

MECANISMOS DE LIBERTAÇÃO DE CÁLCIO NA FERTILIZAÇÃO EM MAMÍFEROS

Ana Carla Gordo, PhD

SUMÁRIO

Em ovócitos de mamíferos, as oscilações de cálcio associadas à fertilização são as responsáveis pela activação do ovócito e desenvolvimento embrionário. O mecanismo pelo qual o espermatozóide induz o pico inicial de cálcio e as subsequentes oscilações é ainda objecto de investigação. Tem sido proposto que o espermatozóide interage com receptores localizados na membrana plasmática do ovócito e activa uma via celular que resulta na libertação de cálcio. Outra hipótese proposta sugere que após a fusão entre o ovócito e o espermatozóide, é libertado um factor do espermatozóide para o citoplasma do ovócito, o qual ao interagir com alvos citosólicos ainda desconhecidos, induz a libertação de cálcio. Aqui serão discutidas as evidências mais recentes de ambas as linhas de investigação, assim como os tipos de mecanismos que podem mediar a libertação de cálcio a partir das reservas intracelulares.

MODELOS EXPLICATIVOS DA FORMA COMO O ESPERMATOZÓIDE INDUZ LIBERTAÇÃO DE CÁLCIO PELO OVÓCITO

Apesar da importância das oscilações de cálcio na fertilização, o mecanismo de sinalização celular através do qual a interacção entre o espermatozóide e o ovócito leva à libertação de cálcio ainda não está esclarecido. Pelo menos três hipóteses têm sido propostas de forma a explicar a forma como as oscilações de cálcio induzem a activação do ovócito.

1. HIPÓTESE DA BOMBA DE CÁLCIO

Esta hipótese foi inicialmente sugerida em ovócitos de ouriços do mar, e propõe que o espermatozóide introduz cálcio no ovócito, actuando como um canal condutor que permite um influxo contínuo de cálcio extracelular para dentro do citoplasma do ovócito através de poros na membrana do espermatozóide (1). Este influxo de cálcio levaria eventualmente a uma sobrecarga dos reservatórios intracelulares de cálcio com indução de libertação de cálcio através de um meca-

nismo de libertação de cálcio induzido pelo próprio cálcio (CICR), numa forma semelhante ao que acontece no retículo endoplasmático de células musculares (2). Contudo, os ovócitos dos ouriços do mar podem ser fertilizados na ausência de cálcio extracelular, o que exclui esta hipótese. No caso dos mamíferos, a injeção contínua de cálcio em ovócitos de ratinho ou de hamster em fase MII é incapaz de mimetizar a libertação de cálcio que ocorre durante a fertilização (3). Podemos, pois concluir que qualquer que seja o mensageiro utilizado pelo espermatozóide na indução das oscilações de cálcio, é pouco provável ser o cálcio por si só (Fig. 1).

2. HIPÓTESE DO RECEPTOR

A noção de que a activação do ovócito ocorre após a interacção do espermatozóide com um receptor localizado na membrana do ovócito resulta do facto de muitas das respostas do ovócito que ocorrem após a fertilização serem semelhantes às respostas de células somáticas após a sua interacção com ligandos específicos. No ouriço do mar e em *Xenopus*, a fertilização induz a hidrólise do fosfatidilinositol - 4,5 - bifosfato (PIP_2), resultando na produção de IP_3 e diacilglicerol (DAG) (4). Estes resultados sugerem que o espermatozóide poderá activar um receptor no ovócito que

