

## Disfunção da grelina pode alterar o potencial reprodutivo masculino por perturbar o suporte nutricional da espermatogénese

*Ghrelin dysfunction may alter the reproductive potential of males by disrupting the nutritional support of spermatogenesis*

Martins, A.D.<sup>1,2</sup>, Sá, R.<sup>1,2</sup>, Monteiro, M.P.<sup>2,3</sup>, Barros, A.<sup>4,5,6</sup>, Sousa, M.<sup>1,2,4</sup>, Carvalho, R.A.<sup>7</sup>, Silva, B.M.<sup>8</sup>, Oliveira, P.F.<sup>1,2,6</sup>, Alves, M.G.<sup>7,8</sup>

ARTIGO ORIGINAL | ORIGINAL ARTICLE

### RESUMO

A incidência de doenças metabólicas tem vindo a aumentar e estudos recentes têm relacionado este aumento com uma diminuição da taxa de natalidade. A homeostasia energética do organismo e a sua regulação hormonal é essencial para uma espermatogénese bem-sucedida. A grelina é um péptido responsável pela libertação da hormona do crescimento e é ainda o ligando endógeno para o recetor da hormona do crescimento (GHS-R). Tem vindo a ser demonstrado que esta hormona pode controlar o sucesso da espermatogénese, mas os mecanismos permanecem desconhecidos. Assim, propomos estudar o efeito da grelina no suporte nutricional da espermatogénese, que é mantido pelas células de Sertoli. Para testar esta hipótese, expusemos células de Sertoli humanas a concentrações de 20, 100 e 500 pM de grelina, que simulam as concentrações encontradas em indivíduos obesos, com peso normal e severamente subnutridos, respetivamente. Os resultados demonstraram que a grelina interfere com o perfil metabólico das células de Sertoli, destacando a importância de uma dieta equilibrada para manter o potencial reprodutivo masculino.

**Palavras-Chave:** Grelina, células de Sertoli, espermatogénese, obesidade

### ABSTRACT

The incidence of metabolic diseases has been increasing and recent studies have linked this increase with a decrease in the birth rate. It is known that body energy homeostasis and regulation is crucial to maintain a successful spermatogenesis.

Ghrelin is a growth hormone-releasing peptide and the endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor (GHS-R). It has been hypothesized this hormone may control the success of spermatogenesis but the mechanisms remain unknown. Herein, we proposed to study the effect of ghrelin in the nutritional support of spermatogenesis, which is accomplished by the somatic Sertoli cells. To explore this hypothesis, we exposed human Sertoli cells to concentrations of 20, 100 and 500 pM of ghrelin, which mimic the concentrations found in obese, normal weight and severely undernourished men, respectively. We demonstrate that ghrelin modulates the metabolic profile of human Sertoli cells with possible implications for the nutritional support of developing germ cells, highlighting the importance of a balanced diet to maintain the reproductive potential of males.

**Keywords:** Ghrelin, Sertoli cells, spermatogenesis, obesity

<sup>1</sup> Departamento de Microscopia, Laboratório de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar (ICBAS), Universidade do Porto, Portugal

<sup>2</sup> Unidade Multidisciplinar em Investigação Biomédica, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar (ICBAS), Universidade do Porto, Portugal

<sup>3</sup> Departamento de Anatomia, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar (ICBAS), Universidade do Porto, Portugal

<sup>4</sup> Centro de Genética da Reprodução Professor Alberto Barros, Porto, Portugal

<sup>5</sup> Departamento de Genética, Faculdade de Medicina, Universidade do Porto, Porto, Portugal

<sup>6</sup> i3S - Instituto de Investigação e Inovação em Saúde, Universidade do Porto, Porto, Portugal

<sup>7</sup> Departamento de Ciências da Vida e Tecnologia, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal

<sup>8</sup> Centro de Investigação em Ciências da Saúde (CICS), Universidade da Beira Interior, Covilhã, Portugal

