

JOSIANE APARECIDA ANDRADE DO NASCIMENTO

**EFEITO DA ADIÇÃO DE LEVONORGESTREL SOBRE
A REAÇÃO ACROSSOMAL DE ESPERMATOZÓIDES
DE HOMENS FÉRTEIS**

Dissertação de Mestrado

ORIENTADOR: Prof. Dr. LUIS GUILLERMO BAHAMONDES

**UNICAMP
2002**

JOSIANE APARECIDA ANDRADE DO NASCIMENTO

**EFEITO DA ADIÇÃO DE LEVONORGESTREL SOBRE
A REAÇÃO ACROSSOMAL DE ESPERMATOZÓIDES
DE HOMENS FÉRTEIS**

Dissertação de Mestrado apresentada à
Pós-Graduação da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do Título de
Mestre em Tocoginecologia, área de
Ciências Biomédicas

ORIENTADOR: Prof. Dr. LUIS GUILLERMO BAHAMONDES

**UNICAMP
2002**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

N17e

Nascimento, Josiane Aparecida Andrade do
Efeito da adição de levonorgestrel sobre a reação
acrossomal de espermatozóides de homens férteis /
Josiane Aparecida Andrade do Nascimento. Campinas,
SP : [s.n.], 2002.

Orientador: Luis Guillermo Bahamondes
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. *Contracepção. 2. *Anticoncepção de emergência.
3. Espermatozóides. 4. Dispositivos intrauterinos. I. Luis
Guillermo Bahamondes. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluna: JOSIANE APARECIDA ANDRADE DO NASCIMENTO

Orientador: Prof. Dr. LUIS GUILLERMO BAHAMONDES

Membros:

1.

2.

3.

**Curso de Pós-Graduação em Tocoginecologia da Faculdade
de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas**

Data: 18/11/2002

Dedico este trabalho

aos meus queridos pais, Dejalma e Celeste,

e ao meu amado marido, André Luiz.

*São essas pessoas maravilhosas e únicas que constituem os
alicerces de minha vida, e que estão e sempre estiveram
presentes dando-me apoio, incentivo e força para que eu
pudesse prosseguir meu caminho.*

Nada seria possível sem eles...

Agradecimentos

Agradeço ao Dr. Luis Bahamondes, meu orientador, a oportunidade de realização deste trabalho e também a orientação e apoio que sempre recebi. Foi uma honra ter sido orientanda do Dr. Luis, e dele ter recebido exemplos de profissionalismo, competência, disciplina, generosidade, dedicação e ética. Qualidades estas intrínsecas de sua personalidade e que penso serem necessárias para a formação de bons pesquisadores.

Agradeço à Dra. Maria José Munuce pela amizade, pela sua prontidão e boa vontade para ajudar-me em todas as fases deste projeto, e por ter-me ensinado e compartilhado comigo todos os conhecimentos científicos deste trabalho, sem os quais a execução do mesmo ficaria comprometida. Expresso minha gratidão e respeito à Dra. Maria José através da grande admiração que sinto pela sua pessoa.

Sou grata também ao Dr. Aníbal Faúndes pelos seus ricos comentários e sua ampla visão científica, que me trouxeram novos conhecimentos e melhoraram minha percepção da ciência.

Agradeço ao Dr. Francisco Fazano e à Mara de Lúcio, ambos responsáveis pelo Laboratório de Reprodução Humana - CAISM, pelo fato de terem me recebido no Laboratório, onde aprendi grande parte da metodologia necessária para o trabalho na área e onde realizei este estudo. Ao Dr. Francisco Fazano também agradeço pela participação na elaboração deste estudo, o auxílio que dele recebi para a aquisição dos materiais e equipamentos e por ter buscado e me oferecido

condições ideais para a realização deste trabalho. Também agradeço a amizade e a convivência diária com a Mara e com as auxiliares do Laboratório, a Nicéia e a Nina, que além de executarem suas respectivas atividades, sempre me ofereceram ajuda na execução do meu trabalho, cuidados que visavam ao meu bem-estar, e também me proporcionaram momentos de muitos risos. Ao Carlos, secretário do Laboratório de Reprodução Humana, também manifesto meu agradecimento pela ajuda que recebi no trabalho.

Expresso também minha gratidão a todos os voluntários que participaram deste estudo, e às suas respectivas esposas.

Agradeço à Márcia do Centro de Engenharia Biomédica por toda assistência oferecida, pela sua boa vontade e amizade. Agradeço também o suporte técnico que recebi do Lúcio, do Moacir e do Alexandre, funcionários da Unidade de Informática (CPD) do CAISM.

Agradeço pela amizade e auxílio que recebi da Márcia, do Ricardo, da Yvone e do André, e de todas as pessoas que conheci na Secretaria da Área da Ginecologia do CAISM.

Com o propósito de não me esquecer de ninguém, agradeço de modo geral a boa convivência que tive com todas as pessoas que cursaram comigo as disciplinas da pós-graduação, e em especial menciono a amizade que fiz com a Dra Kate e com a Dra Rozany, amigas pelas quais criei grande afinidade e admiração.

Também sou grata ao bom tratamento que sempre recebi de todas as pessoas que trabalham no CEMICAMP, e destaco aqui aquelas com quem tive maior contato durante a realização deste estudo, e que são a Fátima, a Ximena, a Margarete, a Cecília, a Maria Helena, a Márcia Alice, a Jussara, a Vilma e a Cecília.

Agradeço à Maria Helena pela execução das análises estatísticas deste projeto e pela atenção que recebi.

Em especial agradeço às secretárias Verônica e Margarete pela competência de ambas, além da sempre simpatia e disposição para me apoiarem e prestarem ajuda em tudo que foi preciso.

Sou grata ao Dr. Carlos Alberto Petta pela ajuda recebida na obtenção de várias referências bibliográficas.

Agradeço ao Dr. Marcos Perrotti e ao Dr. Antero Perdigão pelas solicitações e conselhos que me foram feitos, e também pelos seus respectivos comentários na ocasião da qualificação, os quais promoveram melhorias neste trabalho.

Agradeço ao Prof. Dr. Luís Violin e à Profa. Dra. Maria do Carmo, ambos docentes do Departamento de Embriologia e Histologia no Instituto de Biologia da Unicamp, porque me mostraram o fascínio do trabalho, que hoje realizo, através da tão bem ministrada disciplina da graduação. Ao Prof. Dr. Luís Violin, também agradeço pelas sugestões feitas no exame de qualificação.

Meus agradecimentos também são dedicados à Profa. Dra. Dora e à sua orientanda Elaine, ambas do Departamento de Fisiologia e Biofísica no Instituto de Biologia da Unicamp, pela generosidade e ajuda mostradas através do empréstimo de um reagente essencial para meu trabalho.

Sou grata também à Dra Cecília, chefe do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, pela sua bondade e também por ter-me autorizado o uso do microscópio de fluorescência.

Agradeço o auxílio que recebi da Maria do Carmo, do Rogério, do Vanderlei, do Dr. Handall, da Fátima, da Flávia, da Dona Geralda (a Gê), da Lucinha, e de todas as pessoas que conheci no Departamento de Anatomia Patológica. Agradeço principalmente a atenção e amizade que recebi da Lucinha e da Dona Gê, que, além de serem pessoas solícitas e bondosas, mostraram-se carismáticas, amigas e acolhedoras, capazes de transformarem os convites para um café em momentos valiosos de revigoração, aos quais sempre serei grata.

Agradeço também à Sueli Chaves e à equipe da ASTEC pela correção e editoração deste trabalho.

Agradeço muito a todas pessoas de minha família, pela harmonia em que vivemos, pelo respeito mútuo e pelo carinho que temos uns pelos outros. Qualidades estas que tornam minha família especial e que sempre me confortaram, dando-me equilíbrio, força, tranqüilidade e segurança.

Aos meus pais, Dejalma e Celeste, agradeço tudo o que eles sempre fizeram. Sou grata pelo grande exemplo que eles são para mim, e por todas as oportunidades e cuidados que sempre deles recebi. Agradeço principalmente por tê-los como meus pais, porque isso significa muito para mim.

Por fim, sou especialmente grata ao André, meu marido, grande amigo e companheiro que, dia após dia, acompanhou minha trajetória e esteve sempre presente pronto para ajudar-me em tudo que foi preciso. Agradeço acima de tudo o amor incondicional que dele recebi, além do apoio, do cuidado, da atenção, do carinho, da compreensão e do incentivo, sem os quais eu jamais teria chegado até onde cheguei.

Agradeço a todas as pessoas, inclusive aquelas que por falha de minha memória não foram aqui mencionadas, que contribuíram de algum modo para a concretização deste trabalho.

Agradecimentos Institucionais

*Sou grata ao Fundo de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo - **FAPESP**, pelo financiamento concedido com o auxílio pesquisa.*

*Agradeço ao Centro de Pesquisas Materno-Infantis de Campinas - **CEMICAMP**, pelo apoio institucional na execução deste trabalho.*

*Agradeço à **Leiras Oy.** pela participação no financiamento do estudo.*

*Menciono minha gratidão à empresa farmacêutica **SCHERING** pela obtenção do **Levonorgestrel**.*

*Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – **CAPES** pela concessão da bolsa de mestrado.*

Sumário

Símbolos, Siglas e Abreviaturas	
Resumo	
Summary	
1. Introdução	17
2. Objetivo	33
2.1. Objetivo	33
3. Sujeitos e Métodos.....	34
3.1. Desenho do estudo	34
3.2. Tamanho da amostra	34
3.3. Critérios de inclusão e exclusão das amostras.....	35
3.3.1. Critérios de inclusão.....	35
3.3.2. Critérios de exclusão.....	35
3.4. Procedimentos	36
3.5. Análises estatísticas.....	42
3.6. Aspectos éticos	42
4. Resultados	43
4.1. Padronização das condições de incubação <i>in vitro</i>	43
4.2. Efeito do LNG sobre a reação acrossomal	47
5. Discussão.....	50
6. Conclusões	58
7. Referências Bibliográficas.....	59
8. Bibliografia de Normatizações	72
9. Anexos	73
9.1. Anexo 1 - Termo de consentimento informado.....	73
Anexo 2 - Esquema geral do projeto	75

Símbolos, Siglas e Abreviaturas

AE	Anticoncepção de emergência
AR	<i>Acrosome reaction</i>
BSA	Albumina de Soro Bovino
CAISM	Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CONEP	Conselho Nacional de Ética em Pesquisa
DIU	Dispositivo intra-uterino
FF	Fluido Folicular
FITC-PSA	Fluoresceína isotiocianato conjugada com a lectina <i>Pisum sativum</i>
g	Força gravitacional
GnRH	Hormônio Liberador de Gonadotrofina
HTF	Meio de cultura <i>Human Tubal Fluid</i>
LNG	Levonorgestrel
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Solução tampão de fosfato
SIU-LNG	Sistema intra-uterino liberador de Levonorgestrel
UV	Ultra-violeta
WHO	World Health Organization

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do progestógeno Levonorgestrel (LNG) sobre a reação acrossomal dos espermatozóides *in vitro*. Quatro homens com fertilidade comprovada foram convidados a participar. Foi requerida a cada um deles a obtenção de amostras de sêmen, colhidas através de masturbação em intervalos de sete ou 14 dias. Após realização da análise de rotina do sêmen, os espermatozóides móveis foram separados do líquido seminal por duas centrifugações consecutivas com solução tampão de fosfato (PBS) e descarte do material sobrenadante e posterior acréscimo, sobre o *pellet* resultante, de meio *Human Tubal Fluid (HTF)* suplementado com 35mg/ml de albumina de soro bovino (BSA) segundo a técnica de *swim-up*. Após a migração dos espermatozóides para o meio de cultura no período de uma hora, os mesmos foram incubados durante 20 horas em estufa de cultura, com temperatura e concentração de CO₂ controladas para a ocorrência da capacitação espermática. Após esta incubação, a amostra passou por nova análise de concentração, motilidade e vitalidade e foi dividida em sete alíquotas, as quais receberam respectivamente meio HTF, fluido folicular (FF), uma das quatro

concentrações diferentes de LNG ou Etanol (o diluente do LNG). Após incubação dos tratamentos por 15 e 30 minutos, as amostras receberam alíquotas do corante supravital Hoescht 33258 (bis-Benzimide) e as lâminas foram confeccionadas para posterior coloração com fluoresceína isotiocianato conjugada com a lectina de *Pisum sativum* (FITC-PSA) e leitura da taxa de espermatozóides com reação acrossomal. A leitura da reação acrossomal foi realizada de tal forma que o leitor desconhecia qual dos tratamentos em questão estava sendo avaliado. Somente os espermatozóides vivos, segundo a coloração supravital do Hoescht, foram examinados em relação ao *status* acrossomal exibido após a exposição aos diferentes tratamentos. Os resultados de cada série de tubos com os diferentes meios agregados foram comparados através da análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas, seguida do teste não-paramétrico de Wilcoxon para amostras pareadas. Os resultados mostraram, em primeiro lugar, que o LNG e o Etanol não produziram efeito tóxico sobre os espermatozóides, ao menos durante os 30 minutos analisados. Também que nas condições do estudo os espermatozóides capacitaram-se e responderam à indução com o FF. Quando os espermatozóides capacitados foram expostos por 30 minutos às concentrações de 0,64 μ M, 1,28 μ M, 2,56 μ M e 32 μ M de LNG houve um aumento estatisticamente significativo da taxa de reação acrossomal em relação ao HTF. Entretanto, os valores de indução obtidos pelo FF (controle positivo) resultaram sempre estatisticamente superiores quando comparados aos valores do progestógeno em todas as concentrações estudadas. Considerando que os espermatozóides perdem a capacidade de interagir com o oócito após

sofrerem a reação acrossomal, o efeito do LNG poderia resultar em uma indução prematura desse processo nos espermatozoides capacitados, diminuindo assim o potencial fértil. Concluiu-se que talvez este efeito do LNG poderia ser um dos mecanismos de ação possíveis do sistema intra-uterino liberador do LNG, auxiliando assim a compreensão da alta eficácia contraceptiva deste método.