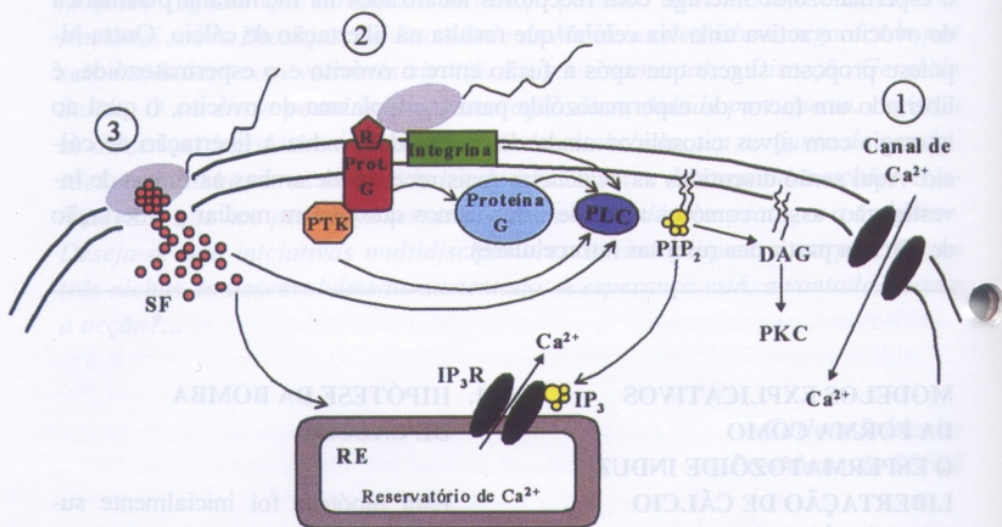


Fig. 1 - Mecanismos sugeridos para a activação do ovócito pelo espermatozóide. (1) Hipótese da bomba de cálcio. Esta hipótese propõe que o espermatozóide introduz cálcio no ovócito, actuando como um canal condutor que permite um influxo contínuo de cálcio extracelular para dentro do citoplasma do ovócito através de poros na membrana do espermatozóide. (2) Hipótese dos Receptores. Esta hipótese propõe a ligação do espermatozóide a receptores localizados na membrana do ovócito, nomeadamente receptores de proteínas quinase, de proteínas G, ou integrinas. Neste modelo, a activação do receptor resulta na activação da PLC, a qual vai hidrolizar o PIP_2 com produção de DAG e IP_3 . O DAG vai activar a proteína quinase C (PKC), e o IP_3 vai promover a libertação de cálcio ao interagir com os IP_3R . (3) Hipótese da Fusão. Esta hipótese propõe que após a fusão entre as membranas do espermatozóide e do ovócito, um factor proveniente do espermatozóide, denominado de factor do espermatozóide (SF), se difunde no citoplasma do ovócito e ao interagir com alvos desconhecidos induz a libertação de cálcio.

está ligado ao mecanismo indutor da hidrólise do PIP_2 , pois alterações do metabolismo do PIP_2 podem ocorrer em células somáticas em resposta à activação de receptores das proteínas G, ou de receptores tirosina cinase, ou à ligação a integrinas (5) (Fig. 1).

2.1 MODELO DO RECEPTOR DAS PROTEÍNAS G

Este modelo defende que a interação entre um ligando(s) do espermatozóide com um receptor(s) do ovócito induz a activação das proteínas G. Após a activação, estas proteínas G sofrem uma dissociação das suas subunidades, resultando na formação de dois potenciais transdutores de sinal – a subunidade α e o heterodímero $\beta\gamma$. Estas moléculas podem depois interagir com uma variedade de moléculas efectoras, como sejam a adenilciclase e a fosfolipase $\text{C}\beta$ (PLC), (6,7), a qual vai hidrolizar o PIP_2 com produção de DAG e IP_3 , induzindo assim a activação do ovócito. Existem algumas evidências que sugerem a validade deste modelo. Por exemplo, a microinjecção de $\text{GTP}\gamma\text{S}$, um activador das proteínas G, em ovócitos de mamíferos, induz a libertação de cálcio e a exocitose das vesículas corticais (8). Por outro lado, a microinjecção de fosducina, que é uma proteína retinal com afinidade para as subunidades $\beta\gamma$ livres, inibe a fertilização (9), sugerindo a formação do complexo fosducina- $\beta\gamma$, o qual previne que as subunidades $\beta\gamma$ funcionem como moduladores de efectores celulares no ovócito. Dos estudos realizados, talvez o que maior suporte dá à ideia do receptor das proteínas G é o de experiências efectuadas em ovócitos de hamster que demonstraram que a microinjecção de antagonistas das proteínas G inibe a libertação de cálcio que

