

## O Knock-out do gene que codifica a insulinsina diminui a qualidade espermática de ratinhos

*Knock-out of insulysin gene impairs sperm quality of mice*

Meneses M.J.<sup>1,2,3</sup>, Dias T.R.<sup>4</sup>, Martins F.O.<sup>2</sup>, Borges D.O.<sup>2</sup>, Oliveira P.F.<sup>3,5</sup>, Macedo M.P.<sup>2</sup>, Alves M.G.<sup>4</sup>

ARTIGO ORIGINAL | ORIGINAL ARTICLE

### RESUMO

A insulinsina ou enzima degradadora da insulina é uma metaloprotease que cliva e inativa a insulina e outros péptidos. Como tal, indivíduos que não possuem esta enzima ou têm uma mutação no gene que a codifica e que resulte na perda de função, apresentam hiperinsulinémia. Apesar de a insulinsina já ter sido descoberta há algumas décadas, o seu papel na reprodução masculina ainda não foi devidamente investigado. Sabendo a importância que a insulina tem para a função reprodutiva masculina, o objetivo deste trabalho foi o de avaliar qual o papel da enzima que a degrada para o potencial reprodutivo masculino. Para isso recorreremos a ratinhos C57BL/6 *knock-out* para o gene que codifica a insulinsina e, entre outros parâmetros, determinou-se a qualidade espermática e estudou-se a morfologia testicular. Os nossos resultados revelam que os ratinhos *knock-out* para o gene que codifica a insulinsina apresentam baixa qualidade espermática que está associada a alterações morfológicas testiculares.

**Palavras-Chave:** Enzima degradadora da insulina, insulinsina, espermatozoides, infertilidade masculina

### ABSTRACT

Insulysin or insulin degrading enzyme is a metalloprotease that cleaves and inactivates insulin and other peptides. Thus, individuals who do not have this enzyme or have a loss of function due to mutation in the gene that codifies it, show hyperinsulinemia. Although insulysin is known for several decades, its role on male fertility remains to be unveiled. Knowing the importance of insulin to male reproductive function, the main goal of this work was to evaluate the role of insulysin on male reproductive potential, namely on sperm parameters. For that, we used *knock-out* C57BL/6 mice for the gene that codifies insulysin and we evaluated sperm quality and testicular morphology, among other parameters. Our results show that *knock-out* mice for insulysin has decreased sperm quality that is associated with modifications in testicular morphology.

**Keywords:** Insulin degrading enzyme, insulysin, spermatozoa, male infertility

<sup>1</sup> Programa Doutoral ProRegeM, NOVA Medical School/Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa

<sup>2</sup> CEDOC – Centro de Estudos de Doenças Crónicas, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Nova de Lisboa

<sup>3</sup> Departamento de Microscopia, Laboratório de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar (ICBAS) e Unidade Multidisciplinar de Investigação Biomédica (UMIB), Universidade do Porto

<sup>4</sup> CICS-UBI – Centro de Investigação em Ciências da Saúde, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior

<sup>5</sup> i3S – Instituto de Investigação e Inovação em Saúde, Universidade do Porto

*Autor para correspondência:* M. Paula Macedo; paula.macedo@nms.unl.pt & Marco G. Alves; alvesmarc@gmail.com

