

OSCILAÇÕES DE CÁLCIO – PAPEL FUNDAMENTAL NA ACTIVACÃO DOS OVÓCITOS EM MAMÍFEROS

Ana Carla Gordo

SUMÁRIO

A activação de ovócitos de mamíferos compreende vários fenómenos dependentes da libertação intracelular de cálcio que incluem a exocitose dos grânulos corticais, o completar da meiose com diminuição dos níveis de MFP e MAP quinase e activação metabólica do zigoto. Este artigo foca o papel das oscilações de cálcio na cascata de eventos celulares que ocorrem após a fertilização e levam à conversão de ovócito em zigoto.

A FERTILIZAÇÃO INDUZ MÚLTIPLAS OSCILAÇÕES DO IÃO CÁLCIO NOS OVÓCITOS DE MAMÍFEROS

Antes da fertilização os ovócitos dos mamíferos encontram-se parados na metafase da segunda divisão meiótica (MII). Após a fertilização pelo espermatozóide exibem um aumento dramático da concentração intracelular do ião cálcio livre, o qual é responsável pela activação do ovócito (1). Baseado na dinâmica temporal das respostas, a activação do ovócito compreende eventos imediatos e eventos mais tardios. Em relação aos eventos imediatos, estes são caracterizados por uma despolarização do oolema, pelas oscilações de cálcio (1º pico), e pela exocitose das vesículas corticais. A despolarização do oolema

funciona como o bloqueio precoce contra a polispermia, enquanto que o primeiro pico de cálcio induz a reacção cortical. A exocitose das vesículas corticais permite libertar para o espaço perivitelino substâncias coloidais e enzimas que alteram a estrutura da zona pelúcida (ZP), levando ao bloqueio secundário da polispermia (2). Os eventos mais tardios são caracterizados pelo completar da meiose, entrada no primeiro ciclo celular e pela activação metabólica do zigoto. Nos ovócitos de mamíferos, estes eventos incluem, ao nível morfológico, a extrusão do segundo corpo polar, a descondensação do núcleo do espermatozóide, com formação do pronúcleo masculino, a formação do pronúcleo feminino, a migração dos pronúcleos e a singamia (Fig. 1).

Contrariamente a ovócitos de pei-

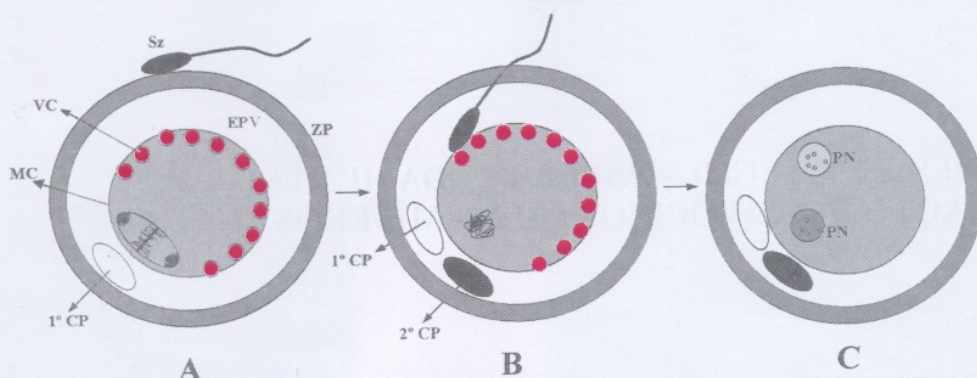


Fig. 1 – Activação do ovócito de mamíferos. O ovócito está parado em MII exibindo o 1º corpo polar (1º CP), as vesículas corticais (VC) intactas e o fuso numa posição tangencial à membrana citoplasmática (MC) (A). Após a penetração do espermatozóide através da zona pelúcida (ZP) e sua fusão com o oolema, dá-se a exocitose do conteúdo das VCs para o espaço perivitelino (EPV), um dos mecanismos de bloqueio à polispermia. Mais tarde efectua-se a 2ª divisão meiótica, com extrusão do 2º corpo polar (2º CP) (B). Após a descondensação de ambas as cromatinas, feminina e masculina, dá-se a formação dos pronúcleos (PN) masculino e feminino (C)

xes, de equinodermes, e de *Xenopus*, nos quais a fertilização induz um pico único de cálcio (3,4), nos mamíferos a fertilização dos ovócitos induz múltiplas oscilações da concentração citosólica do íon cálcio livre ($[Ca^{2+}]_i$), que passarei a designar simplesmente de oscilações de cálcio (5-7).