ocorre imediatamente após a fertilização, não afectando porém a libertação subsequente de cálcio resultante da estimulação pelo IP_3 (8). No entanto, apesar do resultado destas experiências fundamentar o papel das proteínas G na activação do ovócito, não existem evidências experimentais para a presença de um receptor do espermatozóide em ovócitos de mamíferos capaz de estimular o mecanismo indutor da hidrólise do PIP_2 . Mais ainda, embora o tratamento de ovócitos com agonistas das proteínas G leve à libertação de cálcio, a duração e amplitude destas oscilações é muito diferente das observadas após a fertilização (Fig. 1).

2.2 MODELO DOS RECEPTORES TIROSINA CINASE

A hipótese dos receptores tirosina cinase foi considerada devido ao facto de a fertilização em ouriços do mar e em *Xenopus* ser acompanhada de alterações do metabolismo do PIP_2 e de uma alcalinização do pH interno, fenómenos que ocorrem também durante o processo de divisão em células somáticas após estimulação dos receptores tirosina cinase. O envolvimento de proteínas tirosina cinase na fertilização foi inicialmente sugerida após a descoberta de que receptores da serotonina expressos ectopicamente e estimulados por um ligando (10), ou receptores do factor de crescimento epidérmico (11), podem causar activação do ovócito. Neste modelo, tal como no anterior, a activação do receptor resulta na activação da PLC, a qual vai hidrolizar o PIP_2 com produção de DAG e IP_3 . Nos ovócitos do ouriço do mar, a actividade tirosina cinase é estimulada após a fertilização e é acompanhada de alterações na fos-

forilação de uma variedade de proteínas do ovócito (12). Na activação dos ovócitos de mamíferos, pouco se sabe sobre o papel das tirosinas cinases e da fosforilação de proteínas cinase. Foi apenas observado que, após a fertilização, ocorrem alterações no estado de fosforilação dos resíduos da tirosina de algumas proteínas (13), mas a identidade e função destas proteínas na activação do ovócito permanece desconhecida (Fig. 1).

3. MODELO DAS INTEGRINAS

Recentemente foi demonstrada a presença de integrinas à superfície dos ovócitos de mamíferos (14,15). Como as integrinas têm domínios de sinalização citoplasmáticos, tem sido postulado a sua acção como receptores do espermatozóide na membrana do ovócito, o que possibilita serem também as responsáveis pela indução das oscilações de cálcio associadas à fertilização (16,17). Contudo, e embora tenha sido evidenciada a presença de várias integrinas à superfície dos ovócitos, não existe uma prova directa da sua estimulação pelo espermatozóide que leve à indução de oscilações de cálcio, com subsequente

activação do ovócito e do desenvolvimento embrionário (Fig. 1).

4. HIPÓTESE DA FUSÃO

A hipótese da fusão propõe que após a fusão entre as membranas do espermatozóide e do ovócito, um factor proveniente do espermatozóide, denominado de factor do espermatozóide (SF), se difunde no citoplasma do ovócito e induz a libertação de cálcio. A primeira evidência da existência do SF provém de experiências realizadas em ouriços do mar, em que através da injeção de extractos citosólicos de espermatozóides foi possível induzir a exocitose das vesículas corticais (18). Foram feitas experiências semelhantes no coelho e no ratinho, tendo sido demonstrado que estes extratos são sensíveis ao calor e à tripsina, sugerindo uma composição proteica (19). Uma evidência importante da teoria do SF, reside no facto de após microinjeção em ovócitos de diferentes espécies, o SF induzir múltiplas oscilações de cálcio indistintas das que ocorrem na fertilização e que conduzem ao desenvolvimento embrionário normal e completo (20,21) (Fig. 2,3,4). O facto