Submetido/Submitted: 30 agosto 2016 | Aceite/Accepted: 12 de outubro 2016

## INTRODUÇÃO

A insulisina, também conhecida como enzima degradadora da insulina, é uma metaloprotease conhecida por clivar e inativar vários péptidos, incluindo a insulina<sup>1</sup>. Esta enzima é expressa em todos os tecidos e, dentro da célula, pode ser encontrada no citosol, em peroxissomas, endossomas e na membrana celular<sup>2</sup>. No entanto, a sua expressão pode ser regulada de diversas formas, nomeadamente através do stress celular, níveis de glucagon e ácidos gordos. Ao clivar e inativar a insulina, a insulisina inibe a sua translocação e acumulação no núcleo da célula<sup>3</sup>. Assim, a insulisina é um interveniente crucial na regulação dos níveis de insulina. Para além disso, mutações com perda de função no gene que codifica a insulisina causam hiperinsulinémia, uma das características da prediabetes<sup>4</sup>. De facto, os inibidores da insulisina têm vindo a ser propostos como possíveis tratamentos para esta desordem metabólica quando já ocorre insulinopénia. É amplamente conhecido que a diabetes *mellitus* tipo 2 tem efeitos sistémicos negativos em que um dos mais evidentes é o sistema reprodutor, onde a insulina tem um papel crucial. A desregulação dos níveis de insulina tem um elevado impacto na fertilidade masculina através da alteração da produção de lactato e acetato pelas células de Sertoli, as células responsáveis pelo suporte físico e nutricional das células germinativas<sup>5,6</sup>. Estes dois metabolitos são fundamentais para o normal decorrer da espermatogénese, uma vez que o primeiro é o substrato energético preferencial das células germinativas e o segundo é crucial para a formação e remodelação membranar,

essencial para a constante divisão das células germinativas. Sendo assim, e apesar do papel da insulina na reprodução masculina ser bastante conhecido, o papel da insulisina permanece completamente desconhecido. Tendo em conta que a insulina medeia processos metabólicos essenciais para espermatogénese, foi colocada a hipótese que o funcionamento da insulisina poderia estar relacionado com a qualidade espermática.

## OBJETIVOS

O principal objetivo deste trabalho foi elucidar qual o papel da insulisina no potencial reprodutivo masculino.

## MATERIAL E MÉTODOS

De maneira a esclarecer a hipótese de trabalho, recorreremos a doze ratinhos C57BL/6 (entre 17 a 34 semanas) que foram divididos em 3 grupos (n=4, cada), sendo estes definidos conforme o genótipo: controlo (WT), heterozigóticos (+/-) e knock-out (KO) para o gene que codifica a insulisina. O testículo esquerdo de cada animal foi retirado para posterior processamento histológico. Os espermatozoides foram recolhidos da cauda do epidídimo e foram avaliados diversos parâmetros espermáticos como anteriormente descrito<sup>7</sup>. Para além disso, através da avaliação microscópica do tecido testicular, foi possível avaliar a sua histologia e verificar o diâmetro dos túbulos seminíferos. Foram ainda determinados os níveis de peroxidação lipídica do tecido testicular através da técnica de slot-blot e foi estudada a expressão de genes relacionados com a biogénese mitocondrial através de reação em cadeia de polimerização em tempo real.

## RESULTADOS E CONCLUSÕES

Os ratinhos do grupo KO tiveram uma diminuição na percentagem de espermatozoides com morfologia normal ( $41,0 \pm 4,0$  %) enquanto os animais do grupo +/- apresentaram um aumento ( $69,0 \pm 5,1$  %), quando comparados com o grupo WT ( $55,5 \pm 3,2$  %) (Gráfico 1).

também as células somáticas, nomeadamente as células de Leydig e as células de Sertoli. Estas últimas são as células somáticas testiculares que se encontram dentro do túbulo seminífero e que fornecem um suporte tanto físico como nutricional às células germinativas, sendo por isso essenciais para o normal decorrer da espermatogénese<sup>5,10,11</sup>. Na avaliação