*Autor para correspondência:* Marco G. Alves; alvesmarc@gmail.com

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

## INTRODUÇÃO

O bom funcionamento da função reprodutora masculina depende da homeostasia energética do organismo. Na verdade, existe uma associação em forma de U invertido entre o índice de massa corporal e a fertilidade masculina, no qual os homens tanto obesos, como de baixo peso são menos propensos a ter filhos do que os indivíduos com peso normal<sup>1</sup>. A degradação de qualidade na dieta é responsável pelo aumento da incidência da obesidade e de doenças metabólicas em idades cada vez mais jovens, o que pode levar a um aumento da subfertilidade/infertilidade e/ou à degradação da saúde reprodutiva dos homens<sup>2</sup>.

A grelina controla o metabolismo energético do organismo refletindo o seu estado energético<sup>3,4</sup>. Os níveis de grelina e o balanço energético do organismo são inversamente proporcionais<sup>5,6</sup>. Alguns efeitos da grelina em células testiculares já foram descritos<sup>7,8</sup>, no entanto o seu efeito nas células de Sertoli ainda permanece desconhecido. Até agora, a presença do GHS-R em células de Sertoli de rato e humanas foi apenas descrita por imunohistoquímica<sup>9, 10</sup> e aguarda confirmação por técnicas de biologia molecular. As células de Sertoli são responsáveis pelo suporte físico e nutricional das células germinativas<sup>11</sup>, e pelo equilíbrio iônico do fluido tubular<sup>12,13</sup>. A glucose, o metabolito preferencial das células de Sertoli, é importada para a célula por transportadores de membrana de glucose<sup>13</sup>. Em condições normais, no final da glicólise o piruvato obtido é convertido em lactato<sup>13</sup>, e utilizado pelas células germinativas para produção de

energia e regulação da sua atividade metabólica<sup>14</sup>.

O processo de espermatogênese é altamente complexo e sensível à regulação hormonal<sup>15,16</sup> e para que este processo seja bem-sucedido é necessário que haja uma grande cooperação metabólica entre as células de Sertoli e as germinativas. Embora os mecanismos moleculares pelos quais a grelina controla a espermatogênese permaneçam desconhecidos, o papel desta hormona na reprodução masculina tem vindo a ser descrito como importante.

## OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito da grelina na espermatogênese através da sua ação direta no metabolismo da glucose em culturas de células de Sertoli humanas.

## MATERIAL E MÉTODOS

Para alcançar o objetivo proposto, foram realizadas, a partir de seis biopsias testiculares de indivíduos com espermatogênese conservada, culturas primárias de células de Sertoli humanas. Para avaliar o efeito da grelina, expusemos as culturas celulares a concentrações de 20 pM, 100 pM e 500 pM desta hormona, simulando as concentrações encontradas em indivíduos obesos<sup>5</sup>, com peso normal<sup>6</sup> e severamente subnutridos<sup>17</sup>, respetivamente. Foi ainda efetuado um grupo controlo no qual as células não foram expostas a grelina. A expressão do RNA mensageiro (mRNA) do gene do GHS-R foi determinada através de reação em cadeia de polimerização quantitativa em tempo real. O perfil glicolítico das células de Sertoli humanas foi avaliado

analisando a produção/ consumo de metabolitos.

## RESULTADOS E CONCLUSÕES

Confirmamos a expressão do mRNA do gene do GHS-R em células de Sertoli humanas e verificamos que a mesma aumentou em células expostas a 100 pM de grelina relativamente a células não expostas a grelina ( $14,7 \pm 4,1$  e  $0,4 \pm 0,2$  relativo à  $\beta$ -2 microglobulina, respetivamente) (Tabela 1).

expostas à hormona ( $16,3 \pm 1,9$  pmol/célula), e aumentou nas células de Sertoli humanas expostas a 500 pM de grelina ( $16,6 \pm 1,7$  pmol/célula) quando comparadas com células expostas a 100 pM de grelina ( $13,0 \pm 1,6$  pmol/célula) (Tabela 2).

