

Técnica de Formação de Complexos de Inclusão para Incorporação de Colesterol e Desmosterol na Membrana Plasmática de Espermatozoides

Hymerson Costa Azevedo¹

O colesterol e desmosterol, presentes em abundância no plasma seminal e no espermatozóide, desempenham um importante papel sobre a capacidade fecundante dos espermatozoides, tendo sido identificadas suas ações na estabilização dos lipídios de membrana e inibição da capacitação espermática (ZARINTASH; CROSS, 1996; SION et al., 2001; NIMMO; CROSS, 2003). A incorporação de colesterol ou desmosterol à membrana plasmática pode diminuir os efeitos da criocapacitação que reduz o tempo de sobrevivência dos espermatozoides contidos no sêmen congelado. Os processos de refrigeração e congelamento do sêmen antecipam a maturação das membranas espermáticas, aumentando assim a proporção de espermatozoides capacitados ou com o acrossomo reagido em comparação ao sêmen in natura (MAXWELL; WATSON, 1996). A sua sobrevivência é então limitada porque os espermatozoides capacitados não possuem um período de vida prolongado, eles são ativados como preparação para o encontro do oócito e, se isso não ocorrer em um curto período de tempo, eles morrem (WATSON, 1995).

Um método para melhorar a qualidade do sêmen pós-descongelamento é tratar o espermatozóide com o colesterol associado à Metil- β -ciclodextrina (M β CD). Esse tratamento induz a uma maior resistência da membrana plasmática a temperaturas mais baixas fazendo com que o espermatozóide responda melhor ao estresse físico da criopreservação (BARRERA-COMPEAN et al., 2005).

A M β CD é um açúcar circular e pode incorporar um lipídeo no centro do círculo que compõe sua estrutura, desta forma, o colesterol é carregado apresentando-se em um formato que permite prontamente a sua incorporação à membrana plasmática do espermatozóide (IBORA et al., 2000; BARRERA-COMPEAN et al., 2005).

A M β CD carregada com colesterol forma o chamado complexo de inclusão de colesterol, Colesterol-Metil- β -Ciclodextrina, descrito pela maioria dos autores simplesmente como CLC da união das iniciais das palavras em inglês *cholesterol* e *cyclodextrin*.

Objetivo

O objetivo deste trabalho é de descrever detalhadamente uma metodologia adaptada e modificada por Azevedo (2006) para formação do complexo de inclusão de colesterol e desmosterol com a metil- β -ciclodextrina (M β CD) originalmente descrita por Purdy e Graham (2004a e 2004b).

¹Médico-veterinário, doutor em Medicina Veterinária, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, hymerson@cpatc.embrapa.br.

Procedimentos

- Inicialmente são preparadas em um tubo de ensaio de 15 mL as soluções do complexo de inclusão de colesterol (CLC) ou de desmosterol (DLC) (Anexo I e II).

- Essas soluções devem ser completamente homogeneizadas com auxílio de um agitador de tubos e, em seguida, submetidas a um fluxo contínuo e suave de gás de nitrogênio (N₂) com pureza mínima de 90%.

- Os tubos devem ser acoplados a um sistema fechado de evaporação (SFE) como demonstrado na Figura 1, o qual é montado dentro de uma capela de fluxo.

