

## Aspectos técnicos da clonagem

### Introdução

Todos sabemos que a investigação científica é fonte de todo o progresso tecnológico. Nos nossos dias, nenhuma área de actividade e das nossas percepções de vida quotidiana pode ser considerada completamente isolada da influência da ciência.

A investigação é o motor do progresso e bastarão poucos exemplos para nos lembrar a sua importância. Por engenharia genética tem sido possível a produção industrial, em microrganismos, de substâncias de elevado interesse clínico. Tem sido possível a produção de plantas transgénicas com maior valor nutritivo, a criação de animais transgénicos importantes como dadores de xenotransplantações, como modelo de estudo de doenças humanas e como fábricas de substâncias de grande interesse clínico. Tem possibilitado a transplantação de órgãos e tecidos, tem dado a muitos casais inférteis a alegria de poderem transmitir vida. A terapia génica permitirá algumas soluções para o cancro e possivelmente para a SIDA, além de vencer uma certa variedade de doenças hereditárias. A análise do genoma humano poderá dar-nos possibilidade de conhecer, prever e mesmo modificar a vida humana. Os avanços da técnica no âmbito da biologia molecular, genética e fecundação artificial, tornaram possíveis a experimentação e a realização de clonagem no campo vegetal e animal. Estas técnicas disponíveis para remediar a infertilidade, incluindo a clonagem, devem ser reflectidas de um modo consciente e responsável, correndo os riscos medidos com efectiva ponderação.

Não basta pensar apenas em termos de eficácia: devemos discernir e decidir em responsabilidade ética na manipulação dos genes humanos e

respectivas consequências que devem respeitar a biodiversidade e complementaridade. Os potenciais benefícios desta técnica com aplicação à reprodução de mamíferos *versus* os possíveis riscos de mutações do produto clonado e as implicações do *imprinting* genético, são as bases de todas as inquietações e de todas as discussões.

### Desenvolvimento pré-implantatário do embrião

Conseguimos perceber, graças aos trabalhos mendelianos, os mecanismos da hereditariedade, que funcionam numa lógica de lotaria e probabilidade, onde os progenitores apenas dão contributo para uma nova criação.

De facto, a ciência, através de observações muito precisas que permitem confirmar ou rejeitar hipóteses e de uma rigorosa lógica científica substancialmente indutiva, pode estabelecer o momento concreto em que um determinado ser humano começa o seu próprio ciclo vital.

Considerando a realidade biológica em causa, descrevo sumariamente as principais fases do processo de fecundação e gestação (zigoto, embrião, feto).

A formação de um indivíduo supõe a fusão de duas células - o ovócito e o espermatozóide - designadas por gâmetas que, por apenas contem um dos cromossomas homólogos de cada par, são denominadas de haplóides (N).

A fecundação é o processo pelo qual o ovócito maduro é penetrado por um espermatozóide funcional (fig. 1 a-b), resultando na formação de dois pró-núcleos. Cada um dos gâmetas possui 23 cromossomas que, quando fundidas as células, constituirão os 23 pares próprios da espécie humana, agora em células diplóides (2N), portadoras da informação de ambos os pais. Quando os pró-núcleos masculino e feminino atingem o tamanho máximo e quando cada um já replicou o seu conteúdo haplóide (para que cada cromossoma tenha um par de cromatídeos), aproximam-se um do outro para emparelharem os seus cromossomas (singamia). Na espécie humana, só raramente os pronúcleos se fundem, sendo o mais frequente a sua aproximação, seguida de perda dos invólucros nucleares a entrada imediata em metafase mitótica clássica. O processo de fecundação pode levar cerca de 12 a 24 horas a completar-se.

Quer *in vivo* quer *in vitro*, sabemos hoje que todas as células, no seu ciclo celular, duplicam o seu DNA antes da divisão mitótica. A fase de sín-

tese de DNA (fase S) e a mitose (M), ambas distintas, permitem estabelecer um primeiro intervalo entre o fim da mitose e o início da fase de sín-