A produção de lactato pelas células de Sertoli é extremamente importante, pois este metabolito é considerado o substrato preferencial das células germinativas<sup>14</sup>. O lactato produzido

**Tabela 1.** Expressão do gene do GHS-R em culturas de células de Sertoli humanas após exposição à grelina

Expressão mRNA GHS-R (Relativo à $\beta$ -2 microglobulina)	
Controlo	$0,4 \pm 0,2$
20 pM	$4,2 \pm 2,1$
100 pM	$14,7 \pm 4,1^*$
500 pM	$5,2 \pm 3,5$

Os resultados são apresentados como média  $\pm$  SEM (n=6 para cada condição). Resultados significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ) são indicados como: \* relativo ao controlo

Sabemos que pela necessidade de suportar nutricionalmente as células germinativas, o fluxo glicolítico nas células de Sertoli é elevado<sup>18</sup>. A glucose é importada para a célula de Sertoli por transportadores de glucose e no final da glicólise é obtido piruvato. O consumo de glucose pelas células de Sertoli humanas diminuiu em células expostas a 100 pM de grelina ( $13,0 \pm 1,6$  pmol/célula) quando comparado com culturas celulares que não foram

pelas células de Sertoli é obtido no final da glicólise, proveniente do piruvato, numa reação catalisada pela enzima lactato desidrogenase. Nas culturas de células de Sertoli humanas verificamos que a produção de lactato diminuiu em células expostas a 500 pM de grelina ( $7,9 \pm 2,7$  pmol/célula) quando comparadas com a condição controlo ( $12,3 \pm 2,4$  pmol/célula) e com células expostas a 20 pM de grelina ( $12,3 \pm 2,4$  pmol/célula) (Tabela 2). Estes resultados indicam-

-nos uma relação inversa entre os níveis de grelina e a produção de lactato.

significativa quando comparada com células de Sertoli humanas tratadas com

**Tabela 2.** Consumo e produção de metabolitos em culturas de células de Sertoli humanas após exposição à grelina

Metabolito Consumido (pmol/célula)		Metabolitos Produzidos (pmol/célula)	
	Glucose	Lactato	Alanina
<b>Controlo</b>	16,3 ± 1,9	12,3 ± 2,4	1,2 ± 0,2
<b>20 pM</b>	15,9 ± 3,6	12,3 ± 2,4	0,7 ± 0,1*
<b>100 pM</b>	13,0 ± 1,6*	10,5 ± 2,3	0,7 ± 0,2*
<b>500 pM</b>	16,6 ± 1,7§	7,9 ± 2,7*#	0,4 ± 0,1*#§

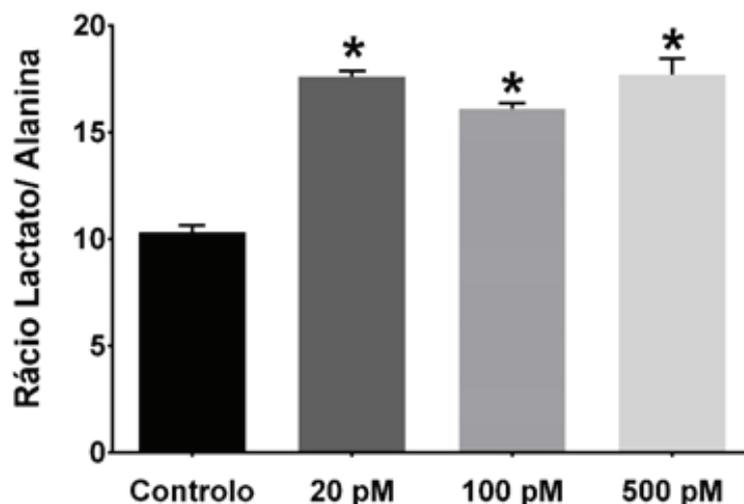
Os resultados são expressos como média ± SEM (n=6 para cada condição). Os resultados significativamente diferentes (P<0.05) são indicados como: \* relativo ao controlo; # relativo a 20 pM e § relativo a 100 pM.