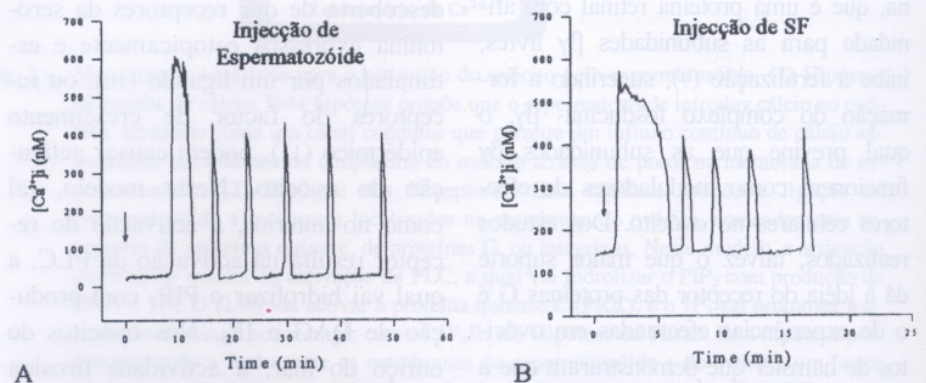


Fig. 2 – A microinjecção de um espermatozóide (A) ou de factor de espermatozóide (B) em ovócitos de ratinho no estágio de MII induz oscilações de cálcio que são indistintas

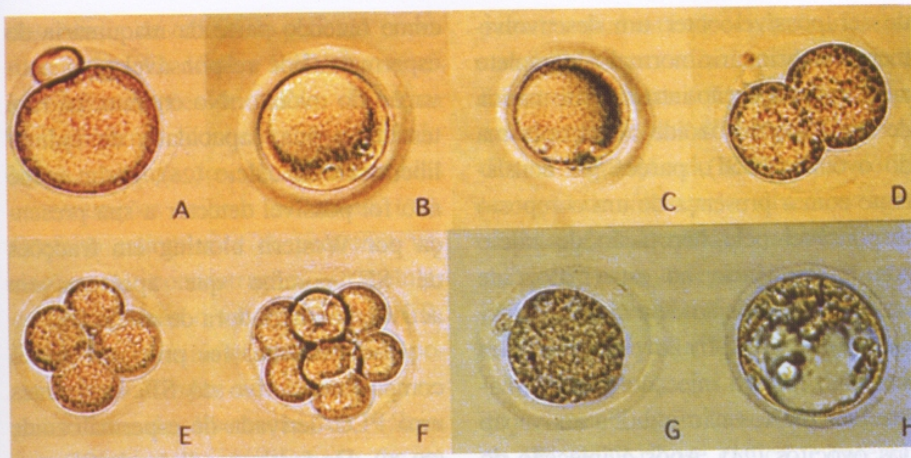


Fig. 3 – A microinjecção de SF em ovócitos de ratinho induz a activação e o desenvolvimento embrionário até ao estágio de blastocisto. Os ovócitos microinjectados com SF foram incubados em citocalasina B por 3 h. Sequência fotográfica de todos os estádios de desenvolvimento embrionário induzidos pelo SF em ovócitos microinjectados 15 h após a administração de hCG. (A) fase MII; (B) estágio de PN; (C) estágio de PN; (D) 2-células; (E) 4-células; (F) 8-células; (G) Mórula; (H) Blastocisto. Figura retirada de Gordo et al., (2000)