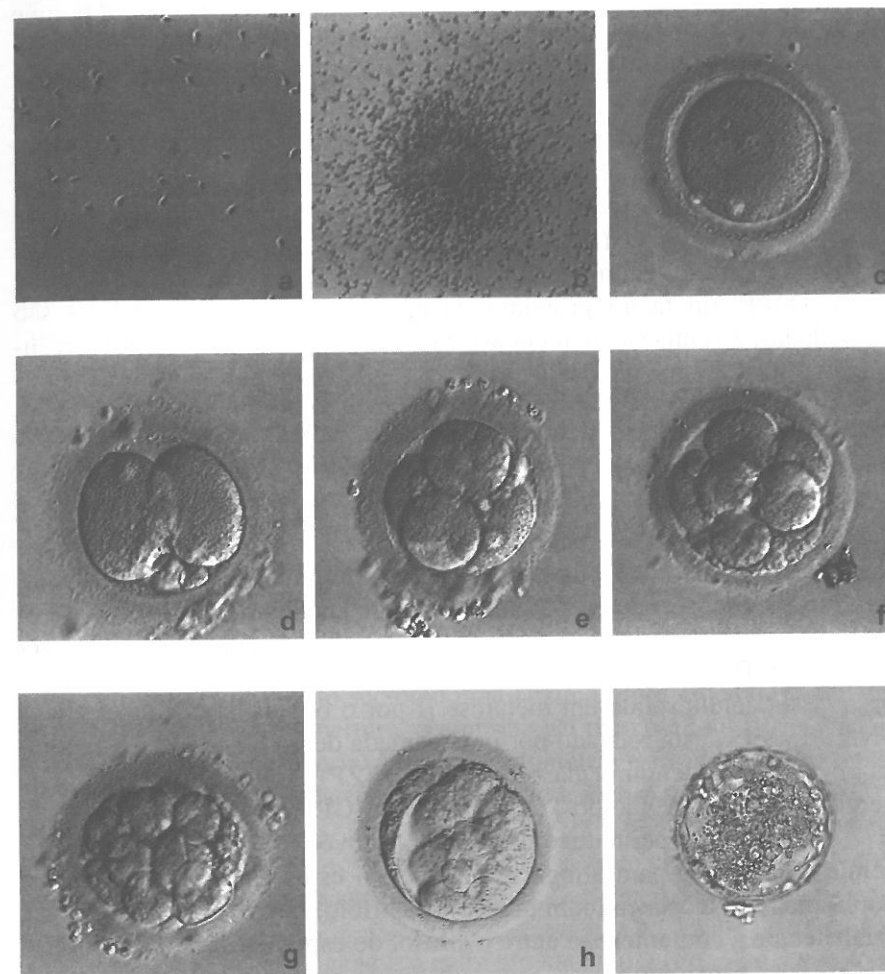


Fig. 1. Desenvolvimento embrionário pré-implantatário na espécie humana

a) espermatozoides. b) Ovócito em metafase II, rodeado de células foliculares. c) Zigoto com dois glóbulos polares, e pronúcleos feminino e masculino. d) Embrião de 2 células, ou blastómeros. e) Embrião com 4 células. f) Embrião com oito células. g) Embrião com dezasseis células. h) Blastocisto inicial: alguns blastómeros alongam-se e passam a colocar-se sob a zona pelúcida (ZP) formando as células periféricas do trofoblasto. i) Blastocisto expandido: em tudo semelhante ao anterior mas a cavidade blastocélica está expandida e a ZP diminuiu de espessura.

FIGUEIREDO, H. Imagens obtidas no CETI (1999).

tese - fase G<sub>1</sub>, e um segundo intervalo entre o fim da fase de síntese e o começo da mitose - fase G<sub>2</sub> (NORBURY, 1992).

Na fase G<sub>1</sub>, a célula cresce e acumula diversas proteínas algumas das quais com acção sobre o DNA (KING, 1995). Quando no citosol (isto é, no espaço compreendido entre os organelos citoplasmáticos) se atinge uma determinada quantidade de ciclinas G<sub>1</sub> (proteínas assim designadas porque são cíclicas), estas ligam-se a proteínas quinases denominadas Cdk (*cyclin dependent kinases*), disparando uma cascata de fosforilações cuja consequência sobre o DNA é a replicação cromosómica. Este ponto de viragem denomina-se START e marca a entrada na fase S. A degradação das ciclinas G<sub>1</sub> marca o fim da replicação e a entrada na fase G<sub>2</sub> pré-mitótica. Nesta fase, acumulam-se as ciclinas mitóticas que, quando atingem determinada concentração, se ligam a outras Cdk, causando o início da mitose (NURSE, 1994). O complexo ciclina mitóticas - Cdk denomina-se *mitosis promoting factor* (MPF) ou factor promotor da mitose. Quando estas ciclinas são degradadas, a célula sai de metafase e rapidamente termina a mitose, reentrando em G<sub>1</sub>. Se em G<sub>1</sub> a célula não conseguir obter nutrientes em quantidade e qualidade suficiente, bem como diversos factores de crescimento (privação de soro), o seu metabolismo fica deprimido e entra em fase quiescente, denominada G<sub>0</sub> (VAN ZOELLEN, 1999).

No ovário, o ovócito encontra-se em profase (presença de núcleo ou vesícula germinativa) e prepara-se para metafase I (MI). Ao terminar a primeira divisão meiótica, é libertado o 1º glóbulo polar (GP1), resultante de uma citocinese desigual, e o ciclo meiótico mantém-se em metafase II (MII). É em metafase II que o ovócito é ovulado, continuando até ser fecundado (BRIGGS, 1999).

Esta célula retida em metafase II por o ooplasma conter elevados níveis de MPF, está rodeado por uma camada densa de células de natureza glicoproteica denominada zona pelúcida (ZP). A placa metafásica, está geralmente sob a região do 1º glóbulo polar (GP1).

Quando o espermatozóide encontra o ovócito, penetra por entre as células foliculares para atingir a ZP. Todo o espermatozóide penetra no ooplasma quer a cabeça (com núcleo e centríolo) quer o flagelo. Uma vez estabelecida a comunicação entre o citosol do espermatozóide e o ooplasma, o espermatozóide liberta uma substância a oscilina, que desencadeia vagas cíclicas de libertação de cálcio intracelular, as quais destroem a actividade do MPF e permitem o término da meiose do ovócito e a activação metabólica do mesmo.

