

2010 Octubre, 2(1): 1-2

GLICEROL-3-FOSFATO ACILTRANSFERASA 2: SU RELACIÓN CON LA ESPERMATOGÉNESIS Y LA PROLIFERACIÓN CELULAR

M. Pellon-Maison, E.R. Cattaneo, R.A. Coleman and M. R. Gonzalez-Baró.

Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP)- Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular
e-mail de contacto: magalipellon@yahoo.com.ar

Introducción

La enzima glicerol-3-fosfato aciltransferasa (GPAT) cataliza el primer paso y limitante en la síntesis de novo de glicerolípidos celulares. En mamíferos han sido descritas al menos cuatro isoformas con diferentes localizaciones celulares y parámetros cinéticos. La isoforma mitocondrial 1 (GPAT1) ha sido extensamente estudiada y se ha demostrado que participa en la síntesis de triacilglicéridos (TAG) en hígado de rata. La isoforma mitocondrial 2 (GPAT2) presenta homología de secuencia con GPAT1, pero se expresa preferencialmente en testículo de rata y no tiene preferencia por los ácidos grasos saturados, por lo cual hipotetizamos que estaría involucrada en la síntesis de TAG ricos en ácidos grasos insaturados, moléculas que actúan como reservorios de estos ácidos grasos necesarios para la espermatogénesis.

Objetivos

Nuestro objetivo es determinar si la función de GPAT2 está asociada a la síntesis celular de TAG, y si su expresión se correlaciona con el inicio de la espermatogénesis.

Materiales y métodos

Utilizamos testículos provenientes de ratas Wistar de diferentes edades. Los distintos tipos celulares que componen el testículo fueron aislados y parcialmente purificados por digestión enzimática y centrifugación. El ARN total fue extraído utilizando Trizol (Invitrogen). El ARNm correspondiente a *gpat2* fue cuantificado por Northern blot y por real-time-quantitative-PCR. Los TAG fueron separados por cromatografía en capa fina y cuantificados por densitometría luego de ser carbonizados, utilizando un programa de análisis de imágenes (Image-Quant). Los ácidos grasos fueron derivatizados como ésteres metílicos y analizados por cromatografía gas-líquido capilar. El marco abierto de lectura que codifica para GPAT2 de ratón conteniendo la secuencia codificante para un epítopo FLAG en su extremo 3' fue subclonado en un vector de expresión eucariota (pcDNA3.1, Invitrogen), y transfectado en células CHO-K1 (ATCC) mediante liposomas catiónicos (Lipofectamine, Invitrogen). La expresión fue monitoreada mediante Western blot utilizando el anticuerpo monoclonal anti-Flag M2 (Sigma). Se utilizaron células transfectadas con el vector vacío como control. La cuantificación de las gotas de lípidos (lipid droplets) se realizó mediante tinción con oil-red-O y análisis de las imágenes obtenidas. La proliferación celular se midió por el método de asimilación de cristal violeta.

Resultados

Los ensayos de Northern Blot mostraron que el ARNm de *gpat2* se expresa principalmente en células de la línea germinal. Por RT-qPCR observamos que la expresión de GPAT2 alcanza un máximo a los 30 días de edad, momento en el que se inicia la espermatogénesis. A los 40 y 60 días, la expresión de GPAT2 decae y se estabiliza. El contenido de TAG en testículo correlaciona con la expresión de GPAT2, aumentando de los 19 a los 30 días, donde se observa su máximo contenido y luego decae a los 40 y 60 días. La expresión heteróloga del cDNA de GPAT2 en células CHO-K1 provocó un aumento en la síntesis y acumulación de TAG, ya que las gotas de lípido intracelulares duplicaron su tamaño sin variar su número con respecto a las células control. También las células transfectadas incrementaron su tasa de proliferación comparada con las células control; el método de tinción con cristal violeta mostró que después de 65 horas el número de células fue 30% mayor cuando se sobreexpresó. La sobre-expresión de GPAT1 no incrementó la proliferación celular, sugiriendo que estos efectos son específicos de GPAT2.

2010 Octubre, 2(1): 1-2

Conclusiones

Nuestros resultados indican que la isoforma GPAT2 está involucrada en la síntesis de TAG en las células espermáticas, y que algún/os metabolito/s derivado/s de su actividad estaría/n relacionado/s con la regulación de los procesos de proliferación de las células germinales.