

**INTRODUÇÃO:** O etoposídeo é um agente semi-sintético amplamente utilizado, principalmente em combinação, para o tratamento de várias neoplasias que atingem homens em idade reprodutiva. O etoposídeo é um agente específico da fase mitótica cujo mecanismo de ação é a inibição da topoisomerase II. A adição de citoprotetores a esses esquemas terapêuticos é usada para preservar a capacidade reprodutiva masculina. A N-acetilcisteína (NAC) é um precursor da glutatona reduzida (GSH). O NAC exibe características quimiopreventivas e atividade antioxidante. Estudos farmacológicos demonstraram que o NAC é seguro para uso clínico, pertencendo à lista de medicamentos essenciais da Organização Mundial da Saúde (OMS). O NAC melhora os parâmetros do sêmen humano e protege as células das lesões causadas pelo stress oxidativo.

**OBJETIVOS:** Como não há estudos sobre os efeitos individuais do etoposídeo sobre a espermatogênese e nenhuma avaliação sobre o uso do NAC como citoprotetor em regimes de tratamento de etoposídeo, avaliamos os efeitos tóxicos sob exposição in-vitro de espermatozoides ao etoposídeo e avaliamos o potencial do NAC como um agente quimioprotetor.

Para isso, os parâmetros do sêmen, a condensação da cromatina e a fragmentação do DNA dos espermatozoides (sDNAfrag), e os perfis oxidativo e glicolítico dos espermatozoides, foram avaliados sob exposição in-vitro de espermatozoides ao etoposídeo, isolado ou em combinação com o NAC.

#### MATERIAL E MÉTODOS:

**Seleção dos pacientes e coleta das amostras seminais:** Amostras de sêmen de quarenta pacientes. Apenas espermatozoides ejaculados frescos de indivíduos normozoospermicos foram utilizados. Os critérios de inclusão masculina foram: ausência de patologias conhecidas e ingestão de medicamentos; exame físico normal, perfis hormonais e cariótipos normais; análise de sêmen sem aglutinação, formas imaturas, leucócitos e microrganismos; volume de sêmen  $\geq 1,5\text{mL}$  e concentração de espermatozoides de  $\geq 15 \times 10^6/\text{mL}$ .

**Desenho experimental:** As amostras foram submetidas individualmente ao mesmo procedimento experimental após normalização para uma concentração de espermatozoides de  $10 \times 10^6/\text{mL}$ .

Cada amostra de espermatozoides foi dividida em quatro condições experimentais diferentes. Cada experiência durou 2h e foi realizada numa incubadora umidificada com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

O grupo controle (CT) consistiu de espermatozoides incubados com SPM; O grupo Eto consistiu em incubar espermatozoides com 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$  de etoposídeo; O grupo NAC consistiu em incubar espermatozoides com 50 $\mu\text{M}$  NAC (Sigma); O grupo Eto + NAC consistiu em incubar espermatozoides com 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$  de etoposídeo mais 50  $\mu\text{M}$  de NAC.

As seguintes características dos espermatozoides foram avaliadas: motilidade progressiva rápida, teste de hiposmolaridade (HOST), condensação da cromatina, sDNAfrag, e perfis glicolítico e oxidativo.

**Métodos: Determinação da condensação de cromatina dos espermatozoides:** A condensação de cromatina foi avaliada pela coloração com azul de anilina ácida. 200 espermatozoides foram avaliados e a percentagem de cabeças coradas de azul escuro, indicando núcleos ricos em histonas imaturas, foi calculada.

**Determinação do sDNAfrag:** A fragmentação do ADN foi avaliada pelo ensaio Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labelling (TUNEL) utilizando o Kit In-Situ Cell-Death Detection Kit, Fluorescein. 200 espermatozoides morfológicamente normais foram avaliados. O número de espermatozoides que emitiram fluorescência verde (TUNEL-positivo) foi registado como percentagem do total de espermatozoides contados (DAPI positivo).

