

SELECCIONES

Club de revistas

1. Interrupción dirigida del gen *mZP3* resulta en la producción de óvulos sin zona pelúcida e infertilidad en ratonas.

Liu CH, Litscher E, Mortillo S Sakai Y, Kinloch RA, Stewart RA, Wassarman PM

Proc Nat Acad Sci USA 1996; 93: 5341-5346.

La zona pelúcida es la matriz extracelular que rodea el oocito, su principal función está en el momento de la fertilización actuando como una barrera en dos vías: la primera, protege el oocito de la entrada de más de un espermatozoide; y la segunda posee los receptores que le dan especificidad a la unión de los espermatozoides y óvulos. Esta es producida durante la fase de crecimiento del oocito, en el ratón posee aproximadamente 7 μ m de diámetro, consiste en un enmallado de proteínas denominadas ZP_1 , ZP_2 , ZP_3 ; ZP_2 , ZP_3 forman largos filamentos al rededor del oocito y ZP_1 interconecta las otras dos proteínas mediante uniones no covalentes.

Durante la fertilización el espermatozoide con el acrosoma intacto, interactúa con la ZP_3 , este se une a los radicales oligosacáridos unidos a oxígenos existentes en los aminoácidos serina y treonina de la molécula en el último tercio del extremo carboxiterminal de la ZP_3 , una vez ligado el espermatozoide realiza su reacción acrosómica, realiza exocitosis y es capaz de fertilizar el oocito. En el humano y ratón se conocen los genes de la *ZP* y algunos de ellos están clonados y se conocen algunos de los elementos reguladores de los mismos. El objetivo del presente artículo es evaluar el efecto sobre los oocitos, los folículos y sobre la reproducción, que pueda tener la interrupción dirigida del gen de la *mZP3*, utilizando para ello la recombinación homóloga en células pluripotenciales embrionarias.

Para este experimento se utilizaron métodos de recombinación dirigida convencionales (gen targeting). Se contruyó un vector derivado del gen de la ZP_3 murina, extraído de la cepa 129/Sv, en el vector utilizado para la mutación del gen se le reemplazó un fragmento del exón 2, exón 3 y todo el intrón 3 y fue reemplazado por un vector de expresión PGKneobpa. Además

para la evitar la selección de clones donde el gen se hubiera podido integrar al azar se adicionó en el extremo 3' un cassette de selección pMC1-SHV-TK. Las células pluripotenciales embrionarias fueron infectadas con este vector y los clones seleccionados positivos fueron utilizados para la producción de ratones heterocigotos mediante la inyección de las células en la cavidad de blastocistos de ratón de la misma cepa. Para evaluar el estado genético del fenotipo de los individuos obtenidos se utilizaron las técnicas de Southernblot, Northernblot y Westernblot. Los ratones quiméricos fueron apareados con el fin de obtener animales homocigotos para la mutación. Los animales fueron inducidos a superovular y apareados a diferentes edades, con el fin de evaluar el efecto sobre los oocitos, folículos y obtener descendencia.

Análisis de las hembras $Zp_e(-/-)$

Se demuestra la producción de animales mutantes $Zp_e(-/-)$ por la metodología propuesta; se demuestra además que las ratonas homocigotas (+/+), y heterocigotas (+/-) producen mRNA para el gen de la ZP_3 y la proteína, mientras que las ratonas homocigotas (-/-) mutadas no.

Los ovarios de las hembras jóvenes (3 a 21 días) $-/-$ son un tercio o la mitad de los ovarios de las hembras normales; al intentar obtener oocitos de estas ratonas, se observó que el tamaño de los oocitos de las hembras mutadas es igual que las normales, con la diferencia que las mutadas no tienen zona pelúcida.

Observación de los oocitos obtenidos por superovulación. En el texto los autores muestran como la ausencia de la zona pelúcida en los animales mutantes $(-/-)$.

El análisis de los individuos adultos (4 a 6 semanas) mostró que ovarios y oocitos de individuos mutados $(-/-)$ son iguales que

homocigotas (+/+), y heterocigotas (+/-). Al intentar superovulación se observó que las ratonas mutantes (-/-) los producen en promedio 2 óvulos mientras que homocigotas (+/+), y heterocigotas (+/-) producen en promedio 20. Los estudios de microscopía electrónica y de luz muestran que los folículos de todos los genotipos estudiados se desarrollan en forma similar; en el caso de mutantes (-/-) el contacto de las células de granulosa es mas laxo que los silvestres y heterocigotos, haciendo que el contacto entre el folículo y el oocito sea menor. Los autores muestran las diferencias en la cantidad y adherencia de las células de la granulosa en los folículos de hembras mutantes -/- comparado con las normales, demostrando en las diferentes edades de los animales variaciones importantes en la formación del folículo.

Las hembras mutantes (-/-) fueron apareadas con machos fértiles y a pesar de tener un comportamiento copulatorio normal evidenciado por la presencia de tapón vaginal, no se logró obtener ni gestación, ni descendencia viable. Una de las explicaciones es que dado que los oocitos provenientes de hembras mutantes (-/-) no tienen zona pelúcida se adhieran a las paredes del oviducto o que su captación sea defectuosa de forma que no haya contacto con los espermatozoides. Hubiera sido muy interesante que se hubiera evaluado el potencial de fertilización *in vitro* de estos oocitos, bien sea a nivel de fertilización normal o de inyección intracitoplasmática de espermatozoides. Los resultados podrían mostrar el efecto de la ausencia de zona pelúcida en el desarrollo de embriones, del que se espera no afecte el desarrollo normal de los individuos. La duda aparece al pen-

sar en como puede ser la regulación génica en el desarrollo de los oocitos.

Se demuestra que los embriones que poseen una mutación en el gen de la ZP₃ no producen ZP, aunque se puedan obtener oocitos capaces de desarrollarse totalmente y se pueda completar el desarrollo folicular. El haber demostrado la existencia de RNA mensajero de ZP₂ y ZP₁ sugiere la necesidad de interacción coordinada de las tres proteínas para la formación de la matriz. No se puede explicar la razón por la cual el contacto de las células es mas laxo, pero se puede sugerir que como resultado haya un menor contacto entre el oocito y el folículo, en algunas ocasiones los oocitos de ratonas mutantes -/- no están totalmente rodeados de células del cúmulo.

En resumen los autores reportan que han creado ratones homocigotos para una mutación nula en el gen de mZP₃ por mutagénesis dirigida. Las ratonas homocigotas mutantes, pueden producir oocitos desarrollados, óvulos sin fertilizar pero sin ZP, pero que a pesar de ovular y tener un comportamiento copulatorio normal, son infértiles. Estos ratones son muy importantes para el estudio de la estructura y función de la ZP, así como las interacciones entre las células foliculares y el oocito.

Colaboración de: Jesús Alfredo Berdugo
Gutiérrez, DMV, MSc Profesor U de A.
Programa de Biotecnología Animal.
BIOGENESIS. AA 1226 Medellín - Colombia