O núcleo do espermatozóide, em contacto com o ooplasma activado, sofre então profundas alterações: perde as protaminas – proteínas básicas de ligação ao DNA, que o mantinham condensado e em fase G<sub>0</sub> do ciclo, e recebe do ooplasma novas histonas – proteínas básicas de ligação ao DNA, que o tornam activo. Em consequência, forma-se um núcleo de maior volume, redondo, o pronúcleo masculino. Entretanto, o

ovócito fecundado termina a segunda divisão meiótica, com uma segunda citocinese desigual, formando-se o segundo glóbulo polar e o pronúcleo feminino. A fecundação ao disparar a série cíclica de libertação intracelular de cálcio desencadeia a exocitose das vesículas corticais, levando ao bloqueio da entrada de outros espermatozóides no ovócito (SOUSA, 1999).

Cerca de 17-20 horas após inseminação e após remoção das células foliculares nota-se o 2º glóbulo polar (GP2), bem como os pronúcleos feminino e masculino (fig. 1 c). O primeiro ciclo de divisão celular surge após inseminação quando observamos um embrião de 2 células - 2 blastómeros (fig. 1 d). O embrião pode atingir as 4 células, 40 a 48 horas após inseminação (fig. 1 e). A mórula, fase de dezenas de células, compactadas estabelece-se entre o terceiro e o quarto ciclos celulares (fig. 1 f-g). Entre o sexto e o sétimo ciclos celulares, até ao quinto dia da fecundação, com um conjunto de 64 a 128 células – o blastocisto – inicia-se a cavitação, em que nesta fase, os blastómeros segregam um líquido para o interior do embrião que forma lagos entre as células (fig. 1 h). Alguns dos blastómeros alongam-se e começam a formar um revestimento colocando-se sob a ZP, formando as células periféricas do trofoblasto; o líquido secretado pelo trofoblasto forma então uma única cavidade, a cavidade blastocélica; os blastómeros restantes formam as células da massa celular interna (fig. 1 i). O blastocisto está expandido, em tudo semelhante ao anterior, e como a cavidade blastocélica está expandida, a ZP diminuiu de espessura. Para se dar a eclosão, o trofoblasto secretou uma enzima proteolítica que abre um orifício na ZP. Por esta abertura, o embrião sai para o endométrio. São as células do trofoblasto que invadirão o endométrio e formarão a placenta. As células da massa celular interna formarão o embrião (DAWSON, 1993).

### Do zigoto ao disco embrionário

Quando o material genético entra em singamia, forma-se o zigoto e, deste modo, estabelecem-se os 46 cromossomas (diploidia) do novo genoma humano, o que marca o final da fecundação e a constituição de um novo sistema que actua como unidade independente. Os primeiros eventos após a singamia, assim como a própria fecundação, são controlados por mensagens genéticas programadas durante o crescimento e maturação do ovócito.

O zigoto, possuidor da informação hereditária dos progenitores, célula semelhante a qualquer outra diplóide em fase cinética (período de multiplicação), inicia acompanhado de múltiplas actividades um processo de segmentação, que decorre 30 horas após a fecundação. Os genes do embrião não iniciam as suas funções senão no estado de oito células

(RAJU, 1999). Até então, os cromossomas dos progenitores não intervêm no controlo destes eventos. Estas divisões sucessivas, a que chamamos mitoses, permanecem até ao estado adulto.

As primeiras divisões mitóticas ocorrem em rápida sucessão, originando as fases de 2, 4, 8 e 16 células, de que decorre uma mórula e finalmente um blastocisto, que se implanta na mucosa uterina. As células originadas por este processo são os blastómeros. Durante este período a zona pelúcida permanece a rodear o embrião e não aumenta de volume. Após a fase de 16 células, terceiro ou quarto ciclos celulares, estabelece-se na mórula a primeira heterogenicidade morfológica evidente: começa a haver um acúmulo gradual de líquido com formação de uma cavidade na parte central - blastocélio.

Os blastómeros, afastados pelo líquido, passam a constituir uma camada periférica (trofoblasto), espessada num ponto onde permanece um aglomerado celular (massa celular interna) que faz saliência para dentro da cavidade. É a fase de blastocisto, que corresponde aproximadamente ao quarto-quinto dia após fecundação, altura em que o embrião chega ao útero. Na fase de blastocisto a zona pelúcida adelgaça-se e desfaz-se, permitindo que as células do trofoblasto, que têm o poder de invadir as mucosas, entrem em contacto com a superfície do endométrio, ao qual aderem. O blastocisto permanece um a dois dias em contacto com a superfície da mucosa uterina e é envolvido pela secreção das glândulas endometriais, desencadeando o processo natural da gravidez. Inicia-se imediatamente uma multiplicação intensa das células do trofoblasto que vão assegurar a nutrição do embrião à custa do endométrio. A massa celular interna, da qual se formará o corpo do embrião, cresce muito pouco nesta fase. A implantação só estará completa quando o embrião se encontrar completamente envolvido pela mucosa uterina, cerca do décimo quarto dia pós fecundação.

