The effect of verapamil on the resumption of meiosis and the formation of the first polar body by mouse oocytes *in vitro*. **Fiziologicheskii Zhurnal**, v. 46, n. 1, p. 52-57, 2000. Disponível em <<http://www.periodicos.capes.org.br>>. Acesso em: 20 ago. 2003. Summary.

JAGANNATHAN, S.; PUBLICOVER, S. J.; BARRATT, C. L. R. Voltage-operated calcium channels in male germ cells. **Reproduction**, v. 123, p. 203-215, 2002.

JANIS, R. A.; SILVER, P. J.; TRIGGLE, D. J. Drug action and cellular calcium regulation. **Advances in Drugs Research**, v. 16, p. 309-591, 1987.

LI, J.; DUCAN, R. L.; GATTONE, V. H.; TURNER, C. H. Parathyroid hormone enhances mechanically induced bone formation, possibly involving L-type voltage-sensitive calcium channels. **Endocrinology**, v. 144, n. 4, p. 1226-1235, 2003.

JUNEJA, R.; GUPTA, I.; WALI, A.; SANYAL, S. N.; CHAKRAVARTI, R. N.; MAJUMDAR, S. Effect of verapamil on different spermatozoal functions in guinea pigs – a preliminary study. **Contraception**, v. 41, n. 2, p. 179-187, 1990a.

JUNEJA, R.; GUPTA, I.; WALI, A.; SANYAL, S. N.; CHAKRAVARTI, R. N.; MAJUMDAR, S. Verapamil stimulates Ca^{++} -uptake and Ca^{++} -ATPase in plasma membrane vesicles of guinea pig spermatozoa. **Contraception**, v. 41, n. 4, p. 419-429, 1990b.

KATSOFF, D.; CHECK, J. H. A challenge to the concept that the use of calcium channel blockers caused reversible male infertility. **Human Reproduction**, v. 12, n. 7, p. 1480-1482, 1997.

KIRKMAN-BROWN, J. C.; BARRATT, C. L. R.; PUBLICOVER, S.J. Nifedipine reveals the existence of two discrete components of the progesterone-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transient in human spermatozoa. **Development Biology**, v. 259, p. 71-82, 2003.

KITAI, H.; SANTULLI, R.; WRIGHT, K. H.; WALLACH, E. E. Examination of the role of calcium in ovulation in the *in vitro* perfused rabbit ovary with use of ethyleneglycol-bis (B-aminoethyl ether)-n,n'-tetraacetic acid and verapamil. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 152, n. 6, p. 705-708, 1985.

KLINE, D. Attributes and dynamics of the endoplasmatic reticulum in mammalian eggs. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 50, p. 125-154, 2000.

KLINE, D.; KLINE, J. Repetitive calcium transients and the rate of calcium in exocytosis and cell activation in the mouse eggs. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 42, suppl., p. 80-89, 1990.

KOREN, G.; BOLOGA, M.; LONG, D.; HENDERSON, K.; FELDMAN, Y.; SHEAR, N. Perception of teratogenic risk by pregnant woman exposed to drugs and chemicals in early pregnancy. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 160, p. 1190-1191, 1989.

LAMBERT, D. G. Calcium signaling protocols. In: ____ **Methods Molecular Biology**, New Jersey: Humana Press, v. 114, 1999. 359p.

LANE, M.; BAVISTER, B. D. Calcium homeostase in early hamster preimplantation embryos. **Biology of Reproduction**, v. 59, p. 1000-1007, 1998.

LIÉVANO, A.; SANTI, C. M.; SERRANO, C. J.; TREVIÑO, C. L.; BELLVÉ, A. R.; HERNÁNDEZ-CRUZ, A.; DARSZON, A. T-type Ca^{2+} channel and I_{E} expression in spermatogenic cells, and their possible relevance to the sperm acrosome reaction. **FEBS Letters**, v. 388, p. 150-154, 1996.

LIN, T. The role of calcium/phospholipid-dependent protein kinase in Leydig cell steroidogenesis. **Endocrinology**, v. 117, p. 119-126, 1985.

MAGEE, L. A.; SCHICK, B.; DONNENFELD, A. E.; SAGE, S. R.; CONOVER, B.; COOK, L.; MCELHATTON, P. R.; SCHIMIDT, M. A.; KOREN, G. The safety of calcium channel blockers in human pregnancy: a prospective, multicenter cohort study. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 174, p. 823-828, 1996.