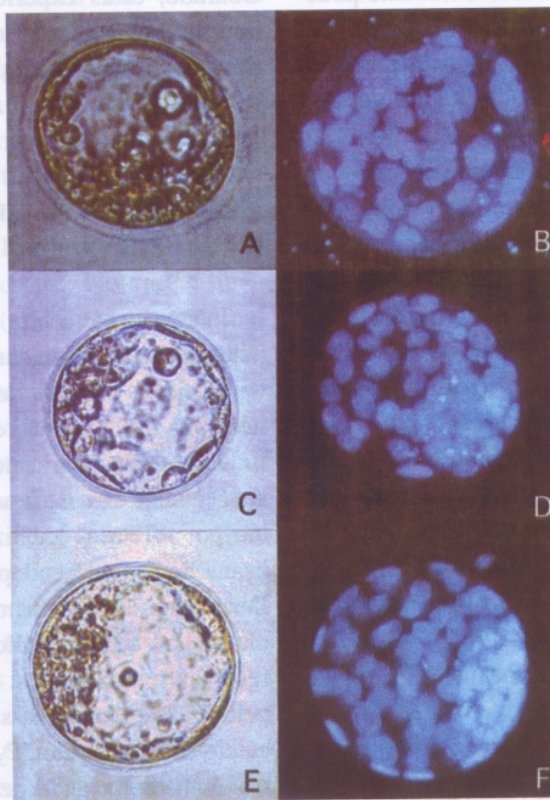


Fig. 4 – Fotografias de contraste de fase de blastocistos obtidos pela microinjecção de SF, pela activação através de tratamento combinado com ionomicina e 6-DMAP, e fertilização in vivo (A, C, E, respectivamente). Os mesmos blastocistos foram corados com Hoescht para a contagem dos núcleos (B, D, F). Figura retirada de Fissore et al., (1998)

de ser possível obter um desenvolvimento embrionário normal e completo após microinjecção intracitoplasmática de um espermatozóide no citoplasma do ovócito (ICSI), parece ser consistente com a presença de um composto responsável pela libertação de cálcio com proveniência no espermatozóide (22,23). A activação de ovócitos observada após a ICSI não parece ser um artefacto, pois a injecção de espermatozoides mortos não induz a activação dos ovócitos (24). Após a injecção do espermatozóide há um período de aproximadamente 2-3 minutos que antecede a libertação de cálcio, que se pensa ser o tempo necessário à libertação do factor indutor das oscilações de cálcio (22). Outra evidência para esta teoria vem do facto de extractos citosólicos de espermatozóide humano podem activar ovócitos humanos que falharam a activação após injecção do espermatozóide ou de células germinais imaturas (21,25).

Diversas moléculas têm sido propostas como sendo o componente activo do SF e responsáveis pela indução das oscilações de cálcio. Recentemente, uma proteína citosólica denominada oscilina, isolada a partir de espermatozoides de hamster foi sugerida como sendo a molécula activadora, pois após vários ciclos de purificação apresentava capacidade de libertar cálcio ao ser injectada no ovócito. Esta proteína foi posteriormente identificada como sendo a glicosamina-6-fosfato desaminase/isomerase (gps) (26). Contudo, e apesar da gps se localizar na região equatorial do espermatozóide (27), o seu papel na fertilização foi recentemente questionado (28).

A proteína truncada c-Kit, uma forma mais pequena do receptor c-Kit, o qual é expresso nos últimos estádios da espermatogénese, foi postulado

como fazendo parte da maquinaria do espermatozóide responsável pela activação do ovócito. No entanto, não foi testada a sua capacidade de induzir libertação de cálcio (26), assim como não foi possível detectar a sua presença por Western blotting em fracções de SF porcino que apresentavam actividade libertadora de cálcio (28).

Recentemente, foi proposto que o componente activo do SF seria antes uma PLC derivada do espermatozóide (29,30). De facto, a adição de SF porcino a homogenizados de ouriços do mar induz a libertação de cálcio através da produção de IP_3 . Adicionalmente, a pré-incubação de SF com o composto U73122, um inibidor da PLC, bloqueia a indução de oscilações de cálcio pelo SF, nos mesmos (30). Contudo, estas experiências não permitiram saber se o SF é a PLC ou meramente um activador da PLC existente nos ovócitos (Fig. 1).

MECANISMOS DE LIBERTAÇÃO DE CÁLCIO

Independentemente do mecanismo pelo qual são iniciadas as oscilações de cálcio, a indução destas oscilações necessita da libertação de cálcio a partir de reservas intracelulares e de um subsequente rearmazenamento do cálcio por ATPases localizadas na membrana do retículo endoplasmático (31). Dois tipos de mecanismos podem mediar a libertação de cálcio a partir das reservas intracelulares: um é mediado pelo IP_3 e denomina-se libertação de cálcio induzida pelo IP_3 (IICR); o outro é mediado quer pelo receptor da rianodina (RyR) quer pelo IP_3 R e é designado por CICR (32). Estes receptores controlam a libertação de cálcio através da abertura ou encerramento