Nas células de Sertoli e, uma vez que, a utilização de alanina pelas proteínas é inibida pela glutamina<sup>19</sup>, esta pode ser convertida em piruvato, e posteriormente transformado em lactato, de forma a assegurar o suporte nutricional das células germinativas.

No nosso trabalho, as células de Sertoli humanas expostas a qualquer concentração de grelina utilizada apresentaram uma diminuição na produção de alanina (0,7 ± 0,1; 0,7 ± 0,2 e 0,4 ± 0,1 pmol/célula para concentrações de 20, 100 e 500 pM de grelina, respetivamente) quando comparada com células não expostas a esta hormona (1,2 ± 0,2 pmol/célula). E ainda, para concentrações de 500 pM de grelina (0,4 ± 0,1 pmol/célula) verificamos que esta diminuição é

20 e 100 pM de grelina (0,7 ± 0,1; 0,7 ± 0,2 pmol/célula, respetivamente) (Tabela 2).

O rácio lactato/alanina é um excelente indicador do estado redox da célula, pois a conversão do piruvato em lactato e alanina é emparelhada com reações NADH/NAD<sup>+</sup> <sup>20</sup>, assim o rácio lactato/alanina reflete o equilíbrio NADH/NAD<sup>+</sup>. Quando analisamos este rácio verificamos que a exposição a qualquer uma das concentrações de grelina usadas aumentou o rácio lactato/alanina (17,6 ± 0,7; 16,1 ± 0,6 e 17,7 ± 1,9 para concentrações de 20, 100 e 500 pM de grelina, respetivamente) quando comparado com células não expostas a grelina (10,3 ± 0,7) (Gráfico 1), colocando as células sob grande stress oxidativo.



**Gráfico 1.** Rácio lactato/alanina em células de Sertoli humanas após exposição à grelina.

Os resultados são expressos como média  $\pm$  SEM (n=6 para cada condição). Resultados significativamente diferentes (P<0.05) são indicados como: \* relativo ao controlo.

Verificamos também que o metabolismo das células de Sertoli em indivíduos gravemente subnutridos (500 pM de grelina) é o mais alterado, podendo assim comprometer a espermatogénese. Apesar deste estudo indicar a grelina com essencial no controlo do metabolismo de células de Sertoli humanas, mais estudos serão necessários para esclarecer o efeito desta hormona no potencial reprodutivo masculino.

#### 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 M.G. Alves (SFRH/BPD/80451/2011

e PTDC/BIM-MET/4712/2014); P.F. Oliveira (PTDC/BBB-BQB/1368/2014 e SFRH/ BPD/108837/2015); AD Martins (SFRH/BD/108726/2015); CICS (Project UID/Multi/00709/2013); e UMIB (PEst-OE/SAU/UI0215/2014).

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Jokela M, Elovainio M, Kivimaki M. Lower fertility associated with obesity and underweight: the US National Longitudinal Survey of Youth. *Am. J. Clin. Nutr.* 2008; 88 p. 886-93.
2. Rato L, Alves MG, Cavaco JE, Oliveira PF. High-energy diets: a threat for male fertility? *Obes. Rev.* 2014; 15 p. 996-1007.
3. Broglio F, Arvat E, Benso A, Gottero C, Muccioli G, Papotti M, van der Lely AJ, Deghenghi R, Ghigo E. Ghrelin, a natural GH secretagogue produced by the stomach, induces hyperglycemia and

reduces insulin secretion in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2001; 86 p. 5083-6.

4. Broglio F, Gottero C, Prodam F, Gauna C, Muccioli G, Papotti M, Abribat T, Van Der Lely AJ, Ghigo E. Non-acylated ghrelin counteracts the metabolic but not the neuroendocrine response to acylated ghrelin in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2004; 89 p. 3062-5.