MARTINEZ, P.; MORROS, A. Membrane lipid dynamics during human sperm capacitation. **Frontiers in Bioscience**, v. 1, p. d103-d117, July, 1996.

MEHLMANN, L. M.; KLINE, D. Regulation of intracellular calcium in the mouse egg: calcium release in response to sperm or inositol trisphosphate is enhanced after meiotic maturation. **Biology of Reproduction**, v. 51, p. 1088-1098, 1994.

MILLER, D. J.; GONG, X.; DECKER, G.; SHUR, B. D. Egg cortical granule N-acetylglucosaminidase is required for the mouse zona block to polyspermy. **Journal of Cellular Biology**, v. 123, n. 6, p. 1431-1440, 1993.

MIYAZAKI, S. Cell signaling at fertilization of hamster eggs. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 42, suppl., p. 163-175, 1990.

MIYAZAKI, S. Repetitive calcium transients in hamster oocytes. **Cell Calcium**, v. 12, p. 205-216, 1991.

MIYAZAKI, S.; SHIRAKAWA, H.; NAKADA, K.; HONDA, Y. Essential role of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor/ Ca^{2+} release channel in Ca^{2+} waves and Ca^{2+} oscillation at fertilization of mammalian eggs. **Development Biology**, v. 158, p. 62-78, 1993.

MIYAZAKI, S.; YUZAKI, M.; NAKADA, K.; SHIRAKAWA, H.; NAKANISHI, S.; NAKADE, S.; MIKOSHIBA, K. Block Ca^{2+} wave and Ca^{2+} oscillation by antibody to inositol 1,4,5-trisphosphste receptor in fertilized hamster eggs. **Science**, v. 257, p. 251-255, July, 1992.

NIXON, V. L.; MCDUGALL, A.; JONES, K. T. Ca^{2+} oscillations and the cell cycle at fertilization of mammalian and ascidian eggs. **Biology of the Cell**, v. 92, p. 187-196, 2000.

OKAMURA, N.; FUKUDA, A.; TANDA, M.; SUGITA, Y.; NAGAI, T. Changes in the nature of calcium transport systems on the porcine sperm plasma membrane during epididymal maturation. **Biochimical et Biophysical Acta**, v. 1108, p. 110-114, 1992.

O'TOOLE, C. M. B.; ARNOULT, C.; DARSZON, A.; STEINHARDT, R. A.; FLORMAN, H. M. Ca^{2+} entry through store-operated channels in mouse sperm is initiated by egg ZP_3 and drive the acrosome reaction. **Molecular Biology of the Cell**, v. 11, p. 1571-1584, May, 2000.

PALEOS, G. A.; POWERS, D. Combined effects of calcium and dibutyryl cyclic AMP on germinal vesicle breakdown in the mouse oocyte. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 66, p. 1-8, 1982.

PALEOS, G. A.; POWERS, D. The effect of calcium on the first meiotic division of the mammalian oocyte. **Journal of Experimental Zoology**, v. 217, p. 409-416, 1981.

PARRISH, J. J.; SUSKO-PARRISH, J. L.; GRAHAM, J.K. *In vitro* capacitation on bovine spermatozoa: role of intracellular calcium. **Theriogenology**, v. 51, p. 461-472, 1999.

PEPPERELL, J. R.; KOMMINENI, K.; BURADAGUNDA, S.; SMITH, P. J. S.; KEEFE, D. L. Transmembrane regulation of intracellular calcium by plasma membrane sodium/calcium exchanger in mouse ova. **Biology of Reproduction**, v. 60, p. 1137-1143, 1999.

PUTNEY Jr, J. W. Type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and capacitative calcium entry. **Cell Calcium**, v. 21, n. 3, p. 257-61, 1997.

PUTNEY Jr, J. W.; BROAD, L. M.; BRAUN, F. J.; LIEVREMONT, J. P.; BIRD, G. S. J. Mechanisms of capacitative calcium entry. **Journal of Cell Science**, v. 114, n. 12, p. 2223-2229, 2001.

RAZ, T.; BEN-YOSEF, D.; SHALGI, R. Segregation of the pathways leading to cortical reaction and cell cycle activation in the rat egg. **Biology of Reproduction**, v. 58, p. 94-102, 1998.

SANTI, C. M.; DARSZON, A.; HERNÁNDEZ-CRUZ, A. A diidropyridine-sensitive T-type Ca^{2+} current carrier in mouse primary spermatocytes. **American Journal of Physiology**, v. 271, n. 40, p. C1583-C1593, 1996.