dos canais de cálcio do retículo endoplasmático. Os IP_3R e RyR são sensíveis às variações de cálcio, de forma que pequenas concentrações estimulam a abertura dos canais e elevadas concentrações inibem os canais (33). O efeito estimulador de pequenas variações da concentração intracelular de cálcio causa o fenómeno de CICR. Este é um mecanismo de feedback positivo o qual induz um mecanismo regenerativo de libertação de cálcio, responsável pela amplificação de pequenas alterações de cálcio em múltiplas oscilações de cálcio (34). A sensibilidade destes canais à libertação de cálcio é regulada pela associação com outras moléculas como o IP_3 para os IP_3R (35) e a ADP-ribose cíclica para os RyR (36).

Estudos realizados em diferentes espécies demonstraram a presença de ambos os receptores em ovócitos de mamíferos. Em ovócitos de ratinhos e de hamster, a indução de oscilações de cálcio pela fertilização foi completamente inibida por um anticorpo específico para os IP_3R , e a sua presença confinada por Western blotting e imunocitoquímica (37). Relativamente aos RyR , apesar da sua presença e funcionalidade em ovócitos de ratinho e de bovino, a libertação de cálcio por estes receptores parece não ser essencial para a activação destes ovócitos (38). A pré-incubação de ovócitos de ratinho em rianodina (agonista dos RyR), ou a adição de rianodina a ovócitos durante o período oscilatório, sugeriu um envolvimento dos RyR na modulação das oscilações de cálcio, em vez da sua iniciação (39). Contrariamente ao resto dos mamíferos, foi demonstrado em ovócitos humanos a presença e funcionalidade dos IP_3R e RyR . Estes receptores exibem diferente localização es-

pacial, a qual está associada à diferente sensibilidade ao cálcio, assim como à forma de resposta a estímulos (40). Um outro exemplo das diferenças observadas na regulação do mecanismo de libertação de cálcio pelos diversos organismos, é dado pelo *Xenopus* e pelo ouriço do mar. A regulação da libertação de cálcio em ovócitos de *Xenopus* é feita exclusivamente através dos IP_3R (41), enquanto que os ovócitos de ouriço do mar libertam cálcio em resposta ao IP_3 , ADP-ribose cíclica, e cafeína, sugerindo um papel activo na libertação de cálcio para ambos os receptores (42).

CONCLUSÕES

Todas as evidências actuais sugerem que o espermatozóide transporta uma substância que uma vez introduzida no ovócito desencadeia a activação do mesmo. O que permanece ainda por descobrir é a natureza desta substância e o mecanismo utilizado pela mesma, na iniciação das oscilações de cálcio. A caracterização deste componente, que tudo indica tratar-se de um componente proteico, poderá não só dar resposta a questões biológicas importantes como também oferecer avanços na área da reprodução médica assistida.

Agradecimentos

Agradeço ao Prof. Doutor Mário de Sousa pela revisão crítica do manuscrito.

Correspondência:
Ana Carla Gordo,
Av. 25 de Abril, 65 1º-Dto
2800 Almada
E mail: npp13136@mail.telepac.pt