5. Rosicka M, Krsek M, Matoulek M, Jarkovska Z, Marek J, Justova V, Lacinova Z. Serum ghrelin levels in obese patients: the relationship to serum leptin levels and soluble leptin receptors levels. *Physiol. Res.* 2003; 52 p. 61-6.

6. Shiiya T, Nakazato M, Mizuta M, Date Y, Mondal MS, Tanaka M, Nozoe S, Hosoda H, Kangawa K, Matsukura S. Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002; 87 p. 240-4.

7. Barreiro ML, Gaytan F, Castellano JM, Suominen JS, Roa J, Gaytan M, Aguilar E, Dieguez C, Toppari J, Tena-Sempere M. Ghrelin inhibits the proliferative activity of immature Leydig cells in vivo and regulates stem cell factor messenger ribonucleic acid expression in rat testis. *Endocrinology* 2004; 145 p. 4825-34.

8. Kheradmand A, Dezfoulian O, Alirezaei M, Rasoulian B. Ghrelin modulates testicular germ cells apoptosis and proliferation in adult normal rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012; 419 p. 299-304.

9. Barreiro ML, Tena-Sempere M. Ghrelin and reproduction: a novel signal linking energy status and fertility? *Mol. Cell. Endocrinol.* 2004; 226 p. 1-9.

10. Gaytan F, Barreiro ML, Caminos

JE, Chopin LK, Herington AC, Morales C, Pinilla L, Paniagua R, Nistal M, Casanueva FF, Aguilar E, Dieguez C, Tena-Sempere M. Expression of ghrelin and its functional receptor, the type 1a growth hormone secretagogue receptor, in normal human testis and testicular tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2004; 89 p. 400-9.

11. Rato L, Alves MG, Socorro S, Duarte AI, Cavaco JE, Oliveira PF. Metabolic regulation is important for spermatogenesis. *Nat. Rev. Urol.* 2012; 9 p. 330-8.

12. Oliveira PF, Sousa M, Barros A, Moura T, Rebelo da Costa A. Membrane transporters and cytoplasmatic pH regulation on bovine Sertoli cells. *J. Membr. Biol.* 2009; 227 p. 49-55.

13. Rato L, Socorro S, Cavaco JE, Oliveira PF. Tubular fluid secretion in the seminiferous epithelium: ion transporters and aquaporins in Sertoli cells. *J. Membr. Biol.* 2010; 236 p. 215-24.

14. Jutte NH, Jansen R, Grootegoed JA, Rommerts FF, Clausen OP, van der Molen HJ. Regulation of survival of rat pachytene spermatocytes by lactate supply from Sertoli cells. *J. Reprod. Fertil.* 1982; 65 p. 431-8.

15. Alves MG, Rato L, Carvalho RA, Moreira PI, Socorro S, Oliveira PF. Hormonal control of Sertoli cell metabolism regulates spermatogenesis. *Cell. Mol. Life Sci.* 2013; 70 p. 777-93.

16. 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.

17. Otto B, Cuntz U, Fruehauf E, Wawarta R, Folwaczny C, Riepl RL, Heiman ML, Lehnert P, Fichter M, Tschop M. Weight gain decreases elevated plasma ghrelin concentrations of patients with anorexia nervosa. *Eur. J. Endocrinol.* 2001; 145 p. 669-73.

18. Oliveira PF, Martins AD, Moreira AC, Cheng CY, Alves MG. The Warburg effect revisited-lesson from the Sertoli

cell. *Med. Res. Rev.* 2015; 35 p. 126-51.

19. Kaiser GR, Monteiro SC, Gelain DP, Souza LF, Perry ML, Bernard EA. Metabolism of amino acids by cultured rat Sertoli cells. *Metabolism* 2005; 54 p. 515-21.

20. Alves MG, Oliveira PF, Martins FO, Oliveira PJ, Carvalho RA. Gender-dependent metabolic remodeling during heart preservation in cardioplegic celsior and histidine buffer solution. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2012; 60 p. 227-33.