Summary

The aim of this study was to evaluate the effect of levonorgestrel (LNG) on the occurrence of acrosome reaction (AR) on capacitated spermatozoa from fertile men. Twenty semen samples from four fertile men were evaluated. Spermatozoa were separated by swim-up, and were incubated for 20 hours under capacitating conditions. Capacitated spermatozoa were exposed to either four different concentrations of LNG (200, 400, 800, 10.000 ng/ml), follicular fluid (20 % v/v), ethanol or human tubal fluid medium (HTF) as control. The rate of AR and the ratio of live/dead spermatozoa were assessed after 15 and 30 minutes of incubation at 37°C and 5% CO₂. The different treatments were compared with follicular fluid and HTF medium as controls. The rate of AR after 15 minutes of exposure was significantly higher with follicular fluid than all other treatments with the exception of LNG at 200 ng/ml. At 30 minutes of exposure, follicular fluid induces significantly higher rate of acrosome reaction than the other treatments. Nevertheless, the four LNG concentrations induce greater rate of AR than HTF and ethanol used as a control. High LNG concentration induces

higher AR rate. In conclusion, the addition of LNG *in vitro* to capacitated human spermatozoa was able to increase the rate of acrosome-reacted spermatozoa respect to those incubated in control medium, although lower than induce by follicular fluid.

1. Introdução

No processo denominado fertilização, muito fatores estão envolvidos e abrangem desde a formação do oócito e do espermatozóide até aos mecanismos para interação e fusão entre ambos (GARCIA *et al.*, 1991). Nos mamíferos, em especial, ocorrem mudanças complexas na membrana do espermatozóide durante este processo (FLESCH e GADELLA, 2000).

Durante a ovulação, um oócito é liberado do ovário e capturado pelas fímbrias da tuba uterina que recobrem esse órgão. O oviducto humano, denominado de trompa de Falópio, é um órgão tubular sero-muscular unido de forma distal ao ovário e de forma proximal ao útero (HAFEZ, 1978; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1995). Dentro do oviducto, na luz oviductal, ocorrem o transporte do oócito e do espermatozóide, a fertilização e os primeiros estágios de clivagem do pré-embrião (YANAGIMACHI, 1988). A utilização de modelos animais tem permitido demonstrar que o oviducto, além de transportar e abrigar os espermatozóides, também os selecionam e os capacitam para que somente uma subpopulação específica manifeste sua capacidade fertilizante (SYROP e

HALME, 1987; SMITH e YANAGIMACHI, 1989; BARRAT e COOKE, 1991; MORTIMER, 1995). A trompa de Falópio está revestida por dois tipos de células: as ciliadas e as secretoras. As primeiras predominam na fímbria e na ampola, enquanto que as segundas predominam no istmo. A composição química do fluido oviductal é resultante da secreção celular e também da transdução dos componentes séricos (que são máximos no período ovulatório) (LIPPES *et al.*, 1981; LEESE e GRAY, 1985; LEESE, 1988, LIPPES e WAGH 1989). Existem componentes químicos específicos no fluido oviductal, tais como as proteínas taurina e hipotaurina (FELLMAN *et al.*, 1987; HUXTABLE, 1992), o HCO_3^- (OKAMURA *et al.*, 1987) e a progesterona, que possuem comprovada atividade moduladora dos gametas. O oviducto também secreta, de maneira estrógeno-dependente, proteínas específicas denominadas oviductinas cujas funções são a de facilitar a união entre oócito e espermatozóide (VERHAGE *et al.*, 1988; MALLETTE *et al.*, 1995; BOATMAN, 1997).

O oócito liberado na ovulação encontra-se circundado pela zona pelúcida, mais externamente pelas células da corona radiata e ao redor delas, algumas vezes há células do *cumulus oophorus*. A zona pelúcida consiste em uma camada homogênea, acelular e acidófila, rica em glicoproteínas (GARCIA *et al.*, 1991). Esta camada está associada com o evento de interação entre o oócito e o espermatozóide, e será responsável pelo desencadeamento do estímulo fisiológico, no espermatozóide, da reação acrossomal. A resposta do espermatozóide a esse estímulo irá permitir que ele penetre e fecunde o oócito (FLESCH e GADELLA, 2000).

As células foliculares que constituem tanto a corona radiata quanto as poucas células do *cumulus oophorus* são impregnadas pela progesterona, esteróide capaz de desencadear o estímulo fisiológico da reação acrossomal em uma pequena população de espermatozóides que possuem o receptor de membrana específico para a progesterona (MEIZEL e TURNER, 1996; CHENG *et al.*, 1998; LUCONI *et al.*, 1998; SIRIVADYAPONG *et al.*, 1999; FLESCHE e GADELLA, 2000). TESARIK *et al.* (1992) observaram que apenas 10% a 30% dos espermatozóides apresentaram receptores para a progesterona, e também especularam que talvez seja essa a subpopulação de espermatozóides capaz de sofrer a capacitação e posteriormente fertilizar.

A dose fisiológica de progesterona estimada ao redor do oócito logo após a ovulação é de 0,3µg/ml, e esta concentração está em uma faixa-dose apropriada para desencadear a reação acrossomal nos espermatozóides (BLACKMORE *et al.*, 1990; FLESCHE e GADELLA, 2000).

A progesterona presente nessa matriz que rodeia o oócito também tem sido relatada como promotora de alterações nas funções espermáticas relacionadas com a fertilização, como os fenômenos de capacitação, ativação espermática, reação acrossomal, ligação do espermatozóide na zona pelúcida e penetração no oócito (OSMAN *et al.*, 1989; BLACKMORE *et al.*, 1990; SUELDO *et al.*, 1993; OEHNINGER *et al.*, 1994; BALDI *et al.*, 1998; BRAY *et al.*, 1999; BALDI *et al.*, 2000).

Tanto o *cumulus oophorus* como as células foliculares da corona radiata devem ser atravessados pelo espermatozóide para que ele possa atingir a zona pelúcida, e, nesse ponto, interagir especificamente com o oócito previamente à sua penetração.

Durante a espermiogênese, um processo intrínseco da espermatogênese, o gameta masculino passa por uma série de transformações para tornar-se maduro. É durante esse processo que o acrossoma, uma organela crucial para o processo de fertilização, é formado. O acrossoma dos espermatozóides é derivado do complexo de Golgi e forma um capuz na região anterior do núcleo. Contém muitas enzimas hidrolíticas e é limitado anteriormente pelo capuz e posteriormente por uma região chamada segmento equatorial (GARCIA *et al.*, 1991; YANAGIMACHI, 1994).

O acrossoma dos espermatozóides de mamíferos passa por exocitose (liberação de vesículas com o conteúdo acrossomal) após receber um estímulo apropriado antes da fecundação. Esse evento, denominado reação acrossomal, é necessário para a penetração do espermatozóide através da zona pelúcida do oócito, e consiste na fusão da membrana acrossomal com a membrana plasmática do espermatozóide, liberando com isso o conteúdo acrossomal (CROSS *et al.*, 1986; YANAGIMACHI, 1994; RISOPATRÓN *et al.*, 2001).

As enzimas hidrolíticas do conteúdo acrossomal, secretadas no meio extracelular, dissolvem a matriz da zona pelúcida localmente, assegurando

assim a posterior penetração do espermatozóide na membrana do oócito (LANOS *et al.*, 1993; SZASZ *et al.*, 2000).

A reação acrossomal *in vivo* ocorre através da interação do espermatozóide com a proteína ZP3 localizada na zona pelúcida do oócito e somente os espermatozóides capacitados são fisiologicamente capazes de desencadear a reação acrossomal em resposta a um estímulo fisiológico. Na ausência de um estímulo fisiológico, apenas uma baixa porcentagem de espermatozóides libera o conteúdo de seus acrossomas (LEYTON e SALING, 1989; WASSARMAN, 1992; YANAGIMACHI, 1994; BALDI *et al.*, 2000).

Há questionamentos em relação ao momento em que a reação acrossomal ocorre durante o processo de fertilização, uma vez que tanto a progesterona presente na matriz do oócito quanto a ligação do espermatozóide na zona pelúcida podem ativar a via de sinalização que conduz à reação acrossomal (BLACKMORE *et al.*, 1990; FLESCHE e GADELLA, 2000).

Tem sido proposta a existência de uma interação coordenada entre a progesterona e a ZP3 para iniciarem a reação acrossomal. O papel atribuído à progesterona poderia ser o de promover a reação acrossomal precoce em muitos espermatozóides (BLACKMORE *et al.*, 1990).

Somente um espermatozóide será fecundante, mas provavelmente os outros que também atingem a corona radiata do oócito auxiliam no processo de fertilização, pois, estimulados pela concentração de progesterona presente nessa camada, liberam nesse ponto seus respectivos conteúdos acrossomais

(ou seja, desencadeiam a reação acrossomal), cuja ação facilita a passagem dos outros espermatozoides através dessa camada. Muitos espermatozoides também chegam a tocar a zona pelúcida mas, somente um, após desencadear a reação acrossomal, apropriada nesse ponto, consegue penetrar no oócito (BLACKMORE *et al.*, 1990; GARCIA *et al.*, 1991).

Aqueles espermatozoides que completaram a reação acrossomal “precocemente” tornam-se incapazes de penetrar na zona pelúcida pelo fato de já terem perdido seus conteúdos acrossomais, e assim tornam-se inférteis (BLACKMORE *et al.*, 1990; FLESCHE e GADELLA, 2000).

Vale observar que a possibilidade de se manipular o fenômeno da reação acrossomal é uma vantagem potencial, uma vez que tal reação é uma etapa necessária para o processo de fertilização (ROBLERO *et al.*, 1988).

O estudo da capacidade do espermatozoide desencadear ou não reação acrossomal após um estímulo fisiológico, tem sido apontado como um bom parâmetro na avaliação de pacientes inférteis (RISOPATRÓN *et al.*, 2001). A diferença entre a reação acrossomal espontânea, estimada entre 5% a 7% em uma amostra de sêmen normal, e a reação acrossomal induzida é um bom valor prognóstico para a avaliação da capacidade fertilizante do espermatozoide (WHO, 1992; HENKEL *et al.*, 1993).

Além da reação acrossomal, um outro processo denominado capacitação espermática também é de fundamental importância na fertilização do oócito pelo espermatozoide (BALDI *et al.*, 2000).

A capacitação consiste em mudanças bioquímicas e fisiológicas que ocorrem nos espermatozóides durante o trajeto deles no trato genital feminino, necessárias para fornecer aos espermatozóides ejaculados a competência para eles interagirem de forma específica com o oócito e fertilizá-lo (FLORMAN e FIRST, 1988; YANAGIMACHI, 1994; BALDI *et al.*, 2000; FLESCHE e GADELLA, 2000).

A capacitação induz mudanças na membrana plasmática do espermatozóide que aumentam a afinidade pela zona pelúcida (FLESCHE *et al.*, 1999; FLESCHE e GADELLA, 2000; TÖPFER-PETERSEN *et al.*, 2000). Assim, os espermatozóides de mamíferos serão incapazes de fertilizar o oócito até que passem pela capacitação (YANAGIMACHI, 1994; FRASER, 1998; IBORRA *et al.*, 2000).

A superfície dos espermatozóides ejaculados é rodeada por algumas moléculas denominadas “fatores decapacitantes”, que irão conservar o estado não capacitado dos espermatozóides até elas serem completamente liberadas. Esses fatores associados com os espermatozóides são progressivamente liberados durante a capacitação (BALDI *et al.*, 2000), e modulam a mesma conduzindo os espermatozóides para a capacidade máxima fertilizante somente no local da fecundação (FRASER, 1999).

O processo da capacitação está associado com o desenvolvimento de um padrão distinto de motilidade do espermatozóide, chamado hiperativação, o qual é caracterizado por uma trajetória não linear do espermatozóide, com um pronunciado movimento do flagelo, somado com um movimento lateral da

cabeça do espermatozóide. O desenvolvimento dessa motilidade hiperativada é relacionado com mudanças bioquímicas e biofísicas ocorridas durante a capacitação (YANAGIMACHI, 1994; BALDI *et al.*, 2000).