Referências

1. Jaffe LF. Sources of calcium in egg activation: a review and hypothesis. *Dev Biol* 1983; 99: 265-276.
2. Fabiato A. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol* 1983; 245: C1-14.
3. Swann K. Different triggers for calcium oscillations in mouse eggs involve a ryanodine-sensitive calcium store. *Biochem J* 1992; 287: 79-84.
4. Ciapa B, Borg B, Whitaker M. Polyphosphoinositide metabolism during the fertilization wave in sea urchin eggs. *Development* 1992; 115: 187-195.
5. Nishizuka Y. Studies and prospectives of protein kinase C in signal transduction. *Nippon Ketsueki Gakkai Zasshi* 1988; 51: 1321-1326.
6. Bimbaumer L. Receptor-to-effector signaling through G proteins: roles for beta gamma dimers as well as alpha subunits. *Cell* 1992; 71: 1069-1072.
7. Clapham DE, Neer EJ. New roles for G-protein beta gamma-dimers in transmembrane signalling. *Nature* 1993; 365: 403-406.
8. Miyazaki S. Inositol 1,4,5-trisphosphate-induced calcium release and guanine nucleotide-binding protein-mediated periodic calcium rises in golden hamster eggs. *J Cell Biol* 1988; 106: 345-353.
9. Moore GD, Ayabe T, Visconti PE, Schultz RM, Kopf GS. Roles of heterotrimeric and monomeric G proteins in sperm-induced activation of mouse eggs. *Development* 1994; 120: 3313-3323.
10. Kline D, Simoncini L, Mandel G, Maue RA, Kado RT, Jaffe LA. Fertilization events induced by neurotransmitters after injection of mRNA in *Xenopus* eggs. *Science* 1988; 241: 464-467.
11. Vim DL, Opresko LK, Wiley HS, Nucitelli R. Highly polarized EGF receptor tyrosine kinase activity initiates egg activation in *Xenopus*. *Dev Biol* 1994; 162: 41-55.
12. Ciapa B, Epel D. A rapid change in phosphorylation on tyrosine accompanies fertilization of sea urchin eggs. *FEBS Lett* 1991; 295: 167-170.
13. Endo Y, Lee MA, Kopf GS. Evidence for the role of a guanine nucleotide-binding regulatory protein in the zona pellucida-induced mouse sperm acrosome reaction. *Dev Biol* 1987; 119: 210-216.
14. Fusi FM, Vignali M, Gailit J, Bronson RA. Mammalian oocytes exhibit specific recognition of the RGD. Arg-Gly-Asp tripeptide and express oolemmal integrins. *Mol Reprod Dev* 1993; 36: 212-219.
15. Almeida EA, Huovila AP, Sutherland AE et al. Mouse egg integrin alpha 6 beta 1 functions as a sperm receptor. *Cell* 1995; 81: 1095-1104.
16. Iwao Y, Fujimura T. Activation of *Xenopus* eggs by RGD-containing peptides accompanied by intracellular Ca²⁺ release. *Dev Biol* 1996; 177: 558-567.
17. Fenichel P, Durand-Clement M. Role of integrins during fertilization in mammals. *Hum Reprod* 1998; Suppl 4: 31-46.
18. Dale B, DeFelice LJ, Ehrenstein G. Injection of a soluble sperm fraction into sea urchin eggs triggers the cortical reaction. *Experientia* 1985; 41: 1068-1070.
19. Stice SL, Robl JM. Activation of mammalian oocytes by a factor obtained from rabbit sperm. *Mol Reprod Dev* 1990; 25: 272-280.
20. Fissore RA, Gordo AC, Wu H. Activation of development in mammals: is there a role for a sperm cytosolic factor? *Theriogenology* 1998; 49: 43-52.
21. Palermo GD, Avrech OM, Colombero LT et al. Human sperm cytosolic factor triggers Ca²⁺ oscillations and overcomes activation failure of mammalian oocytes. *Mol Hum Reprod* 1997; 3: 367-374.
22. Tesarik J, Sousa M, Testart J. Human oocyte activation after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1994; 9: 511-518.
23. Tesarik J, Sousa M. Key elements of a highly efficient intracytoplasmic sperm injection technique: Ca²⁺ fluxes and oocyte cytoplasmic dislocation. *Fertility and Sterility* 1995; 64: 770-776.
24. Dozortsev D, Rybouchkin A, De Sutter P, Qian C, Dhont M. Human oocyte activation following intracytoplasmic injection: the role of the sperm cell. *Hum Reprod* 1995; 10: 403-407.
25. Sousa M, Mendoza C, Barros A, Tesarik J. Calcium responses of human oocytes after intracytoplasmic injection of leukocytes, spermatocytes and round spermatids. *Mol Hum Reprod* 1996d; 2: 853-857.
26. Wolosker H, Kline D, Bian Y et al.