As oscilações de cálcio induzidas pelo espermatozóide consistem numa resposta inicial e numa resposta mais tardia. Em ovócitos de ratinho a resposta inicial é caracterizada por um pico de cálcio que se prolonga por cerca de 3-4 minutos e que sobe de uma concentração basal de 50-100 μM para uma concentração que pode atingir 1 mM (8). A resposta mais tardia é representada pelos subsequentes picos de cálcio com uma duração mais curta (30-60 seg), e que ocorrem em intervalos relativamente constantes, espaçados de cerca de 2-4 minutos. Contrariamente ao pico inicial de cálcio, cada um destes picos secundários é precedido por um ligeiro aumento da concentração intracelular do cálcio livre, a que se segue um aumento

brusco assim que é atingido um determinado limiar da concentração intracelular do cálcio livre. Apesar da amplitude dos picos de cálcio decrescer com o tempo, estas oscilações podem durar por várias horas após a fertilização (8-11) (Fig. 2).

Ainda que o pico inicial de cálcio em resposta à entrada do espermatozóide seja independente do cálcio extracelular, os picos subsequentes requerem a presença do cálcio extracelular. Uma possível explicação para esta dependência do cálcio extracelular reside no facto do cálcio que dá origem ao primeiro pico ser de origem interna. O cálcio interno encontra-se armazenado em reservatórios intracelulares e após ser libertado para o citosol é depois expelido para o meio extracelular. O influxo extracelular de cálcio é então requerido para repletar os reservatórios intracelulares, que são depois usados para as subsequentes oscilações de cálcio (12-15).

O padrão das oscilações de cálcio induzido pela fertilização varia consoante a espécie. Por exemplo, nos bo-

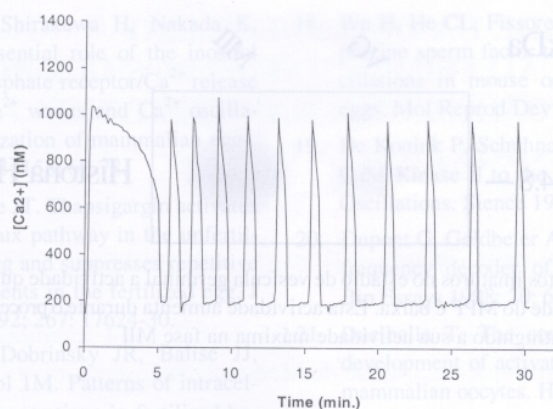


Fig. 2 – Oscilações de cálcio induzidas pelo espermatozóide na fertilização de ovócitos de ratinho

vinos, a duração das oscilações de cálcio é maior mas, no entanto, a sua frequência é menor comparativamente a outras espécies como a do ratinho, hamster, coelho, porco, e humano (9,10,13,16-18). As implicações biológicas desta variação entre espécies ainda não é conhecida. Contudo, estudos conduzidos em células somáticas revelaram que a frequência das oscilações de cálcio poderá funcionar como um sistema de descodificação de mensagens (19,20).