Essa motilidade hiperativada que o espermatozóide desenvolve durante a capacitação não apenas o habilita para interagir e penetrar no oócito, como também pode ser necessária para a sua colisão com o oócito, auxiliando a adesão entre os dois gametas (THALER e CARDULLO, 1996). Com a hiperativação, os acrossomas dos espermatozoides começam a desestabilizar-se na preparação para a reação acrossomal (IBORRA *et al.*, 2000).

Uma manifestação adicional da capacitação espermática é o espermatozóide poder desencadear reação acrossomal em resposta a um estímulo fisiológico, como o da proteína ZP3 da zona pelúcida ou da progesterona. A resposta do espermatozóide aos estímulos que conduzem à reação acrossomal aumenta durante a capacitação, garantindo que a resposta máxima seja dada no local da fecundação (BALDI *et al.*, 2000; FLESCH e GADELLA, 2000).

Também, o aumento na concentração intracelular do íon cálcio é um evento bioquímico totalmente caracterizado durante a capacitação (BALDI *et al.*, 1991; YANAGIMACHI, 1994; GARCIA e MEIZEL, 1999; FLESCH e GADELLA, 2000).

Esse íon possui um papel central no processo de fusão de membranas que ocorre no espermatozóide durante a reação acrossomal (BAILEY e STOREY, 1994; YANAGIMACHI, 1994; BREWIS *et al.*, 1996; WASSARMAN, 1999), e o aumento na sua concentração intracelular, anterior à reação acrossomal, tem

sido descrito como um evento obrigatório (YANAGIMACHI, 1994; VISCONTI *et al.*, 1995; KAUL *et al.*, 1997).

Tanto a progesterona quanto a zona pelúcida são capazes de provocar o aumento na concentração do cálcio intracelular, através de um rápido influxo desse íon para dentro do espermatozóide (FLORMAN, 1994; BALDI *et al.*, 1998).

A progesterona tem sido apontada como indutora da reação acrossomal através do aumento na concentração do cálcio intracelular (OSMAN *et al.*, 1989; BLACKMORE *et al.*, 1990; BALDI *et al.*, 1991; FORESTA *et al.*, 1993; MELENDREZ *et al.*, 1994). Aumentos significativos na concentração do cálcio foram observados com apenas 10ng/ml de progesterona, enquanto que o efeito máximo foi observado com 1.000ng/ml (BLACKMORE *et al.*, 1990).

Também, a ligação do espermatozóide na zona pelúcida promove um aumento significativo do cálcio para dentro do espermatozóide (BAILEY e STOREY, 1994; BREWIS *et al.*, 1996; ARNOULT *et al.*, 1999).

Entretanto, existem diferenças fundamentais entre a progesterona e a zona pelúcida na indução da reação acrossomal. A forma da onda de cálcio estimulada por ambas é diferente. Enquanto para a progesterona uma onda bifásica tem sido descrita, constituindo um pico inicial rápido, seguido por uma longa fase de platô, para a zona pelúcida somente há uma longa fase em platô, e essa é semelhante à segunda fase vista na onda de cálcio estimulada pela progesterona (FLORMAN, 1994; BALDI *et al.*, 1998).

Outra diferença é que a ação da zona pelúcida é mediada pelo recrutamento dos receptores para proteínas G, os quais não estão envolvidos na cascata estimulada pela progesterona (TESARIK *et al.*, 1993; ROLDAN *et al.*, 1994; MURASE e ROLDAN, 1996; BALDI *et al.*, 2000).

Vários estudos têm contribuído para o desvendamento das vias de transdução de sinal que conduzem à reação acrossomal no espermatozóide. A completa descoberta dos mecanismos envolvidos na reação acrossomal poderá abrir espaços para novas pesquisas, e entre elas novos estudos de contracepção.

Atualmente, a contracepção hormonal baseada na inibição da ovulação está bem desenvolvida e o mesmo princípio de se inibir a produção do gameta tem sido tentado para a contracepção masculina (NIKKANEN *et al.*, 2000).

Recentemente, o método hormonal mais promissor para a contracepção masculina tem sido a aplicação de injeções semanais de testosterona, ou de androgênios combinados com LNG (Gestagen), ou então de antagonistas de GhRH combinados com testosterona. O objetivo desses tratamentos é cessar totalmente a espermatogênese ou causar uma oligospermia severa (FOEGH, 1983; BREMNER *et al.*, 1991; GONCHAROV *et al.*, 1995).

O modelo baseado na aplicação de injeções semanais de testosterona intramuscular mostrou que a azoospermia e a oligospermia foram conseguidas. Entretanto, esse método ainda está longe da prática clínica porque há muitas questões para serem resolvidas (como por exemplo, a seleção do hormônio e sua dose, a rotina de administração, etc), além do fato de serem desconhecidos

os possíveis efeitos colaterais causados pelas altas doses de testosterona (WHO, 1995; NIKKANEN *et al.*, 2000).

Para a contracepção masculina o bloqueio da espermatogênese não é totalmente necessário, e sim a eliminação da capacidade de fertilização do espermatozóide. Isso pode ser conseguido através da indução precoce dos processos cruciais para a fertilização desenvolvidos pelo espermatozóide, como por exemplo, a capacitação e a reação acrossomal (NIKKANEN *et al.*, 2000).

Baseando-se nesse pressuposto, NIKKANEN *et al.* (2000) desenvolveram um estudo que consistiu na aplicação de altas doses de LNG diretamente na cauda do epidídimo de ratos Sprague-Dawley, com a finalidade de buscar um modelo contraceptivo pós-testicular. O princípio desse trabalho foi a idéia de que os espermatozóides, uma vez capacitados pelo efeito do LNG, não sofreriam nova capacitação no trato reprodutivo da fêmea, e desse modo ficariam incapacitados para fertilizar os oócitos. Nesse trabalho, amostras de espermatozóides foram retiradas da vagina das fêmeas após a cópula, e foi observado que todos os espermatozóides estavam imóveis. Entretanto, não foi realizado um exame mais detalhado para se verificar a presença da capacitação ou reação acrossomal nesses espermatozóides, de modo a constatar-se uma possível associação entre o efeito do LNG e a imobilidade deles.

O LNG é um progestógeno genômico (BLACKMORE *et al.*, 1990) usado como contraceptivo feminino, mas também está sendo testado em combinação com a testosterona para o controle da fertilidade masculina (FOEGH *et al.*, 1980).

Durante as décadas de 70 e 80, muitos estudos foram conduzidos para a investigação da eficácia e dos efeitos colaterais do LNG quando administrado pós-coito, usando-se várias doses do componente (KESSERÜ *et al.*, 1973; CANZLER *et al.*, 1984). O uso repetido do LNG pós-coito na dose de 0,75mg foi testado em um estudo multicêntrico na Hungria entre mulheres com frequência coital esporádica (SEREGELY, 1982). Porém, a conclusão a partir desses estudos foi que a utilização do LNG não foi uma opção possível e confiável para as mulheres que necessitavam de uma contracepção regular.

A anticoncepção de emergência (AE) é usada para prevenir a ocorrência de gravidez após um coito não protegido por um método regular de contracepção, e difere da interrupção de uma gravidez recentemente estabelecida (GRIMES e RAYMOND, 2002).

Os mecanismos de ação das várias formas de AE ainda não estão bem compreendidos. Entretanto, como todos os contraceptivos hormonais, as pílulas para AE provavelmente agem através de mecanismos múltiplos que dependem do tempo de suas administrações e da fase do ciclo menstrual em que a mulher se encontra (GRIMES e RAYMOND, 2002).

O LNG é comercializado em vários países para AE na forma de comprimidos orais de 0,75mg. Um estudo aleatório que avaliou a taxa de gravidez após o uso da AE entre o regime de Yuzpe (com contraceptivos orais combinados) e o regime com LNG puro, mostrou que o segundo regime foi mais eficaz, evitando um maior número de gravidezes. Esse estudo também mostrou que o regime

de LNG foi mais eficaz quanto mais próximo do coito ele era administrado (HERTZEN e VAN LOOK, 1998).

Atualmente, a administração de dois comprimidos de 0,75mg de LNG cada um, ingeridos em intervalos de 12 horas, e até as 72 horas seguintes ao coito não protegido, tem sido recomendada e mostrada como eficaz para AE (TREMBLAY *et al.*, 2001).

O estudo da farmacocinética do LNG para AE mostrou que há níveis plasmáticos significativos do progestógeno com 12 e 24 horas após a administração das pílulas orais. Esse estudo reforçou a conduta clínica que recomenda que os comprimidos para AE sejam administrados entre 12 e 24 horas porque o LNG fica presente no plasma entre as duas administrações (TREMBLAY *et al.*, 2001).

O efeito contraceptivo depende, entre outros efeitos, da supressão da ovulação, o que ocorre apenas em 50% dos casos (NILSSON *et al.*, 1980), mas também do efeito local do LNG (NILSSON *et al.*, 1978) sobre o endométrio, o muco cervical, a penetração dos espermatozóides no muco cervical e a motilidade da tuba uterina (NILSSON e LUUKKAINEN, 1977). Quando as pílulas de AE são administradas antes do período ovulatório, as mesmas inibem a ovulação em algumas mulheres (DURAND *et al.*, 2001). Muitos estudos têm mostrado alterações histológicas e bioquímicas no endométrio após o tratamento com o regime de AE. Isso sugere que a receptividade endometrial para a implantação do ovo pode ser diminuída, e isso colaboraria para o não estabelecimento de uma gravidez (KESSERÜ *et al.*, 1974; YUZPE *et al.*, 1974; LING *et al.*, 1979;

LING *et al.*, 1983; KUBBAR *et al.*, 1986; YOUNG *et al.*, 1994). Entretanto, os resultados de um estudo recente (DURAND *et al.*, 2001) não suportam essa idéia de que o LNG, usado em AE, causaria um efeito contraceptivo antiimplantacional, pois não foram observadas alterações histológicas no endométrio após a administração da medicação por um curto tempo.

Desde 1973, uma variedade de sistemas intra-uterinos que liberam LNG (SIU-LNG) foi testada como contraceptivo (EL MAHGOUB *et al.*, 1980).

Atualmente o SIU-LNG comercializado libera 20 μ g de LNG por dia. Muitos estudos indicaram que pequenas doses desse progestógeno apresentaram uma boa eficácia contraceptiva (LUUKKAINEN e NILSSON, 1978; EL MAHGOUB *et al.*, 1980; NILSSON *et al.*, 1981), e o desempenho obtido com o uso do SIU-LNG é comparado com aquele obtido através da esterilização cirúrgica (LUUKKAINEN *et al.*, 1986).

A taxa de gravidez durante o uso desse método tem sido uniformemente muito baixa, entre 0,0 e 0,2 por 100 mulheres/ano. Nas duas experiências realizadas em Campinas, uma com o uso do SIU-LNG até sete anos, e a outra até com um ano de uso, a taxa de gravidez foi zero (FAÚNDES *et al.*, 1993; DIAZ *et al.*, 2000).

Como contraceptivo, o SIU-LNG foi desenvolvido visando reduzir alguns problemas encontrados com o uso de dispositivos intra-uterinos (DIU) com cobre, principalmente o aumento do número e da quantidade de sangramento menstrual (LUUKKAINEN *et al.*, 1986). Tudo indica que esse objetivo foi

alcançado, uma vez que diferentes autores mostraram que durante o uso do SIU-LNG as quantidades do sangue menstrual foram significativamente reduzidas (NILSSON *et al.*, 1978; EL MAGOUB *et al.*, 1980; HEIKKILÄ *et al.*, 1982; NILSSON *et al.*, 1983; MONTEIRO *et al.*, 2002).

Embora o SIU-LNG apresente uma taxa de gravidez muito baixa, os mecanismos de ação apresentados na literatura não parecem ser convincentes para explicar sua altíssima performance.

Durante o uso do SIU-LNG, as concentrações do progestógeno no endométrio são da ordem de 400ng/g de tecido úmido (NILSSON *et al.*, 1982), e são significativamente maiores que os níveis plasmáticos deste hormônio.

Não há dados na literatura que relacionem a eficácia contraceptiva do SIU-LNG com algum possível efeito sobre os espermatozóides humanos após os mesmos entrarem em contato com o LNG liberado constantemente na cavidade endometrial das usuárias.

Baseando-se no fato de que o SIU-LNG é mais eficaz que a ligadura tubária e que a AE com LNG também é melhor que o regime de YUZPE, e mais eficaz ainda quanto mais perto do coito seja administrada, é possível pensar que ambos não exerceriam um efeito somente sobre a ovulação, o muco cervical ou o endométrio, mas que talvez tivessem algum efeito sobre a capacidade fertilizante do espermatozóide humano.

A hipótese do presente estudo foi que as altas concentrações endometriais de LNG poderiam estar relacionadas ao mecanismo de ação do SIU-LNG e seu altíssimo desempenho contraceptivo.

Assim, foi especulado se as doses similares às altas concentrações de LNG no endométrio seriam capazes de desencadear reação acrossomal precoce nos espermatozoides.