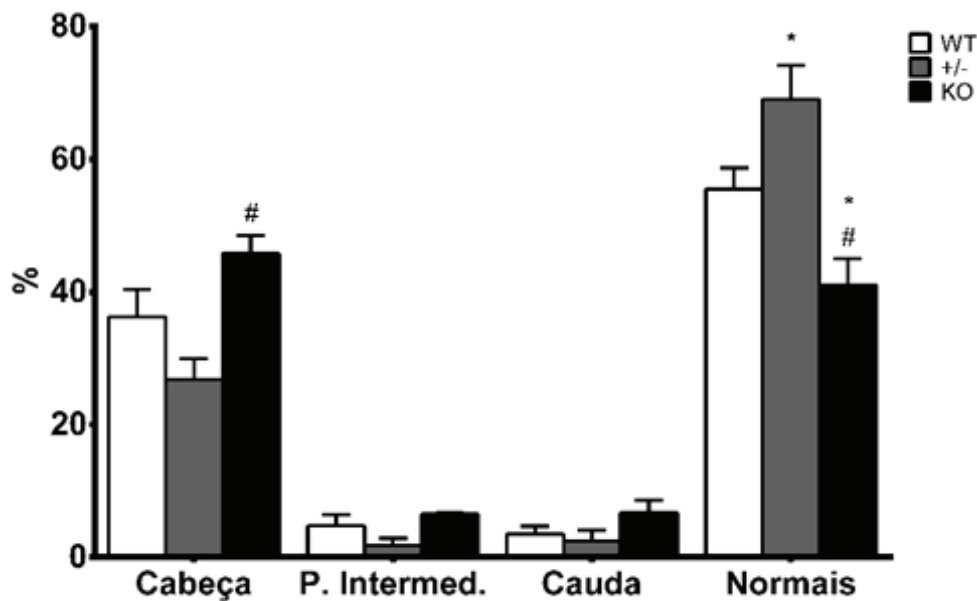
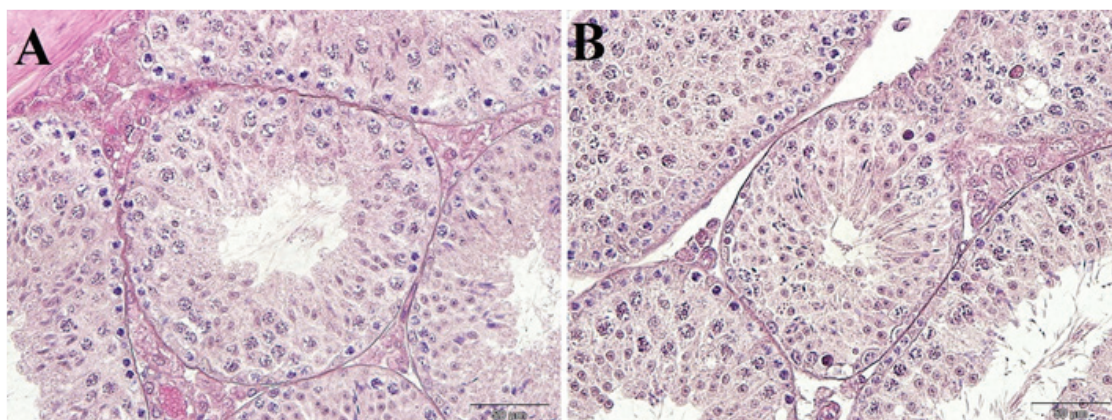


Gráfico 1. Espermatozoides normais ou com defeitos morfológicos.  $P < 0.05$ : \*relativo ao WT; #relativo ao +/-.

Sendo as anomalias morfológicas dos espermatozoides indicadoras de problemas ao nível da produção ou maturação dos mesmos<sup>8</sup>, o que leva a uma diminuição do potencial reprodutivo<sup>9</sup>, avaliamos a histologia do tecido testicular. Através desta, é possível observar a linha germinativa, desde a espermatogónia até ao espermatozoide, mas