FUNÇÃO DAS OSCILAÇÕES DE CÁLCIO NA ACTIVAÇÃO DO OVÓCITO

As oscilações de cálcio têm um papel fundamental durante a activação dos ovócitos. A activação dos ovócitos dos roedores pode ser estimulada partenogeneticamente por agentes como o etanol, os ionóforos do cálcio, ou por injeção directa de cálcio. Contudo, estes agentes induzem um pico único de cálcio, sendo apenas efectivos na activação de ovócitos envelhecidos *in vitro* após a ovulação (cultura por 24-48 horas na ausência de fertilização) (5,21). A activação partenogenética eficiente de ovócitos

ovulados recentemente tem que ser acompanhada do tratamento com inibidores da síntese proteica ou das proteínas quinase, de modo a permitir a inactivação sustentada do “Maturation Promoting Factor” ou MPF, uma vez que o pico único de cálcio induzido pelos agentes partenogenéticos tem apenas a capacidade de inactivar temporariamente o MPF (22). O MPF é um complexo proteico formado pela associação entre a p34^{cdc2} (subunidade catalítica), e a ciclina-B (subunidade reguladora) a qual é responsável pela actividade quinase da p34^{cdc2}, também referida como actividade quinase H1, e que é máxima durante a fase MII (23) (Fig. 3). Apenas agentes como o estrôncio, o qual se liga e activa o local de ligação ao cálcio no receptor do inositol trifosfato (IP₃R) (24,25), ou a estimulação por pulsos eléctricos repetidos, os quais induzem múltiplas oscilações de cálcio, similares às da fertilização, permitem a activação de ovócitos ovulados recentemente, confirmando a necessidade de persistentes oscilações de cálcio na activação dos ovócitos de mamíferos (26).

Foi também demonstrado que as oscilações de cálcio têm um papel importante na exocitose das vesículas corticais e na retoma e terminação da



Fig. 4 – A microinjeção de 1 mg/ml de SF em ovócitos na fase MII, que inicia oscilações de cálcio semelhantes àquelas induzidas pela fertilização, induz activação e divisão celular até ao estágio de 2 células. Mas, a microinjeção de 15 mg/ml de SF, que inicia oscilações de cálcio de elevada amplitude e frequência, induz fragmentação e bloco da divisão celular. Forças de contraste de fase obtidas de embriões de 2 células obtidos pela fertilização *in vivo* (A), pela microinjeção de 1 mg/ml de SF (C), e pela microinjeção de 15 mg/ml de SF (E), após cultura por 24h

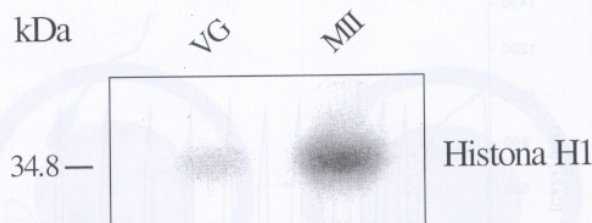


Fig. 3 – Em ovócitos imaturos no estágio de vesícula germinal a actividade quinase H1 que reflete a actividade do MPF é baixa. Esta actividade aumenta durante o processo de maturação do ovócito, atingindo a sua actividade máxima na fase MII

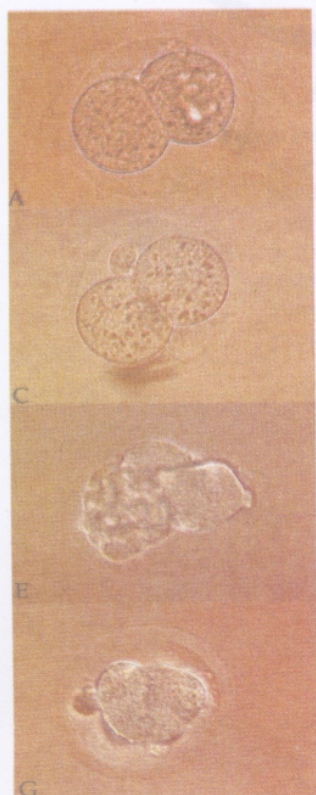


Fig. 4 – A microinjecção de 1 mg/ml de SF em ovócitos na fase MII, que inicia oscilações de cálcio semelhantes àquelas induzidas pela fertilização, induz activação e divisão celular até ao estágio de 2 células. Mas, a microinjecção de 15 mg/ml de SF, que inicia oscilações de cálcio de elevada amplitude e frequência, induz fragmentação e bloqueio da divisão celular. Fotografia de contraste de fase de embriões de 2 células obtidos pela fertilização *in vivo* (A), pela microinjecção de 1 mg/ml de SF (C), e pela microinjecção de 15 mg/ml de SF (E, G), após cultura por 24h