2. Objetivo

2.1. Objetivo

Avaliar se a adição *in vitro* de diferentes concentrações de Levonorgestrel em espermatozóides capacitados de homens férteis seria capaz de influenciar a taxa de espermatozóides com reação acrossomal.

3. Sujeitos e Métodos

3.1. Desenho do estudo

Um estudo experimental.

3.2. Tamanho da amostra

Foram utilizadas 20 amostras de sêmen, provenientes de quatro voluntários saudáveis, com fertilidade comprovada e com espermograma normal (WHO, 1992). Como não existe nenhum antecedente na literatura sobre este tema, este número de amostras foi escolhido aleatoriamente.

Apenas quatro doadores foram utilizados neste trabalho porque dados na literatura mostraram que a capacitação espermática e a reação acrossomal são bastante variáveis de indivíduo para indivíduo, e, devido a isso, um número restrito de doadores deve ser utilizado quando se objetiva testar agentes antifertilizantes (PERREAULT e ROGERS, 1982; ROBLERO et al., 1988).

Dois voluntários cederam seis amostras de sêmen cada um, um voluntário cedeu cinco amostras e o último voluntário cedeu três amostras de sêmen. As mesmas foram colhidas em intervalos de sete ou 14 dias.

3.3. Critérios de inclusão e exclusão das amostras

3.3.1. Critérios de inclusão

Amostras de sêmen com valores normais de espermograma segundo as recomendações da World Health Organization (WHO, 1992). As amostras incluídas no estudo tiveram necessariamente que confirmar sua respectiva condição de capacitação, adquirida ou não, durante o período de incubação por 20 horas. A verificação da capacitação espermática foi realizada através da análise da capacidade dos espermatozoides desencadearem reação acrossomal após indução com fluido folicular (FF). Foram consideradas capacitadas somente as amostras cujas taxas de reação acrossomal, após a indução com FF, atingiram no mínimo valores iguais ao dobro em relação às taxas obtidas para a reação acrossomal basal.

3.3.2. Critérios de exclusão

Amostras de sêmen que não apresentaram valores de espermograma normais segundo as recomendações da WHO (1992) foram descartadas do estudo. Também foram excluídas as amostras que não apresentaram condições de capacitação, ou seja, aquelas amostras nas quais os espermatozoides não

apresentaram mudança na taxa de reação acrossomal, em relação aos valores basais, após o estímulo com FF.

3.4. Procedimentos

O esquema geral dos procedimentos realizados está resumido no Anexo 2.

1) Coleta da amostra de sêmen

Obtida por masturbação e colhida em um recipiente plástico estéril. Para esta coleta os doadores obedeceram a um período de abstinência sexual de três a cinco dias segundo as recomendações da WHO (1992). Após a coleta, as amostras foram deixadas em estufa de cultura a 37°C, por 30 minutos, para a liquefação do plasma seminal.

2) Análises macroscópicas e microscópicas do sêmen

Realizada segundo critérios da WHO (1992). Todos os seguintes itens (constituintes da análise de rotina do espermograma) foram examinados: volume; cor; viscosidade; liquefação; pH, motilidade e concentração espermática, contagem de células redondas, quantificação dos leucócitos, vitalidade e leitura da morfologia segundo o critério estrito de Kruger.

3) Separação do plasma seminal por *Swim-up*

O plasma seminal foi removido do sêmen através de dois ciclos de acréscimo de *Phosphate Buffered Saline* (PBS), (*Dulbecc'os – Gibco; Invitrogen Corporation; NY, USA*), ao sêmen seguido por centrifugação

da mistura por dez minutos a 200g. Após a segunda centrifugação, foram adicionados 4ml de meio de cultura *Human Tubal Fluid* (HTF) (*Irvine Scientific; Santa Ana, Califórnia, USA*), enriquecido com 35mg/ml de Albumina de Soro Bovina (BSA) (fração V, Sigma, A7906), sobre o sedimento de espermatozóides. Este material foi incubado por uma hora em estufa de cultura a 37°C, com atmosfera de 5% de CO₂. Após este período de incubação foi realizada a aspiração de 3ml do sobrenadante. Nessa fração aspirada, foram encontrados os espermatozóides apresentando uma excelente motilidade e ajustados para uma concentração entre 2 a 8 milhões de espermatozóides/ml apropriada para estudos que abrangem testes de indução da reação acrossomal (CALVO et al., 1989).

4) Análise da concentração, motilidade e vitalidade espermática após a seleção

Em uma câmara Makler, aquecida a 37°C, foi colocada uma gota do sobrenadante após a incubação conjunta com o sedimento de espermatozóide, e em seguida a câmara foi examinada ao microscópio óptico para a contagem do número de espermatozóide e definição da concentração espermática. Os espermatozóides também foram avaliados quanto a motilidade e a vitalidade após o *swim-up*. A leitura da vitalidade nesta etapa foi realizada usando-se a coloração da Eosina Y (segundo as recomendações da WHO, 1992) e consistiu na observação e posterior estimativas percentuais dos espermatozóides corados e não-corados. Isso porque os espermatozóides lesados (ou seja, os mortos) ficarão corados devido à passagem do corante através da membrana plasmática, enquanto que aqueles espermatozóides vivos, apresentando membrana intacta, não receberão o corante.

5) Incubação do *swim - up* por 20 horas (Capacitação)

O meio de HTF suplementado com BSA (35mg/ml) contendo os espermatozóides recuperados após o *swim-up* foi incubado por 20 horas em estufa de cultura a 37⁰C e atmosfera com 5% de CO₂. Isto foi realizado porque os espermatozóides precisavam estar altamente capacitados nesta etapa que antecedeu ao acréscimo das substâncias testadas. Apesar de ter havido uma redução da motilidade espermática após o longo período de incubação, os espermatozóides apresentaram vitalidade normal.

6) Divisão da amostra contendo os espermatozóides capacitados em 6 diferentes tubos

Cada um dos seis tubos recebeu uma alíquota de 400µl do meio HTF com os espermatozóides capacitados. Neles foi posteriormente colocado ou uma das três alíquotas de LNG, ou uma alíquota de Etanol, ou uma alíquota de FF. No último tubo não foi adicionado nada além do meio HTF com a população de espermatozóides capacitados. As alíquotas de LNG forneceram concentrações finais de 200ng/ml, 400ng/ml e 800ng/ml, ou seja, respectivas concentrações finais de 0,64µM, 1,28µM, e 2,56µM. Em 12 experimentos, além das três concentrações de LNG mencionadas, também foi avaliado o efeito da concentração final de 10µg/ml de LNG, ou seja, a concentração de 32µM.

Três controles foram utilizados em todos os experimentos. O tubo contendo somente os espermatozóides capacitados em meio HTF serviu para a verificação da taxa de reação acrossomal basal dos espermatozóides da amostra. O tubo que recebeu o acréscimo da alíquota de 9µl de Etanol, previamente diluído em meio HTF na

proporção de 1:100, foi examinado para verificar se este álcool utilizado para a dissolução do LNG causaria algum efeito tóxico nos espermatozóides capacitados. Esse volume de 9 μ l corresponde à média ponderada do volume de Etanol estimado nas três amostras de LNG. O último material de controle foi o tubo que recebeu a alíquota de FF, e o propósito deste controle foi o de atestar que os espermatozóides em estudo estariam capacitados e prontos para desencadear reação acrossomal se houvesse algum estímulo para isso, no caso, a progesterona presente no FF na concentração final de 124.000 ng/ml (respectiva concentração de 394,3 μ M estimada através do método de eletroquimioluminescência) foi a substância responsável pelo estímulo.

A rotulação dos tubos, os quais ganharam etiquetas com as letras de A-F, foi aleatória de forma que o conteúdo de cada frasco tornou-se desconhecido para a pessoa que manuseou o experimento. Essa medida foi tomada para evitar possíveis vícios na posterior avaliação do material.

7) Incubação dos tubos A - F em dois tempos

Após 15 e 30 minutos de exposição dos espermatozóides capacitados às diferentes concentrações do LNG ou aos controles, foram preparadas duas lâminas (uma em cada um dos tempos) dos conteúdos de cada um dos tubos, para posterior análise da taxa de espermatozóides vivos e com reação acrossomal.

8) Confecção aleatória das lâminas para a análise da vitalidade e da reação acrossomal

A ordem do preparo das lâminas, após os diferentes tempos de exposições ao LNG, foi previamente determinada através de um programa computadorizado que estabeleceu aleatoriamente as seqüências dos tubos (A-F) para as 20 amostras do experimento. Com isso, a possível variação decorrente da diferença do tempo de preparo entre a primeira e a última lâmina foi desprezível.

9) Colorações fluorescentes da vitalidade e da reação acrossomal

Após 15 minutos de exposição dos diferentes tratamentos, 200µl do conteúdo de cada um dos seis tubos foram transferidos para outros tubos e incubados, por 10 minutos à temperatura ambiente, com 100µl de solução de Hoescht 33258 (bis-Benzimide; Sigma Chemical Co; St. Louis, USA, B2883) a 1µg/ml. Na seqüência, duas lavagens para a retirada do excesso do corante foram realizadas através do acréscimo de PBS e centrifugações. Após as lavagens, o sedimento de espermatozóides foi ressuspendido em 50µl de PBS. Seis lâminas foram preparadas com o material de cada um dos tubos e deixadas para secar em local escuro e à temperatura ambiente. O mesmo procedimento foi realizado após 30 minutos de exposição dos diferentes tratamentos, e com isso mais seis lâminas foram confeccionadas.

Em seguida, as 12 lâminas foram tratadas com metanol absoluto, a -20°C, por 30 segundos. Depois disso, foram colocadas em um recipiente protegido contra a luz e imersas por 30 minutos em solução de fluoresceína isotiocianato conjugada com a lectina de *Pisum sativum* (FITC-PSA) (Sigma Chemical Co; St. Louis, USA, L0770), a 40µg/ml. Após a incubação, essas lâminas foram lavadas em solução de PBS

para a retirada dos resíduos do corante em excesso. Quando secas, essas lâminas foram cobertas com lamínulas em meio de montagem de glicerol-PBS (9:1), e armazenadas no *freezer* até a realização da leitura da reação acrossomal, feita no máximo até depois de três dias.

10) **Análise da reação acrossomal**

As avaliações das fluorescências da reação acrossomal e da vitalidade espermática foram realizadas no microscópio AxioplanII da Zeiss, equipado com o filtro para FITC-PSA (com excitação de 494-azul; emissão de 520; barreira de 510-514), e com o filtro para o corante Hoescht 33258 (com excitação de 343-UV; emissão de 480; barreira de 400).

A vitalidade espermática foi examinada considerando-se que os espermatozóides vivos foram aqueles apresentando coloração fraca e opaca, enquanto que os espermatozóides mortos foram aqueles exibindo forte fluorescência azul brilhante na porção do terço inferior da cabeça.

A análise da fluorescência emitida pelo acrossoma, ou por resquício dele (o segmento equatorial) naqueles espermatozóides reagidos, foi simultânea à análise da vitalidade. Apenas os espermatozóides vivos segundo a coloração do Hoescht 33258 foram avaliados em relação ao status acrossomal, sendo classificados em intactos, reagidos, ou em via de reação. Foram avaliados 200 espermatozóides, em campos aleatórios, e feita uma estimativa percentual entre essas três formas encontradas. No cômputo final, os espermatozóides apresentando o acrossoma em vias de reação e reagidos foram agrupados, e a taxa de reação acrossomal mostrada refere-se à soma dessas duas categorias.

3.5. Análises estatísticas

Primeiramente foram realizados os cálculos das médias, do desvio padrão e erro padrão da média para todos os tubos, e também a análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas. Em seguida foi realizado o teste não-paramétrico de Wilcoxon para amostras pareadas para avaliar as diferenças entre cada um dos tubos. O nível de significância foi estabelecido em $< 0,05$.

3.6. Aspectos éticos

Os homens participantes da pesquisa foram voluntários saudáveis, convidados aleatoriamente para contribuírem com a doação das amostras de sêmen. Todos os direitos dos voluntários foram respeitados de acordo com a Declaração de Helsinki-III e com as Resoluções 196/96 e 251/97 do Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) (BRASIL, 1996; DECLARAÇÃO DE HELSINKI III, 2000). Todos os participantes assinaram um termo de Consentimento Informado (Anexo), o qual havia sido previamente aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa (CEP) da UNICAMP com o registro nº 31/2001 e pelo CONEP.

4. Resultados

4.1. Padronização das condições de incubação *in vitro*

Doze amostras, à parte daquelas constituintes do projeto, foram previamente confeccionadas com a finalidade de se confirmar que os espermatozóides suportariam as condições de incubação e posterior indução com o FF, assim como descartar um possível efeito tóxico do LNG, ou do diluente, sobre os espermatozóides capacitados, até 30 minutos de exposição.

Nestas amostras, a análise da vitalidade através da coloração da Eosina Y mostrou que não houve morte dos espermatozóides após o longo período de 20 horas de incubação do material, e nem decorrente da exposição das três distintas concentrações de LNG ou do Etanol durante os 30 minutos avaliados (Figura1).