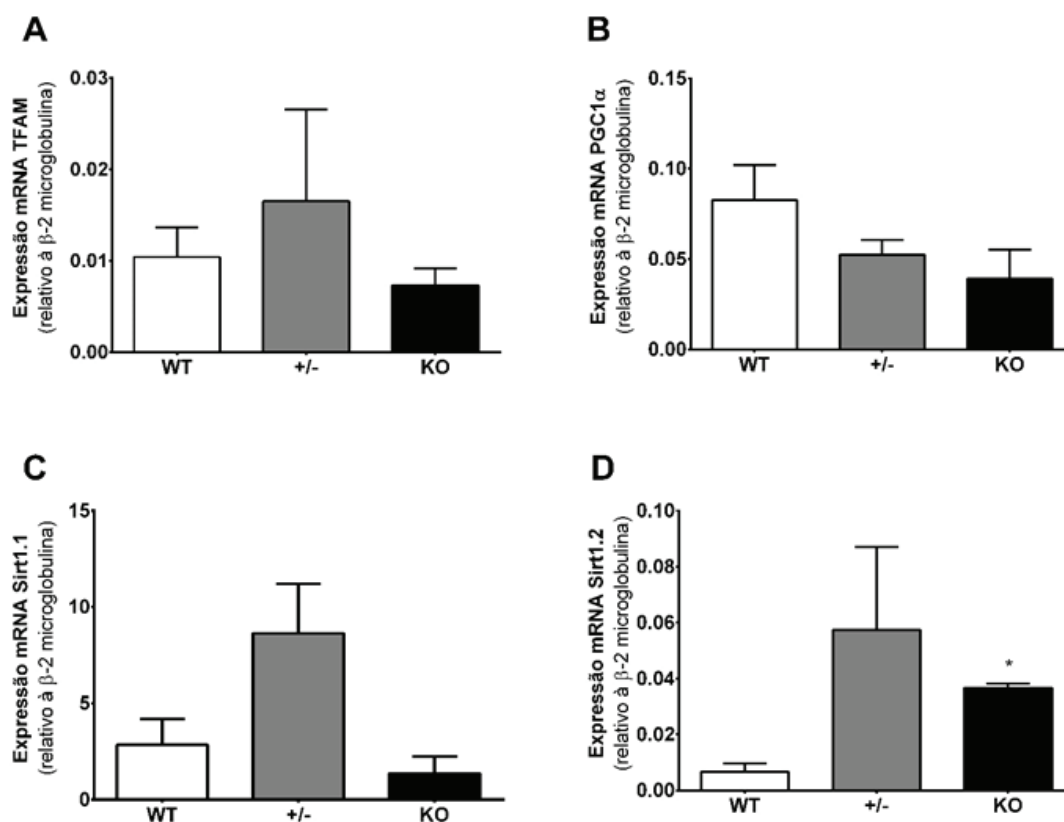
histológica, foi possível observar uma diminuição de aproximadamente 15 % no diâmetro dos túbulos seminíferos no grupo KO comparativamente ao grupo WT (Figura 1), podendo este resultado estar relacionado com aumento de danos celulares no tecido testicular, mais especificamente nas células que se encontram dentro do túbulo seminífero.



**Fig.1** Morfologia dos túbulos seminíferos. Painei A – Controlo; Painei B – Knockout. Escala: 50  $\mu\text{m}$ .

Grande parte dos danos normalmente verificados, tanto no tecido testicular comomorfologiadoseespermatozoides, estão associados a um aumento do stress oxidativo<sup>9</sup>, provocado pelo aumento

das espécies reativas de oxigénio. Sendo que a mitocôndria é a maior fonte de espécies reativas de oxigénio na célula<sup>10,12</sup>, avaliamos alguns parâmetros relacionados com a mesma. De facto,



**Gráfico 2.** Expressão de genes relacionados com a biogénese mitocondrial.  $P < 0.05$ : \* – relativo ao WT.



detetamos um aumento na peroxidação lipídica do tecido testicular nos ratinhos KO, o que indica um aumento dos danos oxidativos. No entanto, ao avaliar a expressão de genes relacionados com a biogénese mitocondrial, o processo que leva a célula a aumentar o número e a massa mitocondrial<sup>13</sup>, não observamos qualquer alteração (Gráfico 2). Estes resultados demonstram que os ratinhos *knock-out* para o gene que codifica a insulinasina apresentam uma qualidade espermática diminuída, associada a alterações morfológicas testiculares, mas aparentemente independente da mitocôndria. No entanto, podemos afirmar que a insulinasina tem um papel importante no potencial reprodutivo masculino apesar de serem precisos mais estudos para perceber que via está a ser afetada por esta enzima.

### AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado por fundos FEDER através do POCI - COMPETE 2020 – Programa Operacional para a Competitividade e Internacionalização no Eixo 1 – Reforçar a investigação, desenvolvimento tecnológico e inovação (Projeto POCI-01-0145-FEDER-007491) e pela “Fundação para a Ciência e a Tecnologia” – FCT a Marco G. Alves (SFRH/BPD/80451/2011 e PTDC/BIM-MET/4712/2014); Maria J. Meneses (PD/BD/114256/2016); Pedro F. Oliveira (PTDC/BBB-BQB/1368/2014 e SFRH/ BPD/108837/2015); CICS (Project UID/Multi/00709/2013); e UMIB (PEst-OE/SAU/UI0215/2014); M Paula Macedo (PTDC/DTP-EPI/0207/2012 e PTDC/BIM-MET/2115/2014).

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Tang WJ. Targeting Insulin-Degrading Enzyme to Treat Type 2 Diabetes Mellitus. *Trends Endocrinol. Metab.* 2016; 27 p. 24-34.
2. Vekrellis K, Ye Z, Qiu WQ, Walsh D, Hartley D, Chesneau V, Rosner MR, Selkoe DJ. Neurons Regulate Extracellular Levels of Amyloid  $\beta$ -Protein via Proteolysis by Insulin-Degrading Enzyme. *J. Neurosci.* 2000; 20 p. 1657-65.
3. Harada S, Smith RM, Smith JA, Jarett L. Inhibition of insulin-degrading enzyme increases translocation of insulin to the nucleus in H35 rat hepatoma cells: evidence of a cytosolic pathway. *Endocrinology* 1993; 132 p. 2293-8.
4. Farris W, Mansourian S, Leissring MA, Eckman EA, Bertram L, Eckman CB, Tanzi RE, Selkoe DJ. Partial Loss-of-Function Mutations in Insulin-Degrading Enzyme that Induce Diabetes also Impair Degradation of Amyloid beta-Protein. *Am. J. Pathol.* 2004; 164 p. 1425-34.
5. Oliveira PF, Alves MG, Rato L, Laurentino S, Silva J, Sa R, Barros A, Sousa M, Carvalho RA, Cavaco JE, Socorro S. Effect of insulin deprivation on metabolism and metabolism-associated gene transcript levels of in vitro cultured human Sertoli cells. *Biochim. Biophys. Acta* 2012; 1820 p. 84-9.
6. Alves MG, Socorro S, Silva J, Barros A, Sousa M, Cavaco JE, Oliveira PF. In vitro cultured human Sertoli cells secrete high amounts of acetate that is stimulated by 17beta-estradiol and suppressed by insulin deprivation. *Biochim. Biophys. Acta* 2012; 1823 p. 1389-94.

7. Dias TR, Alves MG, Casal S, Silva BM, Oliveira PF. The single and synergistic effects of the major tea components caffeine, epigallocatechin-3-gallate and l-theanine on rat sperm viability. *Food & Function* 2016; 7 p. 1301-5.

8. Hirsh A. Male subfertility. *BMJ: British Medical Journal* 2003; 327 p. 669-72.

9. Agarwal A, Tvrda E, Sharma R. Relationship amongst teratozoospermia, seminal oxidative stress and male infertility. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2014; 12 p. 1-8.

10. Meneses MJ, Bernardino RL, Sá R, Silva J, Barros A, Sousa M, Silva BM, Oliveira PF, Alves MG. Pioglitazone

increases the glycolytic efficiency of human Sertoli cells with possible implications for spermatogenesis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2016; 79 p. 52-60.

11. Rato L, Meneses MJ, Silva BM, Sousa M, Alves MG, Oliveira PF. New insights on hormones and factors that modulate Sertoli cell metabolism. *Histol. Histopathol.* 2016; 31 p. 499-513.

12. Aitken RJ, Roman SD. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2008; 1 p. 15-24.

13. Valero T. Mitochondrial biogenesis: pharmacological approaches. *Curr. Pharm. Des.* 2014; 20 p. 5507-9.