**Determinação de marcadores de stress oxidativo:** O stress oxidativo foi avaliado pelo conteúdo carbonil da célula, um marcador de oxidação de proteína; medindo produtos aldeído, tais como 4-hidroxinonenal (4-HNE), um indicador de peroxidação lipídica; e pela quantificação de 3-nitrotirosina (3-NT), um indicador de formação de peroxinitrito dependente do superóxido. Os respectivos conteúdos foram avaliados utilizando a técnica de Slot-Blot e anticorpos específicos. Os resultados são apresentados como variação de dobra para o grupo de controle.

**Determinação do metabolismo de espermatozoides** pela técnica de Ressonância magnética nuclear de prótons (RMN-<sup>1</sup>H): Após incubação, os metabolitos extracelulares foram adquiridos por RMN de <sup>1</sup>H. O fumarato de sódio foi utilizado como referência interna para quantificar os seguintes metabolitos: H1- $\alpha$  glucose; colina (PC); piruvato; acetato e lactato. As áreas relativas das ressonâncias de <sup>1</sup>H-RMN foram quantificadas usando ajuste de curva fornecida com o programa de análise espectral de RMN.

#### RESULTADOS E CONCLUSÕES: os resultados evidenciaram que

A exposição in-vitro ao etoposídeo não comprometeu a motilidade, a viabilidade, nem os perfis oxidativo e metabólico dos espermatozoides.

O etoposídeo causou um aumento significativo de espermatozoides com cromatina descondensada e sDNAfrag, que foram **completamente revertidos pelo NAC**.

O NAC desempenhou um papel protetor, pois protegeu totalmente o DNA dos espermatozoides contra a descondensação da cromatina e a fragmentação induzida pelo etoposídeo.

**Nos espermatozoides submetidos a um meio pró-oxidante** (exposição ao etoposídeo), o NAC pode atuar em diferentes níveis celulares, pois não interferiu no mecanismo de motilidade, impactou negativamente na resiliência da membrana, induziu a nitração proteica e preveniu lesões no DNA.

Como os espermatozoides expostos ao etoposídeo não alteraram o estado oxidativo dos espermatozoides, os resultados também sugerem que o etoposídeo pode afetar diretamente a condensação da cromatina e a fragmentação do DNA através de **mecanismos não mediados pelo stress oxidativo**.

Portanto, numa célula, como o espermatozoide, que não possui mecanismos de auto-reparação, a capacidade do NAC em prevenir ou bloquear os efeitos deletérios causados pela exposição ao etoposídeo é uma **forte evidência para seu uso em terapias adjuvantes**.

Os resultados ilustram que nem o etoposídeo nem o NAC afetaram o perfil glicolítico dos espermatozoides. Este é o **primeiro relato** dos efeitos do etoposídeo e / ou NAC no metabolismo da glucose em espermatozoides.