SAS. **The statistical analyze systems for Windows**. V8. Cary, 2000.

SEMPLE, C. G.; THOMSON, J. A.; BEASTALL, G. H.; LORIMER, A. R. Calcium antagonists and endocrine status: lack of effect of oral verapamil on pituitary-testicular and pituitary-thyroid function. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 17, p. 179-182, 1984.

SHIINA, Y.; KANEDA, M.; MATSUYAMA, K.; TANAKA, K.; HIROI, M.; DOI, K. Role of the extracellular Ca^{+2} on the intracellular Ca^{2+} changes in fertilized and activated mouse oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 97, p. 143-150, 1993.

SHIRAKAWA, H.; MIYAZAKI, S. Spatiotemporal characterization of intracellular Ca^{+2} rise during the acrosome reaction of mammalian spermatozoa induced by zona pellucida. **Developmental Biology**, v. 208, p. 70-78, 1999.

SON, W. Y.; LEE, J. H.; HAN, C. T. Acrosome reaction of human spermatozoa is mainly mediated by $\alpha_1\text{H}$ T-type calcium channels. **Molecular Human Reproduction**, v. 6, n. 10, p. 893-897, 2000. Disponível em <<http://www.periodicos.capes.org.br>>. Acesso em: 20 ago. 2003. Summary.

STAUSS, C. R.; VOTTA, T. J.; SUAREZ, S. S. Sperm motility hyperactivation facilitates penetration of the hamster zona pellucida. **Biology of Reproduction**, v. 53, p. 1280-1285, 1995.

STRUTHERS, D.; MILLAR, J. A.; BEASTALL, G. H.; MCINTOSH, W. B.; REID, L. Calcium antagonists and hormone release: effect of nifedipine on luteinizing hormone-releasing hormone and thyrotropin-releasing hormone induced pituitary hormone release. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 56, n. 2, p. 401-407, 1983.

SUAREZ, S. S.; HO, H. C. Hyperactivation of mammalian sperm. **Cellular and Molecular Biology**, v. 49, n. 3, p. 351-356, 2003.

SUN, F. Z.; BRADSHAW, J. P.; GALLI, C.; MOOR, R. M. Changes in intracellular calcium in bovine oocytes following penetration by spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 101, p. 713-719, 1994.

SUN, Q. Y. Cellular and molecular mechanisms leading to cortical reaction and polyspermy block in mammalian eggs. **Microscopy Research Technique**, v. 61, n. 6-7, p. 342-348, 2003.

SWANN, K.; PARRINGTON, J. Mechanism of Ca^{2+} release at fertilization in mammals. **Journal Experimental Zoology**, v. 285, p. 267-275, 1999.

TAKAHASHI, A.; CAMACHO, P.; LECHLEITER, J. D.; HERMAN, B. Measurement of intracellular calcium. **Physiological Reviews**, v. 79, n. 4, p. 1089-1125, 1999.

TOSTI, E.; BONI, R.; CUOMO, A. Ca^{2+} current activity decreases during meiotic progression in bovine oocytes. **American Journal of Physiology**, v. 279, n. 6, p. C1795-C1800, 2000.

TRIGGLE, D. J. Calcium antagonists: basic chemical and pharmacological aspects. In: WEISS, G. B. **New perspectives on calcium antagonists**, Maryland: American Physiological Society, 1981. p. 1-18.

TSANG, B. K.; CARNEGEE, J. A. Calcium-dependent regulation of progesterone production by isolated rat granulosa cells: effects of the calcium ionophore A23187, prostaglandin E_2 , dl-isoproterenol and cholera toxin. **Biology of Reproduction**, v. 30, p. 787-794, 1984.

VELDHUIS, J. D.; BORGES, J. L. C.; DRAKE, C. R.; ROGOL, A. D.; KAISER, D. L.; THORNER, M. O. Divergent influences of the structurally dissimilar calcium entry blockers, diltiazem and verapamil, on thyrotropin- and gonadotropin-releasing hormone-stimulated anterior pituitary hormone secretion in man. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 60, n. 1, p. 144-149, 1985.

VOGEL, S. S.; SMITH, R. M.; BAIBAKOV, B.; IKEBUCHI, Y.; LAMBERT, N. A. Calcium influx is required for endocytotic membrane retrieval. **Proceeding National Academic Science USA**, v. 96, p. 5019-5024, Apr., 1999.

