



Mário Sousa

*Universidade do Porto*

## O futuro da reprodução humana

A gravidez e ter um bebé é algo mágico para um casal, tal como quando ele nos agarra um dedo nas suas mãos pequeninas e de pele assim tão especial. Algo que sentimos produto do nosso amor, alguém frágil que temos de fazer crescer, sem limitar, alguém que é uma individualidade e não um objecto, e que devemos criar como o nosso melhor amigo e maior amor, em igualdade, sem posse ou autoridade.

A infertilidade atinge 15% dos casais, mas esta taxa depende frequentemente de causas evitáveis, como o adiamento da gravidez para depois da estéril estabilidade do curso, pós-30 anos, ou a transmissão de doenças sexuais, que cursam sem qualquer sintoma e foram adquiridas na exploração da sexualidade sem objectivos. Outras vezes, a causa é psicológica, e tantas outras apenas se deve a um não levar o bebé periodicamente ao pediatra que facilmente corrigiria anomalias anatómicas, hormonais e genéticas. Outras vezes, fica-se estéril porque simplesmente não se congelou tecido ovárico ou testicular, ou mesmo ovócitos e espermatozóides, antes de nos submetermos a um tratamento para doenças malignas (cirurgia, quimioterapia, radioterapia).

Todos os casais devem ser devidamente estudados antes de serem tratados, para que se saiba a causa da infertilidade. Este estudo demora cerca de 1 mês, e não deve esquecer o stress, a ansiedade, a depressão, e o mal funcionamento entre os membros do casal, factores mais do que suficientes para causar infertilidade.

Na mulher, inclui análises gerais (pex: grupo sanguíneo, inflamações, infecções, presença de anticorpos que impedem a fecundação ou a implantação), análises hormonais (pex: alterações da prolactina e da tiróide são tratadas; elevações da FSH sugerem menopausa precoce), estudo dos cromossomas (um cariótipo alterado pode ser causa de abortamentos de repetição, incapacidade de ovular, ou incapacidade de engravidar), estudo da capacidade de ovulação pelo gráfico das temperaturas, ecografia uterina e ovárica (pex: malformações anatómicas, tumores, pólipos, ovário policístico), histerosalpingografia (em posição ginecológica, introduz-se um pequeno volume de contraste no útero, e após RX pode-se ver se as trompas uterinas estão ou não obstruídas, e se o útero tem ou não malformações, tumores ou pólipos), e histeroscopia (endoscopia do interior do útero para ver e corrigir a existência de aderências inflamatórias, tumores ou pólipos).

No homem, inclui análises gerais (pex: grupo sanguíneo, inflamações, infecções), análises hormonais (pex: alterações das hormonas sexuais que causam anomalias genitais, défice ou anomalias dos espermatozóides, e que podem ser tratadas), estudo dos cromossomas (pex: um cariótipo alterado pode causar défice ou anomalias dos espermatozóides, ou mesmo a sua ausência), estudo do sémen (o espermograma despista a presença de espermatozóides, bem como a sua normalidade em termos de número-oligozoospermia, morfologia-teratozoospermia, motilidade-astenozoospermia e vitalidade). No caso dos rapazes sem espermatozóides (azoospermia), há que saber se o sémen foi ejaculado para trás, para a bexiga, em vez de o ser para o exterior (a ejaculação retrógrada é mais frequente nos homens com antecedentes de cirurgia a um tumor abdominal, com patologia da próstata, ou que foram operados à próstata). Nestes casos, pede-se para urinar e tentam-se recuperar os espermatozóides. Se estes não forem viáveis, faz-se uma punção testicular (com agulha fina, sob anestesia local). A ausência de espermatozóides pode também ser devida à obstrução inflamatória ou infecciosa dos canais excretores (faz-se o diagnóstico por uma ecografia), à ausência congénita dos canais deferentes (obriga a despiste molecular de uma doença genética que dá origem a bebés com fibrose cística), ou a vasectomia (laqueação dos canais deferentes como método contraceptivo). Nestes casos (azoospermia obstrutiva), os espermatozóides são aspirados do epidídimo, o canal à saída do testículo (biópsia sob anestesia local). Se não houver obstrução (azoospermia secretora), faz-se uma biópsia testicular (sob anestesia local) para saber se há espermatozóides ou suas células precursoras (espermatídeos) no testículo. No caso dos rapazes paraplégicos (sem erecção, ou com erecção mas sem ejaculação) o sémen é obtido por

electroejaculação (sonda rectal que causa erecção e ejaculação) ou por punção testicular.