Em não mais de cinco a seis dias formam-se, a partir do trofoblasto, as membranas embrionárias: o córion, que irá garantir a possibilidade de sobrevivência; e o âmnios, que limitará a área de crescimento. Assiste-se no embrioblasto, depois de uma diferenciação celular e de uma migração selectiva das células, à sua transformação no que se designa por disco embrionário. Nele se distinguem as primeiras duas lâminas celulares: a ectoderme e a endoderme, sobrepostas, histologicamente diferenciadas e com destino irreversível. Entre estas duas camadas, por volta do 15º dia e próximo da zona caudal, como consequência de um processo de invaginação a partir da ectoderme acompanhada de uma multiplicação e de uma

migração celulares entre as duas lâminas, inicia-se a formação de um terceiro estrato celular: a mesoderme. Como consequência, aparece sobre a ectoderme uma linha bem definida - à qual se deu o nome de linha primitiva. A linha primitiva, é o primeiro indicador do rudimento do sistema nervoso central (tronco cerebral). O embrião tem agora cerca de meio milímetro de diâmetro, o tamanho do ponto final no fim desta frase.

### Para além do disco embrionário

A partir deste momento continua o processo morfogénico, cada vez mais rápido e complexo, e vão-se formando as estruturas primordiais dos órgãos e sistemas. Por volta da 5ª semana de gestação, decorridos vinte dias desde o surgimento do disco embrionário, em que o tamanho do embrião ainda não atinge um centímetro, já estão presentes as primeiras estruturas cerebrais, os esboços bem definidos do coração, do aparelho respiratório, do aparelho gastroenterológico e da área genito-urinária onde já se iniciou o processo de formação das gónadas. Até à 6ª semana são bem visíveis as extremidades e está já avançada a formação do sistema nervoso central; à 7ª semana está completa a forma do corpo e é inconfundível. Até à 8ª semana o corpo está totalmente definido nas suas estruturas fundamentais (DAWSON, 1993). O ser original, resultante de tal contribuição, inicia desde logo um processo de desenvolvimento ontogénico que cessará quando atingir a fase de maturidade e tiver capacidade de procriação.

### A revolução biológica

No reino animal, por exemplo, é desde os anos trinta que se efectuam experiências de produção de seres idênticos, obtidos por cisão gemelar artificial, modalidade esta que se pode impropriamente definir por clonagem. Clonar, significa obter um indivíduo geneticamente igual a um outro previamente existente. As células de um organismo adulto encontram-se geneticamente diferenciadas, e todas as tentativas *in vitro* de conseguir tornar estas células totipotentes (indiferenciadas e com capacidade de divisão ilimitada ou prolongada) falharam. São as células embrionárias, as únicas acessíveis em número e manipulação tecnológica e com capacidades totipotentes. Por este motivo, as experiências de clonagem voltaram-se, desde há muitas décadas, para as células embrionárias. O objectivo destas experiências em animais foi a de se poder obter, em gran-

de número e de modo controlado, embriões geneticamente iguais para fins biotecnológicos.

Os avanços na tecnologia da Reprodução Medicamente Assistida (RMA), que conduziram à fecundação *in vitro*, têm permitido uma crescente extensão da investigação em embriões humanos fazendo reaparecer todas as preocupações já existentes desde os estudos com anfíbios, iniciados por Briggs e King (1952) e Gurdon (1964), quando anunciavam a sua primeira «transferência nuclear bem sucedida em animais vivos». O salto dos anfíbios para os mamíferos aconteceu, e perspectivou todos os receios sobre a sua aplicação aos humanos, o que suscitou ansiedade e alarme desde 1993, quando foram divulgados dados relativos a experiências em embriões humanos de cisão gemelar – *splitting* (HALL, 1993), sem prévio consenso da Comissão de Ética competente.

Em quase todos os países onde existe legislação sobre técnicas de RMA, foi introduzida uma cláusula de maneira a proibir a aplicação da clonagem a seres humanos sob pena de sanções. O motivo da rejeição da clonagem está na perversão das relações fundamentais da pessoa humana: a filiação, a consanguinidade, o parentesco, a progenitura, a negação da dignidade da pessoa humana e da sua individualidade (NUNES, 1998).

A 5 de Julho de 1996, numa serena noite de verão, o nascimento de uma ovelha, Dolly, viria novamente a perturbar o mundo inteiro, prevenindo uma longa e árdua jornada através da tempestade de informações sobre o assunto. A notícia foi publicada na revista «Nature» quase oito meses após o nascimento. Foi obra de cientistas escoceses, do «Roslin Institute» de Edimburgo, como sendo a primeira clonagem com sucesso não de células embrionárias, mas de um tecido adulto já diferenciado (WILMUT, 1997). Tratava-se de uma reprodução assexuada e agâmica destinada a produzir seres biologicamente iguais ao indivíduo adulto que fornece o património genético nuclear.

Superada a suposta impossibilidade de que o ADN das células somáticas dos animais superiores, tendo sofrido um processo de diferenciação, não pudesse já recuperar toda a potencialidade original de guiar o desenvolvimento dum novo indivíduo, estava agora aberto o caminho para a clonagem humana, entendida como replicação de um ou mais indivíduos somaticamente idênticos ao dador.