WANG, W. H.; DAY, B. N.; WU, G. M. How does polyspermy happen in mammalian oocytes? **Microscopy Research Technique**, v. 61, n. 6-7, p. 335-41, 2003.

WASSARMAN, P. M.; ALBERTINI, D. F. The mammalian ovum. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. **The physiology of reproduction**. New York: Raven Press, 1994. p. 79-122.

WASSARMAN, P. M. Mammalian fertilization: molecular aspects of gamete adhesion, exocytosis, and fusion. **The Cell**, v. 96, p. 175-183, Jan., 1999.

WASSARMAN, P. M.; JOVILE, L.; LITSCHER, E. S. A profile of fertilization in mammals. **Nature Cell Biology**, v. 3, p. E59-E64, Feb., 2001.

WESSEL, G. M.; BROOKS, J. M.; GREEN, E.; HALEY, S.; VORONINA, E.; WONG, J.; ZAYDFUDIM, V.; CONNER, S. The biology of cortical granules. **International Review Cytology**, v. 209, p. 117-206, 2001.

WHITE, K. L.; YUE, C. Intracellular receptors and agents that induce activation in bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 45, p. 91-100, 1996.

YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. **The physiology of reproduction**. New York: Raven Press, 1994. p. 189-288.

ANEXOS

ANEXO A - Meio TL-HEPES-PVA

Componentes	TL-HEPES-PVA	
	mM	g/100mL
PVA	-	0,1
Penicilina G	-	0,006
Vermelho fenol	-	0,001
HEPES (Na salt)	5,0	0,130
HEPES (free acid)	5,0	0,192
NaCl	127,0	0,742
KCl	3,16	0,024
CaCl ₂ .2H ₂ O	2,0	0,029
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,5	0,010
Lactato de sódio	10,0	0,185 mL
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0,35	0,005
Glicose	5,0	0,090
NaHCO ₃	2,0	0,017
Água Milli-Q q.s.p	-	100 mL

Colocar antes do uso piruvato sódico (0,1 ou 0,25 mM; 0,0275g) e BSA (Sigma-Aldrich, A-6003) (3 mg/ml). Pressão osmótica final 295-300mOsmol. Filtrar em membrana de 0,22µm.

Para remover o *cumulus*, foi diluído 2mg de hialuronidase para cada mL do meio TL-HEPES-PVA e acrescido de 0,01mg/ml de SBTI (Sigma-Aldrich, T-9003) (BAVISTER, 1989).

ANEXO B - Meio TALP-PVA

Componentes	TALP-PVA	
	mM	g/100mL
PVA	-	0,1
Penicilina G	-	0,006
Vermelho fenol	-	0,001
NaCl	114,0	0,666
KCl	3,16	0,024
CaCl ₂ .2H ₂ O	2,0	0,029
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,5	0,010
Lactato de sódio	10,0	0,185 mL
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0,35	0,005
Glicose	5,0	0,090
NaHCO ₃	25,0	0,210
Água Milli-Q q.s.p	-	100 mL

Colocar antes do uso piruvato sódico (0,1 ou 0,25 mM; 0,0275g) e BSA (3 mg/ml).

Pressão osmótica final 295-300mOsmol. Filtrar em membrana de 0,22µm (BAVISTER, 1989).

ANEXO C - PHE

Solução pH 4,0	50ml
Água Milli-Q	50ml
Lactato de Sódio 60% (294mM)	0,165ml
Bisulfito de Sódio	0,050g

Soluções Mãe	Penicilamina	Hipotaurina	Epinefrina
Salina 0,9%	10ml	10ml	-
Penicilamina (2mM)	0,003g	-	-
Hipotaurina (1mM)	-	0,0011g	-
Solução pH 4,0	-	-	40ml
Epinefrina (245µM)	-	-	0,0018g

PHE final	11ml
Penicilamina	2,5ml
Hipotaurina	2,5ml
Epinefrina	2ml
Salina 0,9%	4ml

Aliquotar em microtubos de 0,5ml com 250µl cada, envoltos por papel alumínio, e armazenar em Freezer (-70°C), por até um mês (BAVISTER, 1989).