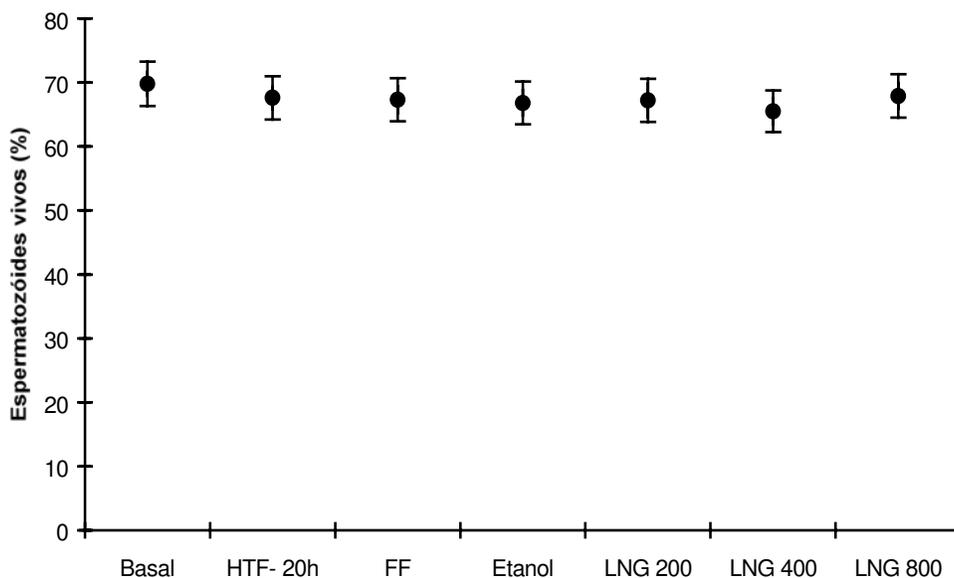


Figura 1. Comparações entre as taxas de vitalidade espermática (coloração de Eosina Y).

Nota: Taxa de espermatozoides vivos após: o *swim-up* (Basal); a incubação por 20 horas para capacitação (HTF-20h); e os acréscimos e exposições por 30 minutos do fluido folicular (FF), do (Etanol), do (LNG 200), (LNG 400) e (LNG 800). $p > 0,05$ para Basal X HTF-20h; HTF-20h X Etanol; HTF-20h X LNG 200, LNG 400 e LNG 800.

Também a comparação entre os valores da vitalidade obtidos tanto pela coloração da Eosina Y quanto pela coloração fluorescente do Hoescht 33258, revelou que não houve diferença significativa entre elas (Figura 2), indicando que ambas poderiam ser utilizadas de forma indistinta.

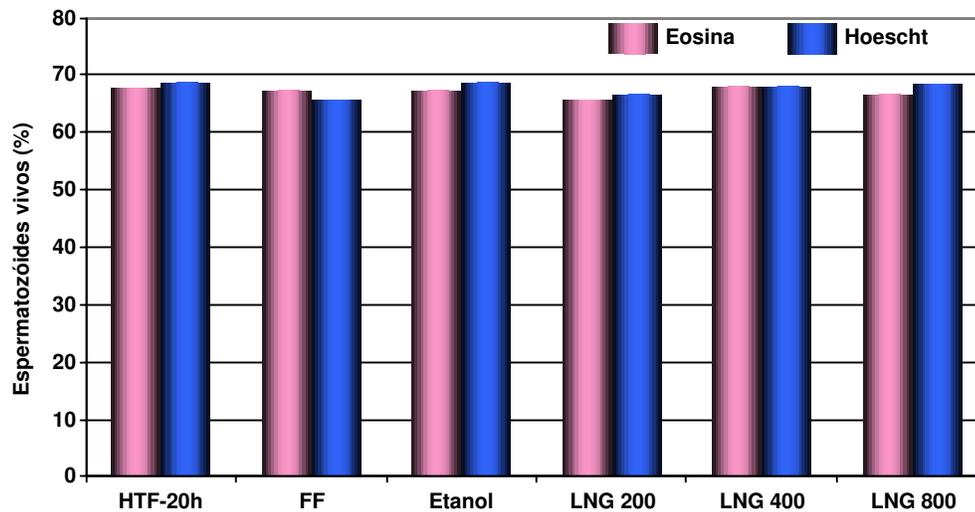


Figura 2. Comparação entre a colorações de Eosina Y e de Hoescht 33258 para vitalidade espermática.

Nota: p valores obtidos a partir da comparação entre as colorações de Eosina e Hoescht para cada tratamento: HTF-20h = 0,42; FF = 0,27; Etanol = 0,37; LNG 200 = 0,37; LNG 400 = >0,99 e LNG 800 = >0,08.

As 20 amostras constituintes do projeto apresentaram valores normais de espermograma, segundo as recomendações estabelecidas pela WHO (1992). As principais características estão mostradas na Tabela 1.

TABELA 1**Principais características do sêmen dos voluntários**

	Concentração de sptz ($\times 10^6$ sptz/ml)	Motilidade (% A+B)	Vitalidade (%)	Morfologia (%)
Doador 1	266,3 \pm 23,74	56,7 \pm 2,10	85,8 \pm 1,22	17,1 \pm 1,37
Doador 2	140,3 \pm 20,82	50,0 \pm 2,58	85,0 \pm 1,89	14,5 \pm 1,28
Doador 3	205,6 \pm 37,93	37,5 \pm 2,50	81,0 \pm 1,29	19,0 \pm 0,0
Doador 4	77,7 \pm 32,12	33,3 \pm 3,33	67,7 \pm 6,36	14,0 \pm 0,57

Todos os valores se referem às médias das amostras cedidas por cada voluntário \pm EPM (Erro padrão da média).

Valores de morfologia segundo critério estrito de Kruger.

As coletas realizadas semanalmente, e entre períodos de 14 dias, mostraram a existência de variação intraindividual (Figura 3), a qual já havia sido previamente relatada pela WHO (1992).

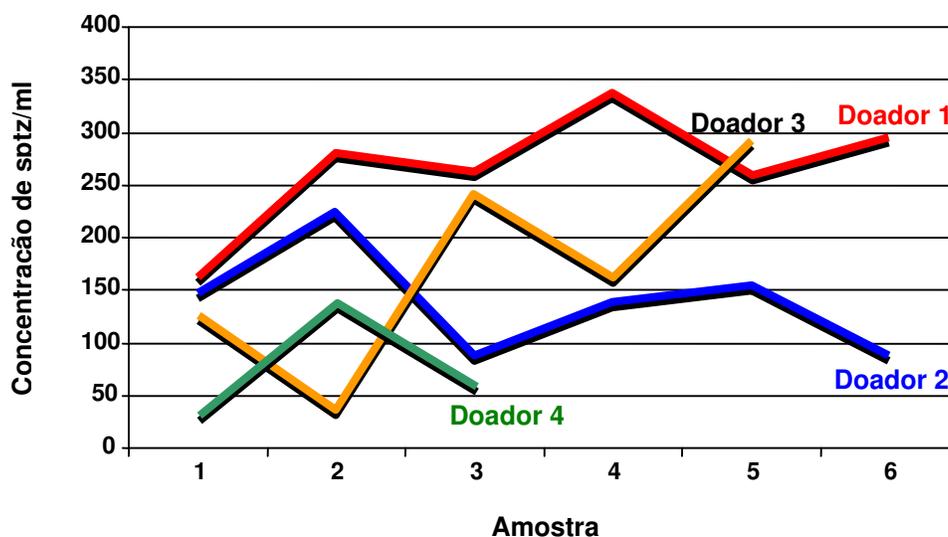


Figura 3. Variações intraindividuais na concentração espermática do sêmen dos voluntários.

4.2. Efeito do LNG sobre a reação acrossomal

A análise da taxa de reação acrossomal posterior ao acréscimo das diferentes substâncias testadas mostrou que após 15 minutos de exposição, nenhuma das três concentrações de LNG foi capaz de promover um aumento na taxa de reação acrossomal (Figura 4).

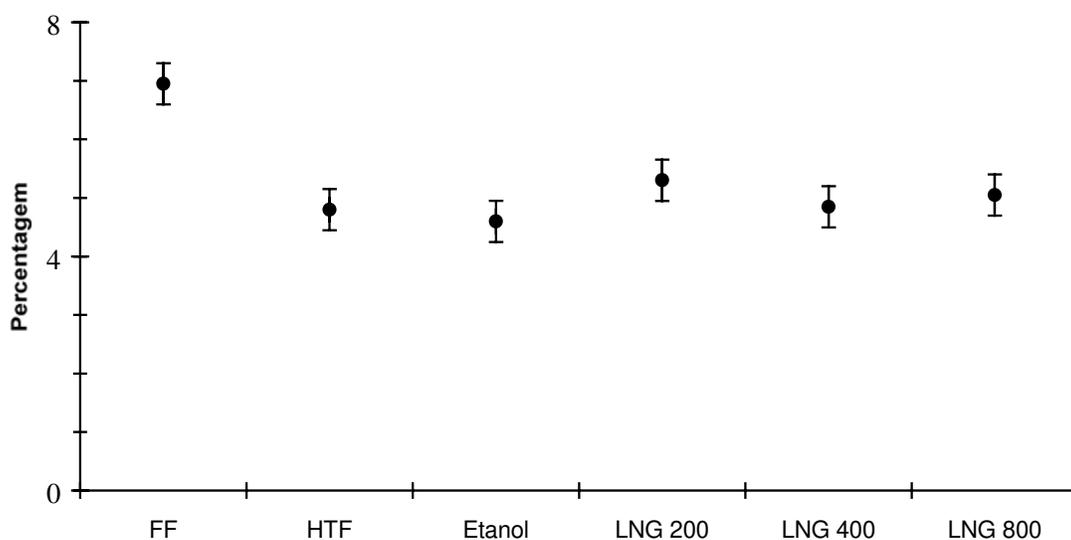


Figura 4. Porcentagem de reação acrossomal na população de espermatozoides capacitados e submetidos a diferentes tratamentos por 15 minutos.

Nota: Fluido Folicular (**FF**); Meio de cultura *Human Tubal Fluid* (**HTF**); Levonorgestrel 200ng/ml = 0,64 μ M (**LNG 200**); Levonorgestrel 400ng/ml = 1,28 μ M (**LNG 400**); Levonorgestrel 800ng/ml = 2,56 μ M (**LNG 800**).

Valores de P: $p < 0,001$ para FF x todas as demais substâncias. Demais comparações entre os grupos $p =$ **não significativo**.

Entretanto, com esse tempo de exposição, foi possível observar um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,001$) na taxa da reação acrossomal na subpopulação de espermatozoides que recebeu o estímulo do FF. Esse último resultado mostrou que os espermatozoides da amostra exibiam o *status* de capacitação, e por isso foram capazes de desencadear a reação acrossomal assim que receberam o estímulo da progesterona, presente em altas concentrações no FF (124.000 ng/ml).

Por outro lado, com um período de exposição de 30 minutos, foi possível observar um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) na taxa de reação acrossomal, promovido pelas quatro concentrações do LNG (Figura 5).

Também, as análises estatísticas mostraram que não houve diferença significativa entre as concentrações de 200ng/ml, 400ng/ml e 800ng/ml de LNG avaliadas no presente estudo (Figura 5).

Nos 12 experimentos, nos quais foi avaliado simultaneamente o efeito sobre a taxa de reação acrossomal de mais uma outra concentração de LNG, a de 10.000ng/ml, ou seja, de 32 μ M, os resultados mostraram que esta última concentração de LNG promoveu um aumento, significativamente estatístico ($p < 0,002$), na taxa de reação acrossomal (Figura 5), mas este valor foi estatisticamente menor quando comparado àquele obtido com o FF.

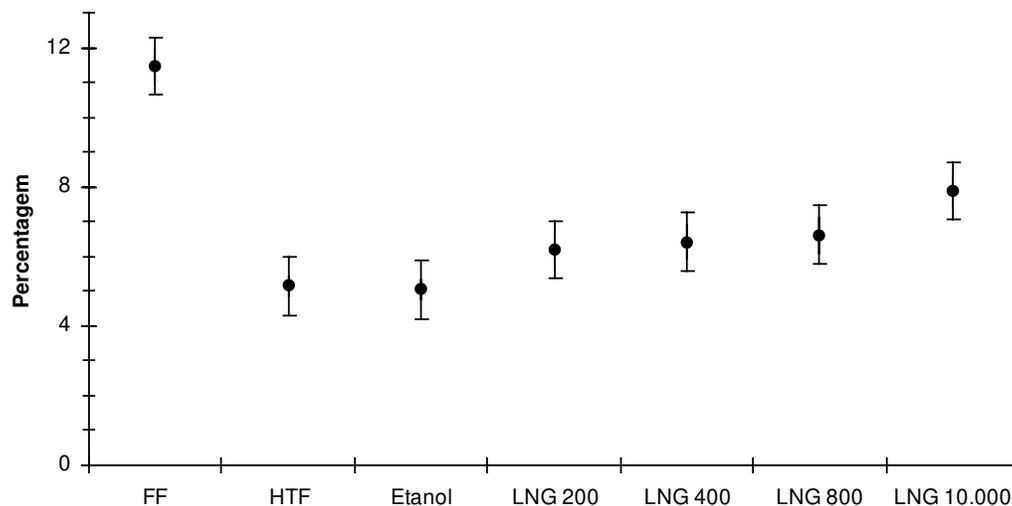


Figura 5. Porcentagem de reação acrossomal na população de espermatozoides capacitados e submetidos a diferentes tratamentos por 30 minutos.