A primeira clonagem com sucesso de células não embrionárias mas de um tecido adulto, já diferenciado, correspondeu pois a Dolly depois de 277 tentativas fracassadas (POSTEL-VINAY, 1997). Estas descobertas, levaram a uma potencial aplicação da clonagem a casais inférteis como técni-

ca adicional às já existentes na RMA. Os passos técnicos da clonagem vão ser explicados agora, após a análise feita sobre o processo de fecundação e desenvolvimento embrionário.

### A célula - Totipotência e diferenciação

As células representam a unidade estrutural e funcional de todos os seres vivos e a sua proliferação está na base de toda a continuidade e perpetuação dos organismos ao longo dos tempos. Todas as células possuem uma organização interna comum. Apresentam todas um ciclo de vida denominado ciclo celular, fenómeno biológico que permite que todas as células indiferenciadas se dividam originando, por mitoses, células filhas com as mesmas características morfológicas, fisiológicas e genéticas e que, saindo do ciclo celular, se diferenciam. As células do embrião pré-implantatório dividem-se rapidamente e são totipotentes, isto é, conseguem manter-se em divisão consecutiva por muito tempo (imortalização parcial), mantendo as suas características não diferenciadas - pluripotência ou capacidade de originar diferenciação tecidual variada.

Após a implantação uterina, as células embrionárias expressam uma alteração do seu genoma. Vários grupos de células apresentam, então, forma, constituição e comportamento diferentes, transformando-se em células diferenciadas, isto é, especializadas numa determinada função, tornando-se capazes de formar os diferentes tecidos que caracterizam os seres adultos. Uma vez esses tecidos formados, as suas células têm comportamentos diferenciados em relação à capacidade de restauração e manutenção do próprio tecido. De uma maneira geral, há células que se especializam em manter o tecido por divisão celular periódica adaptada às necessidades, enquanto outras executam as funções vitais do tecido, degenerando após algum tempo por apoptose (morte geneticamente programada). De um modo geral, quanto mais sujeitos a agressões, mais os tecidos adoptam comportamentos do primeiro tipo, enquanto que os tecidos sem capacidade de reprodução apresentam células de maior longevidade, com apoptose extremamente tardia. A totipotência, a diferenciação, a divisão, a apoptose e a imortalidade celular dependem da expressão de certos genes e do silenciamento de outros, num equilíbrio delicado e muito complexo, onde as inter-relações celulares com a matriz extracelular são determinantes (KING, 1995).

As tentativas *in vitro* de reverter a diferenciação das células somáticas, de modo a readquirirem a capacidade embrionária foi sempre o

sonho dos biólogos. Por um lado, para se conhecerem os mecanismos que permitem a totipotência, os que desencadeiam e mantêm o estado de diferenciação num ou outro tecido, os da apoptose, e os da imortalidade celular. Por outro lado, para que, dominando esses mecanismos, se pudesse gerar *in vitro*, e de novo, a totipotência a partir de células adultas diferenciadas. Uma vez induzida a indiferenciação, e graças ao seu potencial mitótico, poder-se-ia obter uma enorme população de células, a quem de seguida se induziria uma diferenciação celular específica para assim se conseguirem obter tecidos e órgãos para transplante. Apesar de todos os avanços da biologia actual, este controlo é, ainda hoje, impossível.

Todas as tentativas falharam, com excepção do caso Dolly.

Este avanço tecnológico está, porém, longe da rentabilidade, e por outro lado, não constitui ainda uma clonagem independente do uso do ovócito. Conseguiu-se reaver a totipotência genética do núcleo somático utilizado, mas necessitou-se o citoplasma de um ovócito para se obter um novo ser vivo, isto é, para que o núcleo readquirisse totipotência e pudesse dividir-se de novo para originar um clone celular a partir da informação genética inicial, foi preciso recorrer a factores citosólicos desconhecidos mas que se sabem existir no ooplasma.

### Bases técnicas sobre clonagem embrionária

Em condições naturais, um ovócito é libertado do ovário, é fecundado por um espermatozóide e inicia o seu desenvolvimento. Espontaneamente, sabemos que 4 em 1000 gestações podem levar ao aparecimento de gémeos monozigóticos, que podem resultar da separação das células do primeiro ciclo de divisão ou mesmo em fase mais tardia de implantação (CORNER, 1955) e que sendo geneticamente iguais um ao outro, não são de modo nenhum, geneticamente iguais aos seus progenitores, não havendo maneira de prever a composição do seu genótipo. Foi com base nestes conhecimentos que as primeiras experiências de cisão embrionária surgiram.

Dois métodos experimentais têm sido usados em animais para clonar embriões: 1) a separação de blastómeros e divisão do embrião - quando este se encontra em estádios de 4-8 células ou de blastocisto; 2) a transferência nuclear - quando o material genético de uma célula embrionária é transferido para um ovócito ao qual foi retirado o património genético nuclear.

A divisão embrionária, inicialmente destinava-se exclusivamente à produção de gémeos monozigóticos, podendo hipoteticamente, originar

tantos gémeos quantas as células totipotentes retiradas e de seguida clonadas. A grande utilização desta divisão embrionária, levou à incidência de gémeos monozigóticos até 30% em gado (WILLIAMS, 1984) e carneiros (CHESNE, 1987), pensando-se que poderia vir a ter alguma aplicação técnica nos humanos nas próximas décadas.