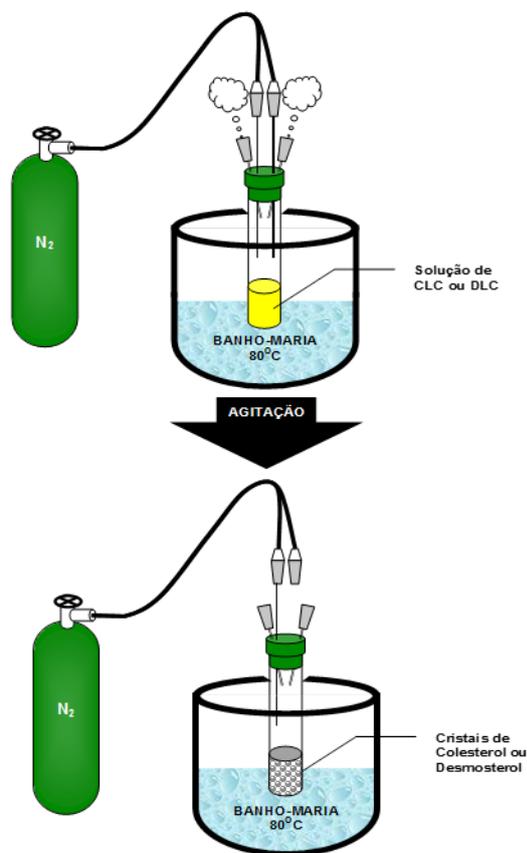


Figura 1. Sistema fechado de evaporação (SFE) utilizado no processo de formação dos cristais de colesterol e desmosterol.

- O SFE consiste na fixação de dois pares de agulhas atravessando as rolhas de borracha que fecham os tubos: um par de cateteres intravenosos de 14G (2,1 x 48 mm) posicionado no centro para a entrada do fluxo de gás de N₂ proveniente de um cilindro anexado ao sistema por meio de mangueiras. Outro par de agulhas de maior calibre (16G) e mais curtas (1,60 x 40 mm) é posicionado nas extremidades da rolha, para servir como uma espécie de sumidouro de escoamento do gás resultante da remoção dos solventes por evaporação.

- Durante a evaporação, os tubos contendo as soluções são mantidos sob aquecimento em banho-maria à 80°C e sob constante agitação. Esse procedimento evita que as soluções sejam resfriadas rapidamente antes da evaporação dos solventes, assegurando assim a remoção dos traços restantes do material volátil.

- Após a evaporação dos solventes sob o jato de N₂, os tubos contendo os cristais de CLC e de DLC são levados à estufa à 37°C e mantidos abertos por 24 horas para garantir que qualquer resíduo de solvente seja completamente evaporado.

- Por fim, os cristais devem ser armazenados à temperatura ambiente até o seu uso (Figura 2).

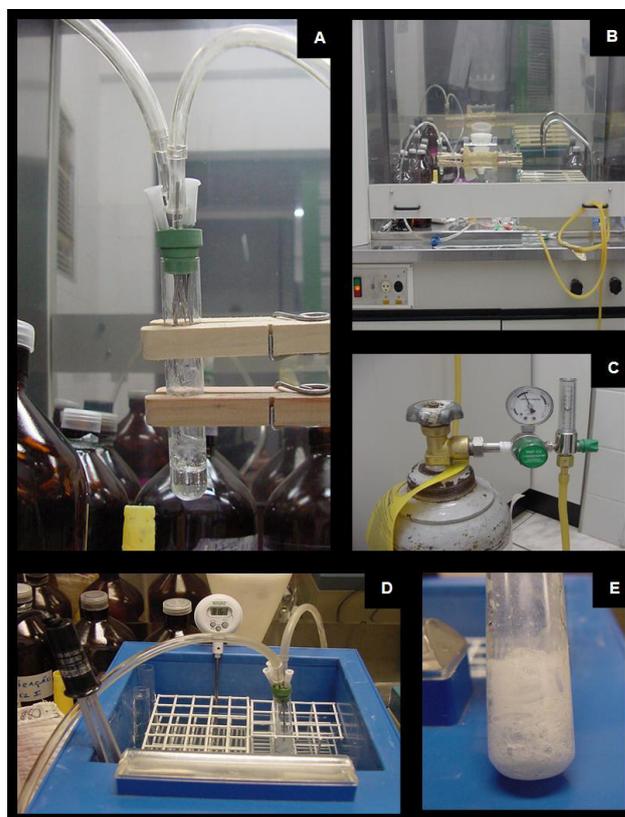


Figura 2. Painel de fotos do processo de formação dos cristais de colesterol e desmosterol: A - solução de CLC ou DLC sob fluxo de N₂ em sistema fechado de evaporação (SFE); B - capela para manipulação de substâncias tóxicas com o sistema fechado de evaporação montado; C - cilindro de N₂ acoplado ao sistema de mangueiras; D - banho-maria contendo os tubos com a solução de CLC ou DLC; E - Cristais de CLC ou DLC após a evaporação dos solventes.