Obviamente que beber álcool, fumar ou consumir drogas são também interditos, pois causam infertilidade e anomalias genéticas dos gâmetas e dos embriões.

Vários medicamentos também causam infertilidade, sobretudo masculina, como os antihipertensores e antidepressivos, pois o número, morfologia, motilidade e vitalidade dos espermatozoides é severamente atingida.

Várias doenças, como a hipertensão e a diabetes também podem causar infertilidade, sobretudo masculina, geralmente causando impotência (défice da erecção).

Várias profissões podem também causar infertilidade, nomeadamente masculina, como a exposição ao chumbo (indústria do vidro) e ao calor (motoristas, fornos).

Devido ao risco de transmissão de doenças infecciosas, qualquer acto natural ou médico efectuado com vista à procriação deverá ser precedido de um estudo dos membros do casal para garantir que determinadas doenças não serão transmitidas ao feto. Nelas incluem-se o HIV 1, HIV 2, Herpes, Citomegalovírus, Sífilis, Hepatite B, Hepatite C, Papilomavírus, Rubéola e Toxoplasmose. Para alguns casos há vacinas ou tratamentos específicos, enquanto que para outros casos se deverá recorrer à reprodução medicamente assistida para evitar a transmissão dessas doenças. Por exemplo, o primeiro bebé de um casal com SIDA, nasceu por este método no grupo do Porto nos inícios de 2001.

Os casais com abortamentos de repetição ou com riscos de transmissão de doenças genéticas podem recorrer à reprodução medicamente assistida, utilizando o diagnóstico genético pré-implantação (grupo no Porto). Nesta técnica, quando os embriões tiverem 8 células (ao 3º dia), remove-se 1-2 dessas células por microcirurgia, sendo depois analisadas por técnicas de biologia molecular. Deste modo, só os embriões sem doença são colocados no útero da futura mãe. São exemplos: anomalias dos cromossomas, trissomia 21, para-amiloidose, hemofilias, doenças degenerativas ligadas ao cromossoma X, fibrose cística, doença de Huntington, distrofias musculares, doença de Tay-Sachs, talassemias, abortamentos de repetição, incapacidade de engravidar após múltiplas tentativas, e idade feminina superior a 37 anos.

Nos casos em que existem patologias femininas associadas, como hipertensão, asma ou diabetes, e nos casos de incompatibilidade entre grupos sanguíneos dos

membros do casal (mãe Rh<sup>-</sup> vs pai Rh<sup>+</sup>), vários exames devem ser efectuados previamente, pois existem tratamentos específicos e são situações que exigem um acompanhamento obstétrico especial.

## Adopção

Nunca esquecer.

## Inseminação intra-uterina

A IIU destina-se a situações de infertilidade com a seguinte causa: muco cervical que impede a penetração dos espermatozóides (cérvix ou colo uterino é a porção do útero que faz procidência no fundo da vagina, o qual é recoberto pelo muco cervical); causas psicológicas (vaginismo: contractura pélvica da mulher que impede a penetração; impotência masculina por falta de erecção); disfunção ligeira da ovulação; pequenos défices da qualidade do sémen; situações em que o sémen tem de ser previamente lavado e tratado para evitar a transmissão de agentes infecciosos ou de anticorpos.

Nesta técnica, o parceiro colecta o sémen por masturbação. Se o rapaz não conseguir, pode-se usar um preservativo especial para o casal ter relações sexuais. Se mesmo assim não conseguir (a inibição psicológica não é uma raridade), pode-se fazer uma pequena punção testicular (por uma fina agulha, sob anestesia local). O sémen é depois lavado e de seguida preparado num meio de cultura especial que permite seleccionar os melhores espermatozóides (os de morfologia mais normal e os mais velozes). Os espermatozóides são então colocados num fino catéter de plástico mole, estéril e não tóxico. Em posição ginecológica, o ginecologista coloca o catéter no canal do colo uterino, que é o canal de entrada para a cavidade uterina. Aí, os espermatozóides são libertados. Os espermatozóides percorrem depois a distância até às trompas para fecundar o óvulo. Esta técnica pode ser efectuada em ciclo natural ou induzido. No ciclo natural, a mulher ovula naturalmente, e a altura da ovulação é determinada por ecografia. No ciclo induzido, a mulher faz um ligeiro tratamento hormonal para assegurar a ovulação.