Nota: Fluido Folicular (**FF**); Meio de cultura *Human Tubal Fluid* (**HTF**); Levonorgestrel 200ng/ml = 0,64 μ M (**LNG 200**); Levonorgestrel 400ng/ml = 1,28 μ M (**LNG 400**); Levonorgestrel 800ng/ml = 2,56 μ M (**LNG 800**); Levonorgestrel 10000ng/ml = 32 μ M (**LNG 10,000**).

P valores: **p < 0,001** para FF x HTF; FF x Etanol; FF x LNG 200, 400; 800; HTF x LNG 800. **p < 0,002** para FF x LNG 10.000; HTF x LNG 400; HTF x LNG 10,000. **p < 0,005** para HTF x LNG 200. **P = NS** para HTF x Etanol; LNG 200 x LNG 400; LNG 200 x 800; LNG 400 x LNG 800.

5. Discussão

Os resultados deste estudo mostraram que o progestógeno Levonorgestrel, usado nas concentrações de 0,64 μ M (200ng/ml), 1,28 μ M (400 ng/ml), 2,56 μ M (800 ng/ml) e 32 μ M (10000ng/ml) foi capaz de induzir um aumento na taxa de reação acrossomal nos espermatozóides capacitados de homens férteis quando comparado aos valores do HTF e do Etanol. Apesar do pequeno aumento observado na taxa da reação acrossomal com o uso do LNG nestas concentrações, houve um efeito estatisticamente significativo sobre a reação acrossomal ($p < 0,005$; $p < 0,002$ e $p < 0,001$ respectivamente).

É conhecido que em decorrência da morte celular pode haver liberação das enzimas acrossomais e autodigestão do capuz acrossomal, reação esta denominada “falsa”. Existia, portanto, a possibilidade de que o tratamento com LNG resultasse tóxico e afetasse, desta forma, a porcentagem de espermatozóides reacionados. Por tal razão, foi realizado primeiramente o exame da sobrevivência espermática, após o acréscimo ao sêmen das diferentes concentrações do LNG. Não foram observadas diferenças significativas após a comparação do

número de espermatozóides vivos antes e depois dos diferentes tratamentos, e posterior aos 30 minutos de incubação examinados.

Após certificarmos de que não havia a produção do possível efeito tóxico, os espermatozóides capacitados foram expostos a doses crescentes do progestógeno.

As concentrações de 200ng/ml, 400ng/ml e 800ng/ml de LNG foram escolhidas com base nos achados de NILSSON *et al.* (1982) que estimaram valores próximos dessas concentrações no tecido endometrial de pacientes usuárias do SIU-LNG. Este ponto de referência foi adotado por falta de outro.

O LNG é um progestógeno com conhecida ação genômica. Esse esteróide sintético foi usado por BLACKMORE *et al.* (1991) que mostraram em seus estudos que, nos espermatozóides, os sítios de ligação para a progesterona localizam-se sobre a superfície da membrana plasmática. Mais recentemente tem sido mostrada a presença dos receptores de progesterona “mascarados” sobre a membrana dos espermatozóides (AMBHAIKAR e PURI, 1998). Estes sítios de ligação parecem possuir homologia estrutural com o receptor de progesterona nuclear, mas diferem quanto à localização e à especificidade de ligação (CALOGERO *et al.*, 2000).

Para mostrar que o efeito da progesterona não era desencadeado através da via genômica, BLACKMORE *et al.* (1991) mostraram que o LNG, entre outros progestógenos genômicos, foi incapaz de promover a elevação da concentração intracelular do íon Cálcio, em espermatozóides capacitados e

não-capacitados, e mimetizar o efeito da progesterona. É importante ressaltar que a concentração avaliada por esses autores foi de $10\mu\text{M}$ e por um período entre 20 a 30 segundos após a exposição dos espermatozóides ao componente, e que segundo nossas análises, tanto essa baixa concentração, usada no referido estudo, quanto o tempo de exposição poderiam ser insuficientes para a observação de algum efeito mediado pelo LNG nos espermatozóides capacitados.

Devido à afinidade do LNG pelo receptor de progesterona genômico e a homologia entre os receptores de progesterona, o genômico (inexistente nos espermatozóides) e o de superfície no espermatozóide humano, poderíamos especular que as concentrações do LNG, avaliadas no presente estudo, induziram o aumento na taxa de reação acrossomal através da mesma via que a progesterona estimula, ou seja, através dos receptores de progesterona localizados na superfície da membrana plasmática. Vale ressaltar que pequenas modificações na molécula da progesterona natural resultam na perda do seu potencial de resposta (BLACKMORE *et al.*, 1990). Por esse motivo a possível ligação do LNG no sítio receptor da progesterona, feita de maneira “imperfeita”, não seria capaz de estimular efeito semelhante ao da progesterona presente no FF, uma vez que os valores de reação acrossomal após o estímulo com o FF foram superiores aos obtidos com a maior concentração avaliada do LNG. Também através dessa especulação, da ligação “imperfeita” do LNG no sítio receptor da progesterona, torna-se possível compreender o motivo pelo qual a maior concentração de LNG avaliada no presente estudo, a de $32\mu\text{M}$, foi capaz de desencadear 70,5% do efeito máximo de reação acrossomal proporcionado

pela progesterona presente no FF. A alta concentração das moléculas do LNG possivelmente podem ter saturado a superfície do espermatozóide, favorecendo, desta forma, o encontro e ligação do LNG com o sítio receptor da progesterona.

Contudo, os resultados decorrentes dos respectivos efeitos da progesterona e do LNG sobre a reação acrossomal nos espermatozoides não deveriam ser semelhantes.

Isso porque a identificação e caracterização dos sítios de ligação da progesterona, sobre a membrana dos espermatozoides, mostrou duas classes distintas de receptores. Uma é constituída por sítios específicos e exclusivos para a progesterona, enquanto a outra classe apresenta sítios de ligações com baixa constante de afinidade e que são capazes de ligar os progestógenos. A primeira classe apresenta alta constante de afinidade e atua na faixa de concentrações nanomolares devido à sua alta especificidade, e a segunda classe atua somente na faixa de concentrações micromolares em decorrência de sua baixa especificidade (LUCONI *et al.*, 1998).

Também por causa da utilização das duas classes dos sítios de ligação é possível compreender porque a progesterona promoveu uma indução significativa na taxa de reação acrossomal, após 15 minutos de exposição aos espermatozoides capacitados, enquanto que o LNG somente foi capaz de desencadear o efeito de indução após 30 minutos de exposição. Em acréscimo, estudos recentes mostraram que o FF é um eficiente indutor da reação acrossomal não apenas pela presença da progesterona em sua composição, mas também porque

possui moléculas transportadoras de esteróides, as quais participam maximizando o efeito biológico do FF. Entre essas moléculas há a proteína ligadora de corticosteróides CBG capaz de ligar-se a várias moléculas de progesterona e atuar como uma ponte para facilitar o reconhecimento e ligação dos sítios receptores (nos espermatozóides) e o esteróide carregado (MISKA *et al.*, 1994). A presença da CBG no FF também reforça sua eficácia de ação, no desencadeamento da reação acrossomal, quando o mesmo é comparado com as distintas concentrações de LNG, o qual não possui tal proteína carreadora.

De acordo com os dados de LUCONI *et al.* (1998), de que são necessárias concentrações micromolares para a estimulação da segunda classe de receptores, os quais são capazes de ligação dos progestógenos, é possível supor o motivo pelo qual as concentrações mais baixas de LNG testadas no presente trabalho induziram reação acrossomal em menor proporção. As mesmas são concentrações micromolares muito baixas, e por isso não devem ter conseguido estimular efetivamente o sítio de ligação e desencadear uma maior taxa de reação acrossomal.

Não existem dados na literatura da quantificação da concentração de LNG no fluido da cavidade uterina com o uso do SIU-LNG ou após administração das pílulas de AE. A grande maioria dos trabalhos publicados até o momento relatou a farmacocinética do LNG e suas concentrações no plasma sanguíneo após o regime de AE (TREMBLAY *et al.*, 2001, JOHANSSON *et al.*, 2002).

É possível especular que o efeito do LNG, de aumentar a taxa de reação acrossomal nos espermatozóides capacitados, seja um mecanismo de ação contraceptivo adicional apenas com o uso do SIU-LNG. Isso porque o SIU-LNG, atualmente comercializado, libera 20 μ g diários e a concentração de 32 μ M de LNG, mostrada neste estudo como promotora da reação acrossomal, equivale a uma quantidade do progestógeno de 10 μ g/ml.

Por outro lado, as concentrações plasmáticas do LNG após a administração das pílulas para AE foram respectivamente na ordem de 0,027 a 0,033 μ M e de 0,04 μ M para a ingestão de duas doses de 0,75mg em intervalos de 12 horas, ou para a ingestão de uma única dose de 1,5mg (TREMBLAY *et al.*, 2001, JOHANSSON *et al.*, 2002). Também, os níveis plasmáticos de LNG foram estimados acima de 1 μ M e constantes nesses níveis por aproximadamente 4,5 dias após a ingestão das duas doses para AE (TREMBLAY *et al.*, 2001).

Caso as concentrações no endométrio estejam próximas a estas baixas concentrações plasmáticas, as mesmas não serão capazes de estimular os receptores de progesterona que possuem capacidade de ligação dos progestógenos, que necessitam ao menos de níveis micromolares para desencadear algum efeito no espermatozóide.

Um estudo em ratos *Sprague-Dawley* mostrou um efeito inibitório da espermatogênese, após a utilização de altas concentrações de LNG aplicadas diretamente sobre a cauda do epidídimo e com algumas semanas de exposição. Nesse trabalho, o efeito contraceptivo obtido em um dos grupos avaliados foi

considerado como conseqüente do efeito direto do LNG sobre os espermatozóides (NIKKANEN *et al.*, 2000).

Outro estudo (KESSERU *et al.*, 1974) observou uma alcalinização progressiva do pH no muco cervical, iniciada entre quatro a cinco horas após a ingestão da pílulas de LNG para AE, e especulou que essa modificação no ambiente genital poderia influenciar a migração dos espermatozóides e, desta maneira, colaborar no mecanismo contraceptivo do LNG.

Há uma opinião, consensual, de que o efeito contraceptivo do LNG sobre os espermatozóides, ou sobre a espermatogênese, necessita de algumas semanas para ser efetivo (GONCHAROV *et al.*, 1995, NIKKANEN *et al.*, 2000). Por esse motivo, seriam importantes outras pesquisas que trabalhassem no sentido de quantificar o tempo de permanência e também a dosagem real do LNG, o qual estando presente na cavidade uterina, tanto das usuárias do SIU-LNG quanto das pílulas para AE, poderia entrar em contato direto com os espermatozóides e torná-los inviáveis para fertilizar através do desencadeamento da reação acrossomal precoce.

Os resultados deste estudo sugerem que a exposição dos espermatozóides capacitados, por 30 minutos, ao LNG aumenta a taxa de reação acrossomal em relação aos espermatozóides não expostos. Há relatos de que apenas 10% a 30% dos espermatozóides expressam o receptor para a progesterona (TESARIK *et al.*, 1992), e talvez seja esta a população de espermatozóides com potencial para a fertilização. Considerando que poucos espermatozóides

perdem o acrossoma no oviducto e permanecem intactos até as proximidades do oócito (local onde ocorre a reação acrossomal), a ocorrência prematura da reação acrossomal pode inviabilizar o contato apropriado com a ZP e impedir a fertilização. Talvez o pequeno aumento nos níveis de reação acrossomal, observado no presente trabalho, poderia sugerir que a presença do LNG fosse capaz de diminuir o potencial fertilizante dos espermatozóides.

Por enquanto, este estudo apenas mostrou que o LNG exerce o desencadeamento da reação acrossomal em uma subpopulação de espermatozóides capacitados *in vitro*, mas outros estudos (em encaminhamento) são necessários para o futuro esclarecimento se esse efeito é responsável pelo sucesso contraceptivo dos métodos que utilizam o LNG.

Somente após o esclarecimento da concentração de LNG presente *in vivo* será possível uma relação mais precisa quanto ao efeito contraceptivo desse progestógeno diretamente sobre os espermatozóides humanos.