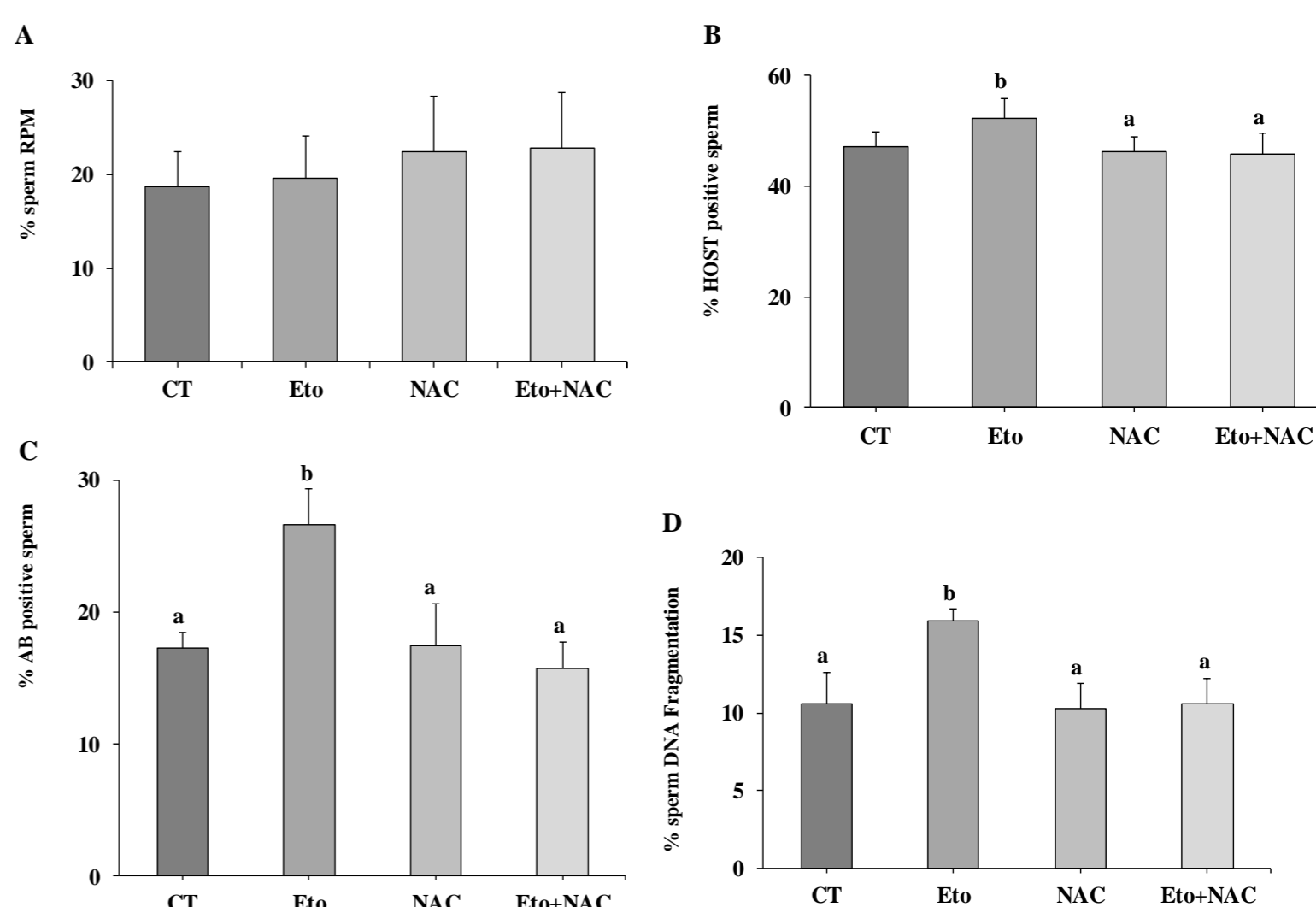
O aumento na produção de acetato no grupo Eto + NAC, juntamente com os efeitos protetores sobre a integridade do DNA, sugere que **o espermatozoide depende do metabolismo do acetato** para sobreviver, já que essa fonte de carbono pode contribuir para a produção de acetilcolina. Assim, na presença de etoposídeo, o NAC aumenta a produção de acetato para neutralizar os efeitos tóxicos do etoposídeo.

Outra observação curiosa foi o aumento da produção de colina pelo NAC. Estamos provavelmente perante **um novo mecanismo** de ação que pode explicar por que o uso sozinho ou **sem as células estarem sob stress, o NAC tem um efeito pró-oxidante**, em vez de um efeito antioxidante.

Ao contrário, na presença de etoposídeo, que seria esperado inibir a biossíntese de PC diretamente pela acidificação intracelular após a indução de apoptose e, assim, levar ao acúmulo de colina, o NAC neutraliza esse efeito, exibindo um **efeito antioxidante em células já sob stress**.

Esta **ação dupla** é ainda apoiada pela observação de que o NAC diminuiu a apoptose induzida pelo etoposídeo para valores semelhantes ao grupo controle em relação à integridade do DNA. Neste contexto, o NAC protegeu a cromatina contra as lesões induzidas por etoposídeo, favorecendo a biossíntese de PC e, portanto, a integridade do invólucro nuclear.