meiose do ovócito. Através da manipulação da frequência e duração das oscilações de cálcio por pulsos eléctricos, verificou-se também que o número de picos de cálcio determina o tempo que decorre até à formação dos pronúcleos (27), bem como o número de células do botão embrionário do blastocisto (28), sugerindo que as oscilações de cálcio induzidas na activação do ovócito podem alterar mais tarde o rumo embrionário, favorecendo quer o desenvolvimento, quer a apoptose (29). Resultados similares foram demonstrados nos humanos, em que, só os embriões com determinada frequência de picos de cálcio apresentavam capacidade de desenvolvimento (11).

CONCLUSÕES

A activação do ovócito implica diversos eventos, que incluem o bloqueio à polispermia, a retoma e finalização da meiose ovocitária, a formação dos pronúcleos feminino e masculino, e a actividade metabólica do zigoto. Na base destes eventos está uma cascata de fosforilações proteicas mediadas por oscilações de cálcio. As oscilações de cálcio são tão importantes neste contexto que lhes foi sugerida a função de tipo linguagem interna, em que uma frequência adequada conduz à formação de um embrião

funcional, enquanto que um excesso da frequência conduz à apoptose, fragmentação e paragem do desenvolvimento embrionário (Fig. 4).

Agradecimentos

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

A correspondência deverá ser enviada para:
Ana Carla Gordo, PhD.
Instituto Bioquímica/Unidade Biopatologia Vascular
IMM, Faculdade de Medicina de Lisboa
E mail: npp13136@mail.telepac.pt

Referências

1. Nuccitelli R. How do sperm activate eggs? *Curr Top Dev Biol* 1991; 25: 1-16.
2. Wassarman PM. Regulation of mammalian fertilization by zona pellucida glycoproteins. *J. I Reprod. Fertil. Suppl* 1990; 42: 79-87.
3. Jaffe LF. Sources of calcium in egg activation: a review and hypothesis. *Dev Biol* 1983; 99: 265-76.
4. Busa WB, Nuccitelli R. An elevated free cytosolic Ca^{2+} wave follows fertilization in eggs of the frog, *Xenopus laevis*. *J Cell Biol* 1985; 100: 1325-9.
5. Cuthbertson KS, Whittingham DG, Cobbold PH. Free Ca^{2+} increases in exponential phases during mouse oocyte activation. *Nature* 1981; 294: 754-7.
6. Cuthbertson KS, Cobbold PH. Phorbol ester and sperm activate mouse oocytes by inducing sustained oscillations in cell Ca^{2+} . *Nature* 1985; 316: 541-2.