6. Conclusões

- As concentrações de 0,64 μ M (200ng/ml), 1,28 μ M (400ng/ml), 2,56 μ M (800ng/ml) e 32 μ M (10.000ng/ml) de LNG foram capazes de induzir reação acrossomal, significativamente maiores quando comparadas àquela obtida com HTF, e significativamente menores que a obtida com FF, nos espermatozoides capacitados de homens férteis, sem afetar a viabilidade dos mesmos após 30 minutos de exposição.
- Não houve diferenças nos resultados obtidos com as concentrações de 0,64 μ M (200ng/ml), 1,28 μ M (400ng/ml) e 2,56 μ M (800ng/ml). A concentração de 32 μ M (10.000ng/ml) induziu significativamente maior reação acrossomal quando comparada com as outras três concentrações.
- Há a necessidade de pesquisas adicionais que quantifiquem a concentração *in vivo* do LNG no fluido da cavidade uterina e também no fluido tubário, tanto das usuárias do SIU-LNG quanto daquelas usuárias de pílulas para AE para haver uma posterior relação, mais precisa, quanto ao efeito contraceptivo desse progestógeno diretamente sobre os espermatozoides humanos.

7. Referências Bibliográficas

AMBHAIKAR, M.; PURI, C. Cell surface binding sites for progesterone on human spermatozoa. *Mol Hum Reprod*, 4:413-21, 1998.

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 ZP3 and by membrane hyperpolarization during capacitation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96:6757-62, 1999.

BAILEY, J. L.; STOREY, B.T. Calcium influx into mouse spermatozoa activated by solubilized mouse zona pellucida, monitored with the calcium fluorescent indicator, fluo-3. Inhibition of the influx by three inhibitors of the zona pellucida induced acrosome reaction: tyrphostin A48, pertussis toxin, and 3-quinuclidinyl benzilate. *Mol Reprod Dev*, 39:297-308, 1994.

BALDI, E.; CASANO, R.; FALSETTI, C.; KRAUZ, C.; MAGGI, M.; FORTI, G. Intracellular calcium accumulation and responsiveness to progesterone in capacitating human spermatozoa. *J Androl*, 12:323-30, 1991.

BALDI, E.; LUCONI, M.; BONACCORSI, L.; FORTI, G. Nongenomic effects of progesterone on spermatozoa: mechanisms of signal transduction and clinical implications. *Front Biosci*, 3:1051-9, 1998.

- BALDI, E.; LUCONI, M.; BONACCORSI, L.; MURATORI, M.; FORTI, G. Intracellular events and signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity and acrosome reaction. **Front Biosc**, 5:110-23, 2000.
- BARRAT, C.L.R.; COOKE, I.D. Sperm transport in the human reproductive tract -a dynamic interaction. **Int J Androl**, 14:394-411, 1991.
- BLACKMORE, P.F.; BEEBE, S.J; DANFORD, D.R.; ALEXANDER, N. Progesterone and 17-alpha hydroxyprogesterone: novel stimulators of calcium influx in human sperm. **J Biol Chem**, 265:1376-80, 1990.
- BLACKMORE, P. F.; NEULEN, J.; LATTANZIO, F.; BEEBE, S.J. Cell surface-binding sites for progesterone mediate calcium uptake in human sperm. **J Biol Chem**, 266:18655-9, 1991.
- BOATMAN, D.E. Responses of gametes to the oviductal environment. **Hum Reprod**, 12(Suppl-11):133-49, 1997.
- BRASIL. Ministério de Saúde – Resolução nº 196/96 sobre pesquisa envolvendo os seres humanos. **Inf. Epidemi. SUS – Brasil**, 2, 1996.
- BRAY, C.; BROWN, J.C.K.; PUBLICOVER, S.; BARRATT, C.L.R. Progesterone interaction with sperm plasma membrane, calcium influx and induction of the acrosome reaction. **Reprod Med Rev**, 7:81-93, 1999.
- BREMNER, W. J.; BAGATELL, C.J.; STEINER, R.A. Gonadotropin-releasing hormone antagonist plus testosterone: a potential male contraceptive. **J Clin Endocrinol Metabol**, 73: 465-9, 1991.
- BREWIS, I. A.; CLAYTON, R.; BARRAT, C.L.; HORNBY, D.P.; MOORE, H.D.M. Recombinant human zona pellucida glycoprotein 3 induces calcium influx and acrosome reaction in human spermatozoa. **Mol Hum Reprod**, 2:583-9,1996.

CALOGERO, A.E.; BURRELLO, N.; BARONE, N.; PALERMO, I.; GRASSO, U.; D'AGATA, R. Effects of progesterone on sperm function: mechanisms of action. ***Hum Reprod***, 15(Suppl1):28-45. 2000.

CALVO, L.; VANTMAN, D.; BANKS, S.M.; TEZON, J.; KOUKOULIS, G.N.; DENNISON, L.; SHERINS, R.J. Follicular fluid-induced acrosome reaction distinguishes a subgroup of men with unexplained infertility not identified by semen analysis. ***Fertil Steril***, 52: 1048-54, 1989.

CANZLER, E.; AHRENDT, H.J.; AHRENDT, S. Experiences with levonorgestrel in postcoital contraception. ***Zentralbl Gynäkol***, 106:1182-91, 1984.

CHENG, F.P.; GADELLA, B.M.; VOORHOUT, W.F.; FAZELI, A.R.; BEVERS, M. M.; COLENBRANDER, B. Progesterone-induced acrosome reaction in stallion spermatozoa is mediated by a plasma membrane progesterone receptor. ***Biol Reprod***, 59:733-42, 1998.

CROSS, N.L.; MORALES, P.; OVERSTREET, J. W.; HANSON, F.W. Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. ***Gam Res***, 15:213-26, 1986.

DECLARAÇÃO DE HELSINKI III: Sobre os princípios éticos para pesquisas em seres humanos. (online) Edimburgo, Escócia, 2000 (acessada em 7 de outubro de 2001). Disponível na Internet:

<http://www.ibemol.com.br/declarações/helsinque>

DIAZ, J.; BAHAMONDES, L.; MONTEIRO, I.; PETTA, C.; HIDALGO, M.M.; ARCE, X.E. Acceptability and performance of the levonorgestrel-releasing intrauterine system (Mirena®) in Campinas, Brazil. ***Contraception***, 62:59-61, 2000.

DURAND, M.; CRAVIOTO, M.C.; RAYMOND, E.G.; DURÁN-SANCHEZ, O.; CRUZ-HINOJOSA, M.D.L.; CASTELL-RODRÍGUEZ, A.; SCHIAVON, R.; LARREA, F. On the mechanisms of action of short-term levonorgestrel administration in emergency contraception. *Contraception*, 64:227-34, 2001.

EL-MAHGOUB, S. The norgestrel-T DIU. *Contraception*, 22:271-86, 1980.

FAÚNDES, A.; ALVAREZ, F.; DIAZ, J. A Latin American experience with Levonorgestrel IUD. *Ann Med*, 25:149-53, 1993.

FELLMAN, C.W.; GREEN, T.R.; EICHER, A.L. The oxidation of hypotaurine to taurine: bis-aminoethyl-alfaldisulfone, a metabolic intermediate in mammalian tissue. *Adv Exp Med Biol*, 210:39-48, 1987.

FLESCH, F.M.; COLENBRANDER, B.; VAN GOLDE, L.M.G.; GADELLA, B.M. Capacitation induces tyrosine phosphorylation of proteins in the boar sperm plasma membrane. *Biochem Biophys Res Commun*, 262:787-92, 1999.

FLESCH, F.M.;GADELLA, B.M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochim Biophys Act*, 1469:197-235, 2000.

FLORMANN, H. M.; FIRST, N.L. The regulation of the acrosomal exocytosis: I. Sperm capacitation is required for the induction of the acrosome reactions by the bovine zona pellucida in vitro. *Dev Biol*, 128:453-63, 1988.

FLORMAN, H.M. Sequential focal and global elevations of sperm intracellular Ca^{+2} are initiated by the zona pellucida during acrossomal exocytosis. *Dev Biol*, 165:152-64, 1994.

FOEGH, M.; NICOL, K.; PETERSEN, I.B.; SCHOU, G. Clinical evaluation of long-term treatment with levonorgestrel and testosterone enanthate in normal men. **Contraception**, 21:631-40, 1980.

FOEGH, M. Evaluation of steroids as contraceptives in men. **Act Endocrinol**, 260(Suppl.):3-48, 1983.

FORESTA, C.; ROSSATO, M.; DI VIRGILIO, F. Ion fluxes through the progesterone-activated channel of the sperm plasma membrane. **Biochem J**, 294:279-83, 1993.

FRASER, L. R. New insights into possible causes of male infertility. **Human Reprod**, 14:38-46, 1999.

GARCIA, M.A.; MEIZEL, S. Progesterone-mediated calcium influx and acrosome reaction of human spermatozoa: pharmacological investigation of T-type calcium channels. **Biol Reprod**, 60:102-9, 1999.

GARCIA, S.M. L.; JECKEL NETO, E.; FERNANDEZ, C. G. **Embriologia**. Porto Alegre, Artes Médicas, 1991. 350p.

GONCHAROV, N.B.; CATZIA, G.V.; BUTNEV, V.U.; GORLUSKIN, V.M.; WAITES, G.M.H. A non-human primate study (baboon) to determine if a long-acting progestagen, levonorgestrel butanoate, combined with a long-acting androgen, testosterone buciclate, can suppress spermatogenesis: II Efficacy study. **Int J Androl**, 18:83-7, 1995.

GRIMES, D. A.; RAYMOND, E. G. Emergency contraception. **Ann Inter Med**, 137:180-9, 2002.

HAFEZ, E.S.E. Function of the fallopian tube in human reproduction. **Clin Obstet Gynecol**, 22:61-78, 1978.

HEIKKILÄ, M.; NYLANDER, P.; LUUKKAINEN, T. Body iron stores and patterns of bleeding after insertion of levonorgestrel- or a copper-releasing intrauterine device. **Contraception**, 26:465-9, 1982.

HENKEL, R.; MÜLLER, C.; MISKA, W.; GIPS, H.; SCHILL, W.B. Determination of the acrosome reaction in human spermatozoa is predictive of fertilization *in vitro*. **Hum Reprod**, 8:2128-32, 1993.

HERTZEN, H. V.; VAN LOOK, P.F.A. Randomised controlled trial of levonorgestrel versus the Yuspe regimen of combined oral contraceptives for emergency contraception. Task Force on postovulatory methods of Fertility Regulation. **Lancet**, 353:428-33, 1998.

HUXTABLE, R.J. Physiological actions of taurine. **Physiol Rev**, 72:101-63, 1992.

IBORRA, A.; COMPANYÓ, M.; MARTÍNEZ, P.; MORROS, A. Cholesterol efflux promotes acrosome reaction in goat spermatozoa. **Biol Reprod**, 62:378-83, 2000.

JOHANSSON, E.; BRACHE, V.; ALVAREZ, F.; FAUNDES, A.; COCHON, L.; RANTA, S. et al. Pharmacokinetic study of different dosing regimens of levonorgestrel for emergency contraception in healthy women. **Hum Reprod**, 17:1472-6, 2002.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Aparelho reprodutor feminino. In: JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 8^a ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1995. p.367-88.

KAUL, G.; SINGH, S.; GANDHI, K.K.; ANAND, S.R. Calcium requirement and time course of capacitation of goat spermatozoa assessed by chlortetracycline assay. **Andrologia**, 29:243-51, 1997.

KESSERÜ, E.; LARRAÑAGA, A.; PARADA, J. Post-coital contraception with d-norgestrel. **Contraception**, 7:367-79, 1973.

KESSERÜ, E.; GARMENDIA, F.; WESTPHAL, N.; PARADA, J. The hormonal and peripheral effects of d-norgestrel in postcoital contraception. **Contraception**, 10:411-24, 1974.

KUBBAR, A.A.; WHITE J O; GUILLEBAUD J; ELDER M G. The biochemistry of human endometrium after two regimens of postcoital contraception: a dl-norgestrel/ethinylestradiol combination or danazol. **Fertil Steril**, 45:512-6, 1986.

LEESE, H.; GRAY, S. Vascular perfusion: a novel means of studying oviduct function. **Am J Physiol**, 248:624-32, 1985.

LEESE, H. J. The formation and function of oviduct fluid. **J Reprod Fertil**, 82:843-56, 1988.

LEYTON, L.; SALING, P. 95Kd sperm proteins bind ZP3 and serves as tyrosine substrates in response to zona binding. **Cell**, 57:1123-30, 1989.

LING, W.Y.; ROBICHAUD, A.; ZAYID, I.; WRIXON, W.; MACLEOD, S.C. Mode of action of DL-norgestrel and ethinylestradiol combination in postcoital contraception. **Fertil Steril**, 32:297-302, 1979.

LING, W.Y.; WRIXON, W.; ZAYID, I.; ACORN, T.; POPAT, R.; WILSON, E. Mode of action of dl-norgestrel and ethinylestradiol combination in postcoital contraception. II. Effect of postovulatory administration on ovarian function and endometrium. **Fertil Steril**, 39:292-7, 1983.

LÍPPEZ, J.; KRAMER, J.; ALFONSO. L.A.; DACALOS, E.D.; LUCERO, R. Human oviductal fluid proteins. **Fertil Steril**, 36:623-9, 1981.