Na clonagem embrionária por divisão, o embrião pré-implantatório com os seus blastómeros é libertado da zona pelúcida, sendo esta digerida por uma protease. Com a ajuda de uma pipeta de biópsia embrionária (diâmetro de 0,0048mm) tenta-se obter uma outra zona pelúcida vazia aspirando-se de um outro ovócito o primeiro glóbulo polar e a placa da segunda metafase. Introduzem-se os blastómeros do embrião (que podem ser individualizados rompendo as ligações intercelulares existentes entre eles bastando para isso uma curta incubação em meio de cultura sem cálcio e magnésio) para a zona pelúcida vazia. Cerca de 24 horas depois, os blastómeros transplantados originam de novo um embrião.

Deste modo, podem obter-se, a partir do embrião inicial, novos embriões iguais ao embrião original. Diz-se clonagem embrionária porque os novos seres vivos são geneticamente iguais entre si mas não aos progenitores.

Na prática, a produção de clones embrionários efectua-se por electrofusão (STICE, 1988). Nesta técnica, removem-se por micromanipulação os cromossomas de ovócitos - enucleação (WILLASDEN, 1986), fundindo-se depois, por descarga eléctrica, o ooplasma desprovido de informação genética cromossómica (citoplastos) com as células de embriões seleccionados. O ovócito é fixado com a ajuda de uma pequena aspiração efectuada por uma micropipeta de contenção. O primeiro glóbulo polar do ovócito é posicionado às 3 horas e é o ooplasma imediatamente sob este que contém os cromossomas do ovócito. Abre-se um pequeno orifício expirando um meio ácido (pH 2,5) sobre a zona pelúcida, e com uma micropipeta de diâmetro interno aproximadamente de 0,0048mm, aspira-se então o 1º glóbulo polar e o citoplasma do ovócito com o material genético.

A partição entre o citoplasto (ooplasma que fica dentro da zona pelúcida) e o ooplasma aspirado (cerca de um quarto do total) faz-se por estiramento. Para controlar os movimentos do citoesqueleto e permitir deformar a membrana celular, a citocalasina B e outros inibidores dos microfilamentos são necessários (SMITH, 1989). Nesta técnica, não há rotura da célula, e a enucleação efectua-se eficazmente. Com a ajuda da micropipeta, introduz-se então no espaço perivitelino um blastómero.

Finalmente, aplica-se uma curta sequência de descargas eléctricas para promover a instabilização do oolema e da membrana celular do blastómero, permitindo a sua fusão. Uma vez em contacto com o ooplasma do citoplasto, o núcleo do blastómero é reactivado, originando-se um novo embrião geneticamente igual àquele de onde o blastómero havia sido retirado. Após a fusão, os núcleos entram em contacto com factores do ooplasma, e são reactivados, obtendo-se um retomar embrionário *ab initio*. Os embriões obtidos são todos iguais (clones embrionários) porque a informação genética veio da mesma fonte. São embriões que conseguem implantar, dando origem a novos seres vivos adultos. Este sucesso depende muito da espécie, sendo um fracasso no ratinho e nos batráquios (os fetos abortam) e um sucesso relativo (difícil) em coelhos, caprinos, ovinos, bovinos e primatas. Porém, estes avanços encontraram sempre um grande obstáculo, que foi a rentabilidade no que concerne à obtenção de embriões viáveis após a electrofusão.

A equipa escocesa que conseguiu a Dolly, resolveu finalmente este problema tecnológico. Por acaso, as células existentes em cultura para serem usadas ulteriormente em experiências de electrofusão com citoplastos foram deixadas durante alguns dias sem renovação eficiente dos meios de cultura (privação de soro). A sua fusão com os citoplastos originou mais embriões do que o habitual (CAMPBELL, 1996). Esta observação espantosa, motivou rapidamente a procura do que havia sucedido. Isto veio demonstrar que é possível voltar à fase de indiferenciação. Porém, na realidade, a privação do soro não induz totipotência, mas quiescência (fase  $G_0$ ), sendo necessário adicionar a esta factores do ooplasma para reinduzir a totipotência. O ooplasma estava em  $G_1$  e a maioria dos núcleos transplantados sem privação de soro estavam em fase S ou  $G_2$ , pelo que este desfaseamento impedia uma evolução subsequente. A razão por que o citoplasto está em  $G_1$  e não em fase M, é que a electroestimulação simula a fusão com o espermatozóide em termos de aumentar abruptamente, mas provisoriamente, a  $[Ca^{2+}]_i$ , causando a degradação do MPF. Assim, a privação de soro, criando bloqueio em  $G_0$ , coloca o núcleo transplantado na posição do núcleo do espermatozóide, tornando-o síncrono com a fase do citoplasto (o contacto com o ooplasma permite-lhe a passagem de  $G_0$  a  $G_1$ ). Dolly, primeiro clone com célula somática de um animal adulto, foi obtida após mil tentativas fracassadas (POSTEL-VINAY, 1997). Uma célula somática diferenciada era suposta ter perdido a capacidade genética da pluripotencialidade. Verificou-se que o número de novos animais nascidas e com bem estar, decrescia imenso quanto mais avançada a célula fosse.