7. Miyazaki S, Shirakawa H, Nakada K, Honda Y. Essential role of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor/ Ca^{2+} release channel in Ca^{2+} waves and Ca^{2+} oscillations at fertilization of mammalian eggs. *Dev Biol* 1993; 158: 62-78.
8. Kline D, Kline JT. Thapsigargin activates a calcium influx pathway in the unfertilized mouse egg and suppresses repetitive calcium transients in the fertilized egg. *J Biol Chem* 1992; 267: 17624-30.
9. Fissore RA, Dobrinsky JR, Balise JJ, Duby RT, Robl JM. Patterns of intracellular Ca^{2+} concentrations in fertilized bovine eggs. *Biol Reprod* 1992; 47: 960-9.
10. Sun FZ, Hoyland J, Maxson X, Moor RM. A comparison of intracellular changes in porcine eggs after fertilization and electroactivation. *Development* 1992; 115: 947-95.
11. Sousa M, Barros A, Tesarik J. Developmental changes in calcium dynamics, protein kinase C distribution and endoplasmic reticulum organization in human preimplantation embryos. *Mol Hum Rep* 1996c; 2: 967-977.
12. Igusa Y, Miyazaki S. Effects of altered extracellular and intracellular calcium concentration on hyperpolarizing responses of the hamster egg. *J Physiol* 1983; 340: 611-32.
13. Sousa M, Barros A, Tesarik J. The role of ryanodine-sensitive Ca^{2+} stores in the Ca^{2+} oscillation machine of human oocytes. *Mol Hum Reprod* 1996a; 2: 265-72.
14. Sousa M, Barros A, Mendoza C, Tesarik J. Effects of protein kinase C activation and inhibition on sperm-, thimerosal-, and ryanodine-induced calcium responses of human oocytes. *Mol Hum Reprod* 1996b; 2: 699-708.
15. Sousa M, Barros A, Silva J, Tesarik J. Developmental changes in calcium content of ultrastructurally distinct subcellular compartments of preimplantation human embryos. *Mol Hum Reprod* 1997; 3: 83-90.
16. Miyazaki S, Yuzaki M, Nakada K et al. Block of Ca^{2+} wave and Ca^{2+} oscillation by antibody to the inositol, 4,5-trisphosphate receptor in fertilized hamster eggs. *Science* 1992; 257: 251-5.
17. Fissore RA, Robl JM. Sperm, inositol trisphosphate, and thimerosal-induced intracellular Ca^{2+} elevations in rabbit eggs. *Dev Biol* 1993; 159: 122-30.
18. Wu H, He CL, Fissore RA. Injection of a porcine sperm factor triggers calcium oscillations in mouse oocytes and bovine eggs. *Mol Reprod Dev* 1997; 46: 176-89.
19. De Konink P, Schuhnan H. Sensitivity of CaM Kinase II to the Frequency of Ca^{2+} Oscillations. *Science* 1998; 279: 227-230.
20. Dupont G, Goldbeter A. CaM kinase II as frequency decoder of Ca^{2+} oscillations. *Bio Essays* 1998; 20: 607-610.
21. Ducibella T. The cortical reaction and development of activation competence in mammalian oocytes. *Hum Reprod Update* 1996; 2: 29-42.
22. Collas P, Chang T, Long C, Robl JM. Inactivation of histone H1 kinase by Ca^{2+} in rabbit oocytes. *Mol Reprod Dev* 1995; 40: 253-8.
23. Draetta G, Beach D. Activation of cdc2 protein kinase during mitosis in human cells: cell cycle-dependent phosphorylation and subunit rearrangement. *Cell* 1988; 54: 17-26.
24. Marshal IC, Taylor CW. Two calcium-binding sites mediate the interconversion of liver inositol 4,5-trisphosphate receptors between three conformational states. *Biochem J* 1994; 301: 591-598.
25. Brind S, Swann, K Carroll, J. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors are down-regulated in mouse oocytes in response to sperm or adenophostin A but not to increases in intracellular Ca^{2+} or egg activation. *Dev Biol* 2000; 223: 251-65.
26. Lawrence Y, Ozil JP, Swann K. The effects of a Ca^{2+} chelator and heavy-metal-ion chelators upon Ca^{2+} oscillations and activation at fertilization in mouse eggs suggest a role for repetitive Ca^{2+} increases. *Biochem J* 1998; 335: 335-42.
27. Ozil JP, Swann K. Stimulation of repetitive calcium transients in mouse eggs. *J Physiol* 1995; 483: 331-46.
28. Bos-Mikich A, Whittingham DG, Jones KT. Meiotic and mitotic Ca^{2+} oscillations affect cell composition in resuming blastocysts. *Dev Biol* 1997; 182: 172-9.
29. Gordo AC, Wu H, He CL, Fissore RA. Injection of sperm cytosolic factor mouse metaphase II oocytes induces different developmental fates according to the frequency of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ oscillations and oocyte age. *Biol Reprod* 2000; 62: 1370-1379.