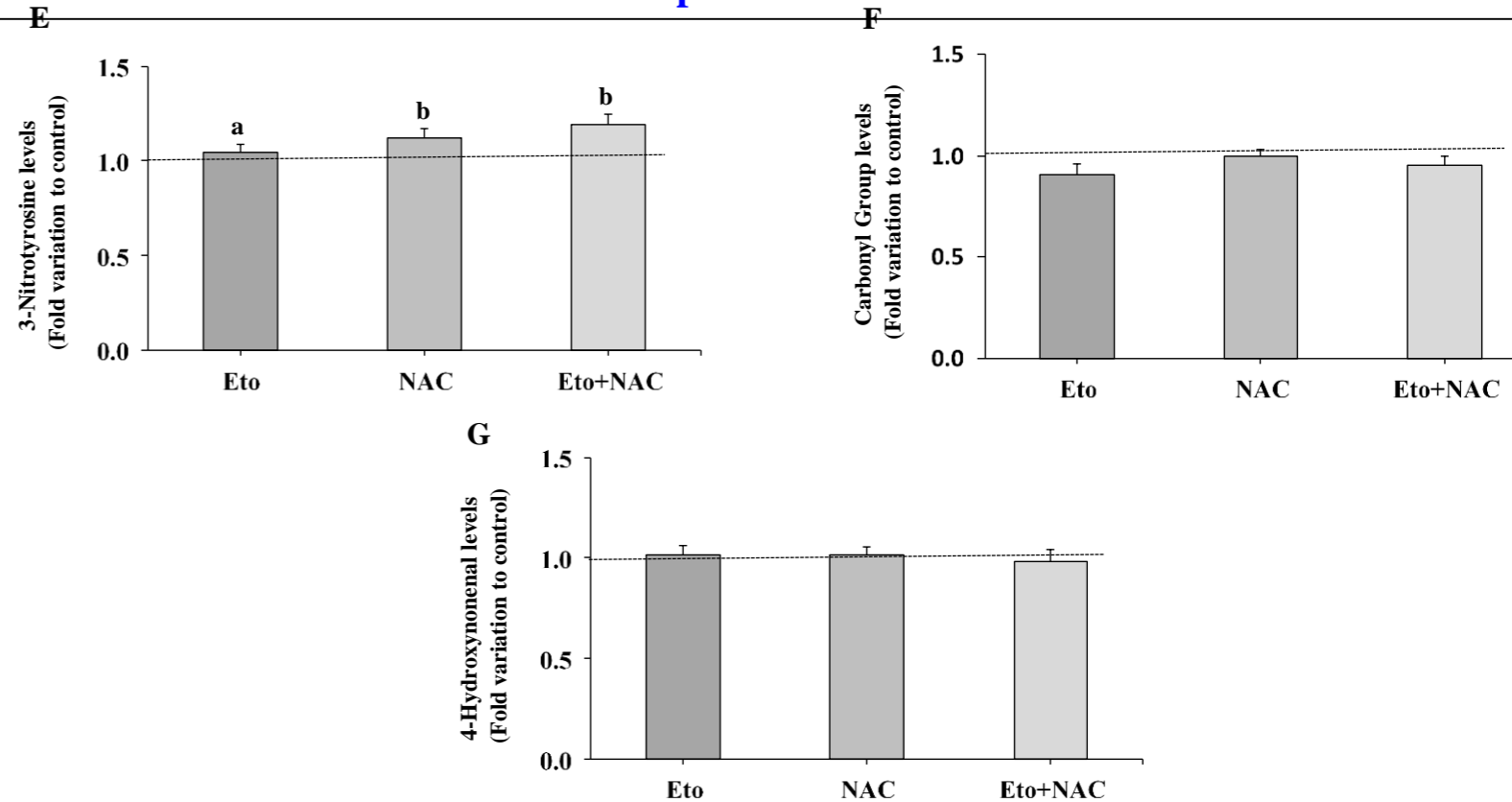
#### Efeitos da exposição ao etoposídeo e ao NAC sobre os parâmetros seminais e a integridade do DNA dos espermatozoides



**A:** sperm rapid progressive motility (RPM);  
**B:** sperm membrane integrity assessed by hypo-osmotic swelling test (HOST);  
**C:** sperm immature chromatin condensation assessed by aniline blue staining (AB);  
**D:** sperm DNA fragmentation assessed by TUNEL assay;