ANEXO D - Meio PBS

Componentes	PBS	
	mM	g/1L
NaCl	140	8,0
KCl	2,7	0,2
Na ₂ HPO ₄ -Anidro	8	1,15
KH ₂ PO ₄	1,5	0,2
CaCl ₂ -2H ₂ O	0,7	0,1
MgCl ₂ -6H ₂ O	0,5	0,1
DL-Glicose	5,5	1,0
Sulfato de Amicacina (estoque)	-	5ml
Água Milli-Q q.s.p	-	1 L

Adicionar os elementos na ordem em que aparecem, sob agitação por quinze minutos, ajustar o pH para 7,2, filtrar em membrana de 0,22µm e armazenar em geladeira (4°C), por até um mês.

Obs: Diluir o Cloreto de Cálcio e o Fosfato de Potássio em água e adicioná-los lentamente à solução, para não precipitar os componentes.

Sulfato de Amicacina (estoque)

Componentes	30ml
Água Milli-Q	30ml
Sulfato de Amicacina (16,67µg/µl)	500mg

Aliquotar em 5ml e armazenar em freezer (-20°C).

Obs: esta solução é utilizada na dose de 50µl/10ml de meio.

ANEXO E - Coloração de Clortetraciclina

1) Preparar no momento do uso:

- 500 μ M de Clortetraciclina (Sigma-Aldrich, C-4881)
- 5mM de L-Cisteína (Sigma-Aldrich, C-8152)
- 1M de HEPES sódico

Estocar em gelo e no escuro.

- 2) Na lâmina de microscopia adicionar 10 μ L da solução que contém os espermatozóides e 10 μ L da solução de clortetraciclina, misturando devagar. Adicionar 1 μ L de glutaraldeído a 12,5%.
- 3) Observar sob microscopia de epifluorescência, excitação 395 a 510nm.

ANEXO F - Meio TALP

- 10mL de NaCl a 1M
- 400 μ L de MgCl₂.6H₂O a 0,1M
- 200 μ L de CaCl₂.2H₂O a 1M
- 310 μ L de KCL a 1M
- 300 μ L de Na₂HPO₄ a 0,1M
- 310 μ L de *D-L* ácido láctico 21,6mM, 60%
- 10mM de Hepes - *acid free*
- 25mM de NaHCO₃
- 1mM de ácido pirúvico
- 0,0002g de vermelho fenol
- 0,0075g de kanamicina
- 0,6g de BSA

Completar o volume para 100mL com água Milli-Q, ajustar o pH para 7,4. Filtrar com Millipore 0,22 μ m.

ANEXO G - Protocolo de Fixação e Inclusão de Oócitos para Microscopia Eletrônica de Transmissão

- 1) Fixar por 1 hora em:
Tampão cacodilato pH 8,0 (6,0mL de cacodilato 0,25M, 0,4 mL de glutaraldeído a 25% e 3,6 mL de água destilada). Preparar antes do uso e manter a 4°C.
- 2) Fazer 4 banhos de 10 min cada em tampão cacodilato 0,15M pH 8,0. O último banho pode passar uma noite.
- 3) Fixar em Tetróxido de Ósmio a 1% por 3 horas a 4°C.
- 4) Lavagem em água destilada por 3 vezes.
- 5) Desidratação: álcool 50°, 75° e 90° por 15 min cada. Álcool absoluto fazer 2 banhos de 30 min cada. Óxido de propileno fazer 2 banhos de 5 min cada.
- 6) Pré-Inclusão:

Solução Mãe	Total	1/4	1/2
Epon 812	50,0 ml	12,50 ml	25, 00ml
DDSA	23,5 ml	5,875 ml	11,75 ml
MNA	26,5 ml	6,625 ml	13,25 ml
DMP-30	1,5 ml	0,375 ml	0,75 ml
Total	101,5 ml	25,375 ml	50,75 ml

Banhos de:

- $\frac{3}{4}$ óxido de propileno + $\frac{1}{4}$ solução mãe por 30 min.
- $\frac{1}{2}$ óxido de propileno + $\frac{1}{2}$ solução mãe por 30 min.
- solução mãe por 12h.

- 7) Inclusão final na solução mãe, em cápsulas, 72 horas a 60°C.
- 8) Cortar secções semifinas (0,5µm) com navalha de vidro, colocar sobre lâminas e corar com azul de toluidila para seleção prévia, e avaliar as estruturas sob microscopia óptica.
- 9) Cortar as secções ultrafinas (60 a 70nm) com navalha de diamante, colocá-las em grades de cobre (malha 200), corar com acetato de uranila (3 min) e citrato de chumbo (1 min) e avaliar sob microscopia eletrônica de transmissão.