A descoberta dos factores que desreprimem os genes aparentemente suprimidos nas células somáticas diferenciadas, e que permitem a totipotência tem de esperar pela descoberta dos factores que induzem a diferenciação celular neste ou naquele tipo de tecido. Apesar das suas complexidades, a clonagem tem sido comercialmente aplicada na produção de reservas animais (BONDIOLI, 1993) e usada para aumentar a eficiência em investigação (LAMBERSON, 1994). Uma outra vantagem é ser possível exercer sobre as linhas celulares modificações dos seus genes, de modo a criar novas características (células transgénicas). Os animais transgénicos assim obtidos podem ter aplicação clínica na embriologia humana.

### Linhas de reflexão

A reprodução do ser humano resulta do desenrolar normal de funções sucessivas que permitem a produção de gâmetas (espermatozoides e ovócitos) pelas gónadas (testículos e ovários), o encontro destes gâmetas através da fecundação e o desenvolvimento do ovo até ao fim. Os seres vivos, sob diversas formas de reprodução, tendem, naturalmente e por dinamismo intrínseco, a desenvolverem-se, a perpetuar a própria espécie, com processos próprios de adaptação e de sobrevivência. O surgimento de um novo ser e o segredo de toda a morfogénese, está expresso no seu genoma o qual fica determinado no momento da fecundação. É a actividade do genoma que, desde a fusão dos gâmetas, sustenta e mantém a unidade morfológica e especialmente a unidade funcional do embrião. É um processo em que existe uma sequência integrada e uma coordenação de actividades celulares sob o controlo do novo genoma, modelada por uma complexa e ininterrupta cascata de sinais que se transmitem de célula a célula e do ambiente extracelular e embrionário de cada uma das células. Esta característica implica e exige uma rigorosa unidade do ser em desenvolvimento.

De tudo o que se disse sobre o processo de desenvolvimento embrionário, tem de concluir-se que com a fusão dos dois gâmetas humanos começa o ciclo vital de um novo ser humano, ciclo que, dentro do seu tempo característico, vai prosseguir sem descontinuidades. A multiplicação celular e a formação de determinados tecidos e órgãos, aparecem como sendo uma sucessão ininterrupta de acontecimentos encadeados e coordenados entre si. Há uma continuidade no processo através do qual o novo ser humano toma forma. O novo ser passa por estádios cada vez mais complexos, constituindo ininterruptamente o mesmo e idêntico, segundo

um plano bem definido. A forma definitiva é consequência de um processo gradual, característica constante da reprodução gamética.

A clonagem está na ordem do dia e desenvolve-se grande expectativa, esperança, receio e até ansiedade, temendo as consequências imprevisíveis. O debate acendeu-se com a clonagem por transferência nuclear, uma reprodução assexuada e agâmica destinada a produzir seres biologicamente iguais ao indivíduo adulto que fornece o patrimônio genético nuclear. Foi com a clonagem por transferência nuclear de células somáticas, após o nascimento de Dolly, que toda a preocupação se espalhou, pelo receio dos resultados da aplicação deste método experimental à espécie humana. Se tentado em humanos, punha-se o risco da manipulação hormonal na dadora dos ovócitos, os abortamentos sucessivos na mãe portadora e o possível desenvolvimento de graves anomalias.

Apenas em vinte anos, a espécie humana apropriou-se, com a «procriação artificial», de alguns modos naturais de reprodução, característicos de outras espécies animais. A questão, aqui, não é saber se se trata de um progresso, quando a espécie evoluída e dominante começa a imitar os seres que considera inferiores. Devemos, sim, tentar antes de mais perceber onde pode conduzir esta busca febril, iniciada há já algum tempo. As escolhas fundamentais com que as sociedades humanas se deparam nunca são tão simples quanto nos possam parecer. Uma vez que somos seres inquietos, condicionados pela evolução para seguir em frente sem olhar para trás, muitas vezes encontramos problemas sem termos pensado muito neles, concorrendo para a culpabilização, apenas alguns séculos mais tarde.

Em todo o mundo as técnicas de R.M.A. têm levantado uma multiplicidade de interrogações. A grande preocupação reside na preservação da natureza e dignidade humanas, no presente e no futuro, e sobre eventuais limites a impor aos novos poderes adquiridos pela ciência. «Perante os novos poderes que a ciência dá ao Homem sobre a vida e sobre si próprio, é importante que ele segure as rédeas do progresso e tome as decisões éticas que lhe tornem possível plasmar um futuro autenticamente humano» (ARCHER, 1995).

HELENA FIGUEIREDO

### Bibliografia

Archer L: Origem Científica e Âmbito Transcientífico da Bio-Ética, *A Bioética e o Futuro*, Publicações do II centenário da Academia das Ciências de Lisboa, 1995: pp. 45-61.