- Molecularly cloned mammalian glucosamine-6-phosphate deaminase localizes to transporting epithelium and lacks oscillin activity. *FASEB J* 1998; 12: 91-99.
27. Parrington J, Swann K, Shevchenko VI, Sesay AK, Lai F A. Calcium oscillations in mammalian eggs triggered by a soluble sperm protein. *Nature* 1996; 379: 364-368.
 28. Wu H, He CL, John B, Black SJ, Fissore RA. Partial characterization of the calcium-releasing activity of porcine sperm cytosolic extracts. *Dev Biol* 1998; 203: 369-381.
 29. Jones KT, Cruttwell C, Parrington J, Swann K. A mammalian sperm cytosolic phospholipase C activity generates inositol trisphosphate and causes Ca²⁺ release in sea urchin egg homogenates. *FEBS Lett* 1998; 437: 297-300.
 30. Jones KT, Matsuda M, Parrington J, Katan M, Swann K. Different Ca²⁺-releasing abilities of sperm extracts compared with tissue extracts and phospholipase C isoforms in sea urchin egg homogenate and mouse eggs. *Biochem J* 2000; 346: 743-749.
 31. Miyazaki S, Shirakawa H, Nakada K, Honda Y. Essential role of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor/Ca²⁺ release channel in Ca²⁺ waves and Ca²⁺ oscillations at fertilization of mammalian eggs. *Dev Biol* 1993; 158: 62-78.
 32. Swann K, Lai FA. A novel signalling mechanism for generating Ca²⁺ oscillations at fertilization in mammals. *Bioessays* 1997; 19: 371-378.
 33. Lino M, Endo M. Calcium-dependent immediate feedback control of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca²⁺ release. *Nature* 1992; 360: 76-78.
 34. Swann K. Ca²⁺ oscillations and sensitization of Ca²⁺ release in unfertilized mouse eggs injected with a sperm factor. *Cell Calcium* 1994; 15: 331-339.
 35. Berridge MJ. Cell signalling A tale of two messengers. *Nature* 1993; 365: 388-389.
 36. Galione A, Lee HC, Busa WB. Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in sea urchin egg homogenates: modulation by cyclic ADP-ribose. *Science* 1991; 253: 1143-1146.
 37. Miyazaki S, Yuzaki M, Nakada K et al. Block of Ca²⁺ wave and Ca²⁺ oscillation by antibody to the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in fertilized hamster eggs. *Science* 1992; 257: 251-255.
 38. Ayabe T, Kopf GS, Schultz RM. Regulation of mouse egg activation: presence of ryanodine receptors and effects of microinjected ryanodine and cyclic ADP ribose on uniseminated and inseminated eggs. *Development* 1995; 121: 2233-2244.
 39. Fissore RA, Robl JM. Sperm, inositol trisphosphate, and thimerosal-induced intracellular Ca²⁺ elevations in rabbit eggs. *Dev Biol* 1993; 159: 122-130.
 40. Tesarik J, Sousa M. Mechanism of calcium oscillations in human oocytes: a two-store model. *Mol Hum Reprod* 1996; 2: 383-386.
 41. Parys JB, Sernett SW, DeLisle S, Snyder PM, Welsh MJ, Campbell KP. Isolation, characterization, and localization of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor protein in *Xenopus laevis* oocytes. *J Biol Chem* 1992; 267: 18776-18782.
 42. Galione A, McDougall A, Busa WB, Willmott N, Gillot I, Whitaker, M. Redundant mechanisms of calcium-induced calcium release underlying calcium waves during fertilization of sea urchin eggs. *Science* 1993; 261: 348-352.

MENOS UMA DOR DE CABEÇA

Exatidão apresentada nos 5^{os} Jornadas de Cardiologia de Évora (29 a 30 de Novembro de 2003, Évora).
 Organização: Serviço de Cardiologia do Hospital Espírito Santo (Évora)

TECNOSAL Faculdade de Medicina de Lisboa e Interno
 Hospital de Santa Cruz (Lisboa) e Hospital Dr. Alfredo da Costa

farmalux
 Farmalux é uma marca registada da Farmalux, Lda. Todos os direitos reservados.