Referências

- AZEVEDO, H.C. **Integridade e funcionalidade dos espermatozoides ovinos submetidos à criopreservação após a incorporação de colesterol, desmosterol, ácido oléico-linoléico e α -lactoalbumina.** 2006. 195 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- BARRERA-COMPEAN, M. H.; PURDY, P.H.; DZAKUMA, J. M.; NEWTON, G. R.; NUTI, L. C. Cholesterol-loaded cyclodextrins improves post- thaw goat sperm motility. **Journal of Animal Science**, v. 83, supl. 1, p. 153, 2005.
- IBORA, A.; COMPANYÓ, M.; MARTÍNEZ, P.; MORROS, A. Cholesterol efflux promotes acrosome reaction in goat spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 62, p.378-383, 2000.
- MAXWELL, W. M. C.; WATSON, P. F. Recent progress in the preservation of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 55-65, 1996.
- NIMMO, M. R.; CROSS, N. Structural features of sterols required to inhibit human sperm capacitation. **Biology of Reproduction**, v. 68, p. 1308-1317, 2003.
- PURDY, P. H.; GRAHAM, J. K. Effect of adding cholesterol to bull sperm membranes on sperm capacitation, the acrosome reaction, and fertility. **Biology of Reproduction**, v. 71, p. 522-527, 2004b.
- PURDY, P. H.; GRAHAM, J. K. Effect of Cholesterol – loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. **Cryobiology**, v. 48, p. 36-45, 2004a.
- SION, B.; GRIZARD, G.; BOUCHER, D. Quantitative analysis of desmosterol, cholesterol and cholesterol sulfate in semen by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v.935, p.259-265, 2001.
- WATSON, P. F. The interaction of egg yolk and ram spermatozoa studied with a fluorescent probe. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 42, p. 105-111, 1975.
- ZARINTASH, R. J.; CROSS, N. L. The unesterified cholesterol content of human sperm regulates response of the acrosome to the agonist, progesterone. **Biology of Reproduction**, v.55, p.19–24, 1996.

Anexo 1

Complexo de Inclusão Colesterol-Ciclodextrina (CLC)*

Solução de Colesterol

- Colesterol 90,0 mg
- Clorofórmio 0,45 mL

Solução de Ciclodextrina

- Metil- β -Ciclodextrina 1,0 g
- Metanol 2,0 mL

Solução de CLC

- Solução de Colesterol 0,45 mL
- Solução de Ciclodextrina 2,0 mL

*O rendimento em cristais de CLC é de aproximadamente 1,090 g.

Anexo II

Complexo de Inclusão Desmosterol-Ciclodextrina (DLC)*

Solução de Desmosterol

- Desmosterol 10,0 mg
- Clorofórmio 0,5 mL

Solução de Ciclodextrina

- Metil- β -Ciclodextrina 1,1111g
- Metanol 2,22 mL

Solução de DLC

- Solução de Desmosterol 0,5 mL
- Solução de Ciclodextrina 2,22 mL

*O rendimento em cristais de DLC é de aproximadamente 1,1211 g.

Comunicado Técnico, 151

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



Embrapa Tabuleiros Costeiros

Endereço: Avenida Beira Mar, 3250, CP 44,
CEP 49025-040, Aracaju - SE.

Fone: (79) 4009-1344

Fax: (79) 4009-1399

www.cpatc.embrapa.br

cpatc.sac@embrapa.br

1ª edição (2010)

Comitê Local de Publicações

Presidente: *Ronaldo Souza Resende.*

Secretária-Executiva: *Raquel Fernandes de Araújo Rodrigues*

Membros: *Edson Patto Pacheco, Élio César Guzzo,
Hymerson*

*Costa Azevedo, Ivênio Rubens de Oliveira, Joézio Luis dos
Anjos, Josué Francisco da Silva Junior, Luciana Marques
de Carvalho, Semiramis Rabelo Ramalho Ramos e Viviane
Talamini.*

Expediente

Supervisora editorial: *Raquel Fernandes de Araújo Rodrigues*

Tratamento das ilustrações: *Bryene Santana de Souza Lima*

Editoração eletrônica: *Bryene Santana de Souza Lima*