- Bondioli KR: Nuclear transfer in cattle, *Mol. Reprod. Dev.* 36; 1993: 274-275.
- Briggs D, Miller D and Gosden R: Gamete and embryo biology, *Molecular Biology in Reproductive Medicine*, The Parthenon Publishing Group, New York, 1999, pp. 251-269.
- Briggs R, King TJ: Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frog's eggs, *Zoology* 38; 1952: 455-463.
- Campbell KHS, McWhir J, Richie WA and Wilmut I: Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line, *Nature* 380; 1996: 64-66.
- Chesne P, Colas G, Cognie Y et al.: Lamb production using superovulation, embryo bisection and transfer, *Theriogenology* 27; 1987: 751-757.
- Corner GW: Observed embryology of human single-ovum twins and other multiple births, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 70; 1955: 933-951.
- Dawson K: Introduction: An outline of scientific aspects of embryo research, *Embryo Experimentation - Ethical, legal and social issues*, Cambridge University Press, 1993, pp. 3-13.
- Gurdon JB: The transplantation of living cell nuclei, *Adv. Morphogen.* 4; 1964: 1-43.
- Hall JL, Engel D, Gindoff PR et al.: Experimental cloning of human polyploid embryos using an artificial zona pelucida, *Annual meeting of the American Fertility Society and the Canadian Fertility and Andrology Society* abstr O-001; 1993: p. 81.
- Howard A, Pelc R: Synthesis of deoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relations to chromosome breakage, *Heredity (suppl.)*; 6, p. 261.
- King KL, Cidlowski JA: Cell cycle and apoptosis: common pathways to life and death, *J. Cell Biochem.* 58; 1995: 175-180.
- Lamberson WR: Production of genetically identical swine: uses for families with reduced phenotypic variation, *Theriogenology* 41; 1994: 453-460.
- Norbury C, Nurse P: Animal cell cycles and their control, *Annu. Rev. Biochem.* 61; 1992: 441-470.

- Nunes R: Dilemas éticos na Genética, *Ética em Cuidados de Saúde*, Coord. de Daniel Serrão, Rui Nunes, Porto Editora, 1999, pp. 111-130.
- Nurse P: Ordering S phase and M phase in the cell cycle, *Cell* 79; 1994: 547-550.
- Postel-Vinay O, Millet A: Comment ça va Dolly? *La Recherche*, 297; 1997: 50-63.
- Raju GP, Tan C and Klein PS: Concepts in early embryonic patterning, *Molecular Biology in Reproductive Medicine*, The Parthenon Publishing Group, New York, 1999, pp. 353-379.
- Smith LC, Wilmut I: Influence of nuclear and cytoplasmic activity on the development in vivo of sheep embryos after nuclear transplantation, *Biol. Reprod.* 40; 1027-1035.
- Sousa M, Azevedo C: Fertilização Animal, *Biologia Celular e Molecular*, Lisboa, Lidel - Edições Técnicas, 1999: pp. 375-390.
- Stice SL, Robl JM: Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbit embryo, *Biol. Reprod.* 39; 1988: 657-664.
- Willadsen SM: Nuclear transplantation in sheep embryos, *Nature* 320; 1986: 63-65.
- Williams TJ, Eldsen RP and Seidel GE: Pregnancy rates with bisected bovine embryos, *Theriogenology* 22; 1984: 521-531.
- Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J et al.: Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells, *Nature* 385; 1997: 810-813.
- Van Zoelen EJJ : Polypeptide growth factors and their role in regulating the cell cycle, *Molecular Biology in Reproductive Medicine*, The Parthenon Publishing Group, New York, 1999, pp. 67-77.

## A clonagem para fins terapêuticos e reprodutivos

### 1. Introdução

A nossa sociedade encontra-se confrontada com um problema de monta, nascido do desenvolvimento dessa enorme máquina onde a ciência e a técnica estão intimamente associadas naquilo a que se convencionou agora chamar tecnociência. Esta enorme máquina não produz apenas conhecimento e elucidação, mas também produz ignorância e cegueira (Morin, 1991).

No mundo actual, nunca o futuro foi tão incerto e, no fim do segundo milénio, é necessário compreender o móbil dos medos actuais. Estará a sociedade bloqueada pela nossa incapacidade de imaginar o futuro?

Se é certo que o futuro não está escrito, pode deduzir-se que é múltiplo e aleatório. Assim, todas as possibilidades, mesmo o impossível, são imagináveis. A questão da escolha é, portanto, essencial (Raux, 1996). Fala-se do futuro incerto mas, paradoxalmente, nunca fomos tão responsabilizados pelo futuro que devemos deixar às gerações vindouras (Mongin, 1996). Daí a seguinte reformulação do imperativo kantiano por Hans Jonas: "Faz de modo a que os efeitos da tua acção sejam compatíveis com a permanência de uma vida autenticamente humana sobre a terra" e "de modo a que os efeitos do teu comportamento não sejam destrutivos para a possibilidade futura de tal vida." Dizendo isto, Jonas procura apenas tirar as consequências de condições e de novas possibilidades de acção quanto às nossas obrigações morais. Agimos no seio de uma biosfera em evolução, regida pela lei da entropia, que oferece às nossas existências apenas um meio frágil e perecível. A fragilidade do mundo e o nosso poder modificam radicalmente a ordem de grandeza das nossas