LIPPES, J.; WAGH, P.V. Human oviductal fluid (hOF) proteins.IV Evidence for hOF proteins binding to human sperm. **Fertil Steril**, 51:89-94, 1989

LLANOS, M.N.; VIRGIL, P.; SALGADO, A.M.; MORALES, P. Inhibition of the acrosome reaction by trypsin inhibitors and prevention of penetration of spermatozoa through the human zona pellucida. **J Reprod Fertil**, 97:173-8, 1993.

LUCONI, M.; BONACCORSI, L.; MAGGI, M.; PECCHIOLI, P.; KRAUSZ, C.; FORTI, G; BALDI, E. Identification and characterization of functional nongenomic progesterone receptors on human sperm membrane. **J Clin Endocrinol Metab**, 83:877-85, 1998.

LUUKKANEN, T.; NILSSON, C.G. Performance of copper and steroid-releasing IUDs. In: Proceedings of Symposium on Recent Advances in Reproduction and Control of Fertility (ed. G.P.Talwar). 1978; Elsevier / North Holland, Amsterdam. 1978. p.551-7.

LUUKKAINEN, T.; ALLONEN, H.; HAUKKAMAA, M.; LÄHTEENMÄKI, P.; NILSSON, C.G.; TOIVONEN, J. Five year's experience with levonorgestrel-releasing IUDs. **Contraception**, 33:139-48, 1986.

MALETTE, B.; PAQUETE, Y.; MERLEN, Y.; BLEAU, G. Oviductins possess chitinase- and mucin-like domains: a lead in the search for the biological function of these oviduct-specific ZP-associating glycoproteins. **Mol Reprod Dev**, 41:384-97, 1995.

MEIZEL, S.; TURNER, K. O. Chloride efflux during the progesterone-initiated human sperm acrosome reaction is inhibited by lavendustin A, a tyrosine kinase inhibitor. **J Androl**, 17:327-30, 1996.

MELENDREZ , C.S.; MEIZEL, S.; BERGER, T. Comparison of the ability of progesterone and heat solubilized porcine zona pellucida to initiate the porcine sperm acrosome reaction in vitro. ***Mol Reprod Dev***, 39:433-8, 1994.

MISKA, W.; FEHL, P.; HENKEL, R. Biochemical and immunological characterization of the acrosome reaction-inducing substance (ARIS) of hFF. ***Biochem Biophys Res Comm***, 199:125-9, 1994.

MONTEIRO, I.; BAHAMONDES, L.; DIAZ , J.; PERROTTI, M.; PETTA, C. Therapeutic use of levonorgestrel-releasing intrauterine system in women with menorrhagia: a pilot study(1). ***Contraception***, 65:325-8, 2002.

MORTIMER, D. Sperm transport in the female genital tract. In: GRUDZINSKAS J.G.; YOVIDICH J.L. (eds). **Gametes-the spermatozoon**. Cambridge University Press. 1995. p.157-74.

MURASE, T.; ROLDAN, E.R.S. Progesterone and the zona pellucida activate different transducing pathways in the sequence of events leading to diacylglycerol generation during mouse sperm acrossomal exocytosis. ***Biochem J***, 320:1017-23, 1996.

NIKKANEN, V.; SÖDERSTRÖM, K.; TUUSA, S.; JAAKKOLA, U. Effect of local epididymal Levonorgestrel on the fertilizing ability of male rat, a model for post-testicular contraception. ***Contraception***, 61:401-6, 2000.

NILSSON, C.G.; LUUKKAINEN, T. Improvement of a d-norgestrel-releasing IUD ***Contraception***, 15:295-306, 1977.

NILSSON, C.G.; LUUKKAINEN, T.; ARKO, H. Endometrial morphology of women using a d-norgestrel-releasing intrauterine device. ***Fertil Steril***, 29:397-401, 1978.

NILSSON, C. G.; LÄHTEENMÄKI, P.; LUUKKAINEN, T. Levonorgestrel plasma concentrations and hormone profiles after insertion and after one year of treatment with a levonorgestrel-IUD. **Contraception**, 21:225-33, 1980.

NILSSON, C.G.; LUUKKAINEN, T.; DIAZ, J.; ALLONEN, H. Intrauterine contraception with Levonorgestrel. A comparative randomized clinical performance study. **Lancet**, 1:577-80, 1981.

NILSON, C.G.; HAUKKAMAA, M.; VIEROLA, H.; LUUKKAINEN, T. Tissue concentrations of Levonorgestrel in women using a Levonorgestrel-releasing IUD. **Clin Endocrinol**, 17:529-36, 1982.

NILSSON, C.G.; ALLONEN, H.; DIAZ, J.; LUUKKAINEN, T. Two year's experience with two levonorgestrel-releasing intrauterine devices and one copper-releasing intrauterine device: A randomized comparative performance study. **Fertil Steril**, 39:187-92, 1983

OEHNINGER, S.; SUELDO, C.; LANZENDORF, S.; MAHONY, M.; BURKMAN, L.J.; ALEXANDER, N.J. et.al. A sequential analysis of the effect of progesterone of specific sperm functions crucial to fertilization in vitro in infertile patients. **Hum Reprod**, 9:1322-7, 1994.

OKAMURA, N.; TAJIMA, Y.; SUGITA, Y. Regulation of mammalian sperm activity by bicarbonate in genital fluids. In: MOHRI, H. (ed.). **New horizons in sperm cell research**. Japan Sci. Soc. Press, 1987. p.197-203.

OSMAN, R.A.; ANDRIA, M.L; JONES, A.D.; MEIZEL, S. Steroid induced exocytosis: the human sperm acrosome reaction. **Biochem Biophys Res Commun**, 160:828-33, 1989.

PERREAULT S.D.; ROGERS, B.J. Capacitation pattern of human spermatozoa. **Fertil Steril**, 38:258-60, 1982.

RISOPATRÓN, J.; PEÑA, P.; MISKA, W.; SÁNCHEZ, R. Evaluation of the acrosome reaction in human spermatozoa: comparison of cytochemical and fluorescence techniques. **Andrologia**, 33:63-7, 2001.

ROBLERO, L.; GUADARRAMA, A.; ORTIZ, M.E.; FERNANDEZ, E.; ZEGERS-HOCHSCHILD, F. High potassium concentration improves the rate of acrosome reaction in human spermatozoa. **Fertil Steril**, 49:676-9, 1988.

ROLDAN, E.R.S.; MURASE, T.; SHI, Q.X. Exocytosis in response to progesterone and zona pellucida. **Science**, 266:1578-81, 1994.

SEREGELY, G. Results of multicentre trial of Postinor. **Ther Hung**, 30:72-8, 1982.

SIRIVAIDYAPONG, S.; BEVERS, M.M.; COLENBRANDER, B. Acrosome reaction in dog sperm is induced by a membrane-localized progesterone receptor. **J Androl**, 20:537-44, 1999.

SMITH, T.T.; YANAGIMACHI, R. Distribution and number of spermatozoa in the oviduct of the golden hamster after natural mating and artificial insemination. **Biol Reprod**, 37:225-34, 1987.

SUELDO, C.; OEHNINGER, S.; SUBIA, E.; MAHONY, M.; ALEXANDER, N.; BURKMAN, L.J. *et al.* Effect of progesterone on human zona pellucida sperm binding and oocyte penetrating capacity. **Fertil Steril**, 60:136-40, 1993.

SYROP, H.; HALME, J. Peritoneal fluid environment and infertility. **Fertil Steril**, 48:1-9, 1987.

SZASZ, F.; SIRIVAIDYAPONG, S.; CHENG, F.P.; VOORHOUT, W.F.; MARKS, A.; COLENBRANDER, B. *et al.* Detection of calcium ionophore induced membrane changes in dog sperm as a simple method to predict the cryopreservability of dog semen. **Mol Reprod Dev**, 55:289-98, 2000.

TESARIK, J.; MENDOZA, C.; MOSS, J.; CARRERAS, A. Selective expression of progesterone receptor on the human sperm surface. *Fertil Steril*, 58:784-92, 1992.

TESARIK, J.; CARRERAS, A.; MENDOZA, C. Differential sensitivity of progesterone and zona pellucida-induced acrosome reactions to pertussis toxin. *Mol Reprod Dev*, 34:183-9, 1993.

THALER, C.D.; CARDULLO, R.A. The initial molecular interaction between mouse sperm and the zona pellucida is a complex binding event. *J Biol Chem*, 271:23289-97, 1996.

TÖPFER-PETERSEN, E.; PETROUNKINA, A.M.; EKHLASI-HUNDRIESER, M. Oocyte-sperm interactions. *Animal Reprod Sci*, 60-61:653-62, 2000.

TREMBLAY, D.; GAINER, E.; ULMANN, A. The pharmacokinetics of 750µg levonorgestrel following administration of one single dose or two doses at 12- or 24 interval. *Contraception*, 64:327-31, 2001.

VERHAGE, H. G.; FAZLEABAS, A.T.; DONNELLY, K. The in vitro synthesis and release of proteins by the human oviduct. *Endocrinology*, 122:1639-45, 1988.

VISCONTI, P.E.; BAILEY, J.L.; MOORE, G.D.; PAN, D.; OLDS-CLARKE, P. Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development*, 121:1129-37, 1995.

WASSARMAN, P.M. Mouse gamete adhesion molecules. *Biol Reprod*, 46:186-91, 1992.

WASSARMAN, P.M. Mammalian fertilization: molecular aspects of gamete adhesion, exocytosis, and fusion. *Cell*, 96:175-83, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO laboratory manual for examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. Cambridge (UK): Cambridge University Press, 1992. p.1-20.

WORLD HEALTH ORGANIZATION TASK FORCE ON METHODS FOR THE REGULATION OF MALE FERTILITY. Rates of testosterone-induced suppression to severe oligospermia or azoospermia in two multinational clinical studies. *Int J Androl*, 18:157-65, 1995.

YANAGIMACHI R. Mammalian Fertilization. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. (eds.) **Physiology of Reproduction**. Raven Press, New York, 1988. p.135-85

YANAGIMACHI R. Mammalian fertilization. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. (eds.) **Physiology of reproduction**. Raven Press, New York, 1994. p.189-317.

YOUNG, D. C.; WIEHIE, R. D.; JOSHI, S. G.; POINDEXTER, A. N. Emergency contraception alters progesterone-associated endometrial protein in serum and uterine luminal fluid. *Obstet Gynecol*, 84:266-71, 1994.

YUZPE, A. A.; THURLOW, H.J.; RAMZY, I., LEYSHON, J.I. Post coital contraception- a pilot study. *J Reprod Med*, 13:53-8, 1974.

8. Bibliografia de Normatizações

FRANÇA, J.L.; BORGES, S.M.; VASCONCELLOS, A.C.; MAGALHÃES, M.H.A.
– **Manual para normatização de publicações técnico-científicas**. 4^a ed.,
Editora UFMG, Belo Horizonte, 1998. 213p.

Normas e procedimentos para publicação de dissertações e teses. Faculdade
de Ciências Médicas, UNICAMP. Ed. SAD – Deliberação CCPG-001/2002.

9. Anexos

9.1. Anexo 1 - Termo de consentimento informado

ESTUDO: EFEITO DA ADIÇÃO DE LEVONORGESTREL SOBRE A REAÇÃO ACROSSOMAL DE ESPERMATOZÓIDES DE HOMENS FÉRTEIS

Eu, _____ fui informado que a finalidade deste estudo é melhorar o conhecimento em relação ao efeito de um componente hormonal, usado em muitos anticoncepcionais (Levonorgestrel), sobre a capacidade de fertilizar dos espermatozóides humanos.

Entendo que serei convidado a fornecer uma amostra de sêmen por semana, durante 5 semanas, em dias e horas a serem determinadas.

Também me foi esclarecido que estas amostras deverão ser obtidas por masturbação, em ambiente próprio existente no Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM) da UNICAMP.

Esta pesquisa não trará nenhum benefício para mim, e apenas estarei contribuindo para o progresso da ciência.

Fui esclarecido que o sêmen não será utilizado para outros fins que o desta pesquisa, sendo descartado ao fim de cada experimento.

Fui esclarecido que serei compensado com os gastos de transporte e que será fornecida uma declaração de comparecimento para que eu possa apresentá-la no meu trabalho a cada dia de coleta do sêmen.

Fui esclarecido e informado a respeito deste estudo.

Eu tenho e continuarei tendo oportunidade de esclarecer qualquer dúvida sobre a pesquisa e sobre minha participação nela, devendo receber respostas satisfatórias às perguntas que nesse sentido forem feitas por mim.

Eu concordo em participar voluntariamente do estudo anteriormente citado.

Também fui informado que posso interromper minha participação a qualquer momento da pesquisa ou que posso me recusar a participar, e que isto não trará nenhum prejuízo nos atendimentos futuros na UNICAMP.

Todos os dados em relação a meu nome serão mantidos de forma sigilosa.

Assinatura do voluntário

Testemunha

Investigador – Dr. Luis Bahamondes

F: (19) 3788-7176

Data ____/____/____

Comitê de Ética em Pesquisa – UNICAMP
F: (19) 3788-9346

9.2. Anexo 2 - Esquema geral do projeto