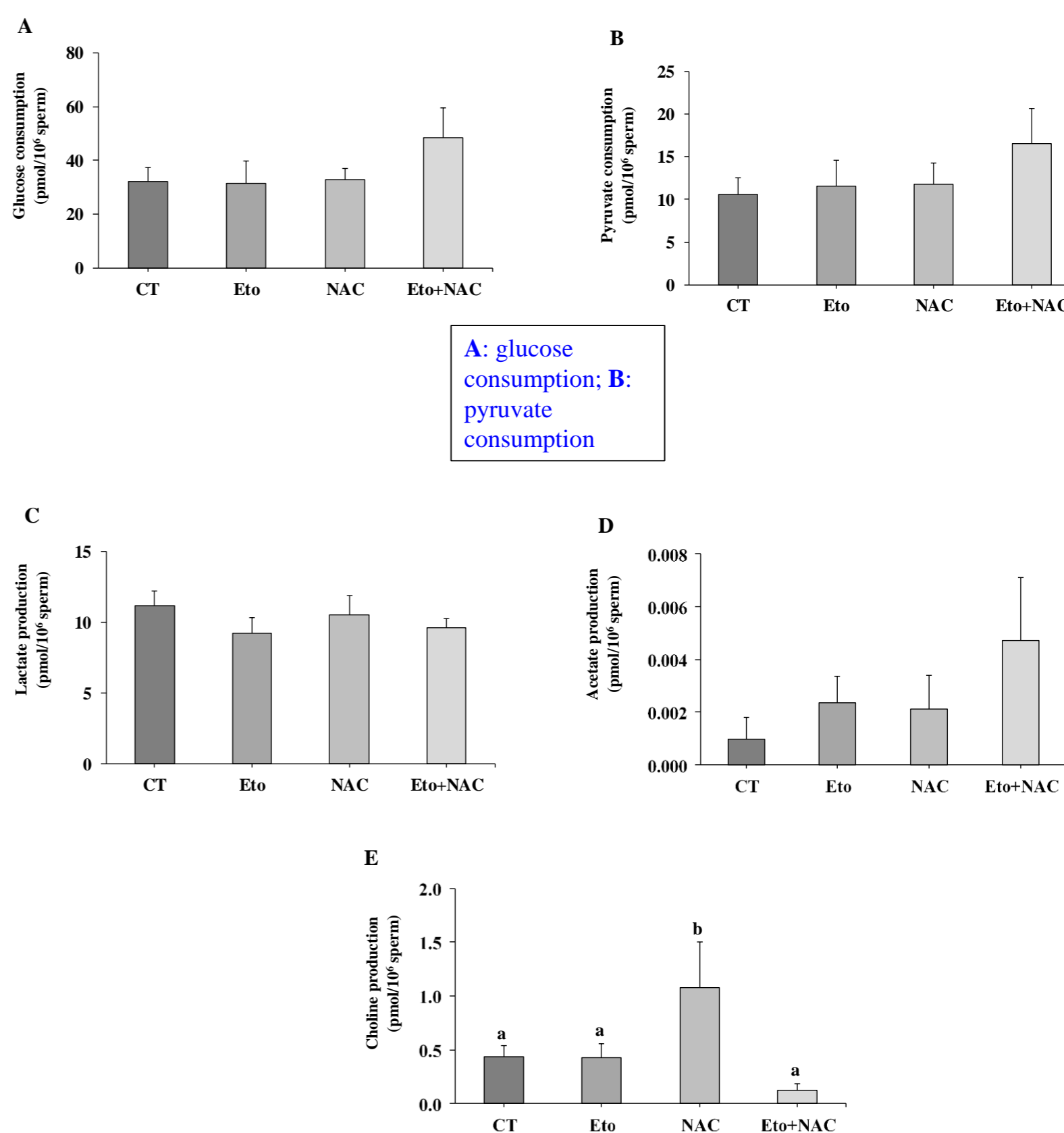
**CT:** control group; **Eto:** sperm treated with 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$  etoposide; **NAC:** sperm treated with 50 $\mu\text{M}$  NAC; **Eto+NAC:** sperm treated with 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  etoposide and 50 $\mu\text{M}$  NAC.

#### Efeitos da exposição ao etoposídeo e ao NAC sobre os marcadores do stress oxidativo dos espermatozoides



**E:** protein nitration;  
**F:** protein oxidation;  
**G:** lipid peroxidation

#### Efeitos da exposição ao etoposídeo e ao NAC sobre o metabolismo dos espermatozoides



**C:** lactate production;  
**D:** acetate production;  
**E:** choline production.