O centro do Porto introduziu esta técnica em Portugal (1<sup>o</sup> bebé, 1985) e detém uma das melhores taxas europeias de gravidez por IIU, sendo de cerca de 14% por tentativa. Em geral, 80% das raparigas engravida até à 3<sup>a</sup> tentativa. Após 4 tentativas falhadas, sugere-se a fecundação in vitro ou a microinjecção, consoante os casos.

A IIU também se destina às mulheres que utilizam **sémen de dador**. A doação de sémen efectua-se por motivos de azoospermia, como pex: malformações, ausência ou atrofia dos testículos; criptorquidia (testículos que não desceram para as bolsas escrotaais, e cuja correcção cirúrgica não foi efectuada na infância); lesão testicular (traumatismos, torção); remoção cirúrgica dos testículos por tumor; quimioterapia e radioterapia; anomalias hormonais (não tratadas na infância), ou anomalias genéticas. A doação de sémen também se destina às mulheres que não desejam ter um parceiro masculino e aos casais homossexuais.

Os dadores de sémen têm de possuir uma boa compleição física; um bom quociente intelectual; educação elevada; ausência de hábitos alcoólicos, tabágicos ou de consumo de drogas; ausência de malformações físicas e genéticas; ausência de qualquer doença e de agentes infecciosos; ausência de malformações e de doenças hereditárias familiares. Os dados físicos e de sangue do dador são escolhidos pelo casal de modo a serem iguais aos do parceiro (grupo sanguíneo, estatura, raça, cor de pele, cabelos e olhos) ou de acordo com as opções da mulher. Desta maneira, 75% das características genéticas paternas do bebé são do pai e não do dador.

## Fecundação in-vitro

Destina-se aos casais em que as trompas uterinas da mulher estão obstruídas (neste caso, os espermatozóides não atingem o óvulo, nem o óvulo consegue descer para o útero), ou em que a mulher apresenta perturbações graves da ovulação. Requer um sémen com mínimos de qualidade.

Na FIV, a mulher é estimulada com hormonas que fazem crescer cerca de 4 óvulos em cada ovário (durante cerca de duas semanas). Quando maduros (vê-se por ecografia), são aspirados por via vaginal sob controle ecográfico (sob anestesia ligeira: sedação endovenosa). Numa caixa de cultura, cheia de um líquido nutritivo, aos óvulos juntam-se os espermatozóides lavados e seleccionados e a fecundação ocorre naturalmente. Ao 3º dia transferem-se os embriões (2 se <35 anos, 3 se > 35 anos).

A taxa de gravidez no centro do Porto (uma das melhores na Europa) é cerca de 19-27% por ciclo, taxa que varia consoante a idade feminina. Ou seja, em média são precisas 4 tentativas. O 1º bebé FIV em Portugal nasceu no Hospital de Santa Maria em Lisboa (1985).

A FIV também se destina aos casos de **doação de ovócitos**. A doação de óvulos destina-se aos casais em que a mulher apresenta várias patologias ou circunstâncias

especiais, nomeadamente: ovários com malformações congénitas (anomalias de nascimento que impedem o crescimento dos óvulos e a ovulação); remoção cirúrgica dos ovários devido a doença (nomeadamente maligna); destruição dos óvulos nos ovários por tratamento médico (quimioterapia ou radioterapia); menopausa (a menopausa ou insuficiência ovárica pode ser precoce, situação frequente e que pode começar antes dos 30 anos); anomalias genéticas (neste caso, a mulher ovula, mas os óvulos não fecundam, ou dão origem a embriões anómalos ou a embriões sem capacidade de implantação); idade ovárica avançada (a partir dos 37 anos, o número de óvulos com anomalias genéticas começa a aumentar, atingindo um pico após os 40 anos; deve-se ao facto de os óvulos estarem parados há tanto tempo nos ovários); contra-indicação para estimulação hormonal.

A estimulação da mulher dadora e a recolha dos óvulos faz-se como acima descrito para a FIV. O recrutamento das dadoras é efectuado entre estudantes universitárias (20-29 anos de idade). As dadoras têm de possuir uma boa compleição física; um bom quociente intelectual; educação elevada; ausência de hábitos alcoólicos, tabágicos ou de consumo de drogas; ausência de malformações físicas e genéticas; ausência de qualquer doença e de agentes infecciosos; ausência de malformações e de doenças hereditárias familiares. Os dados físicos e de sangue da dadora são escolhidos pelo casal de modo a serem iguais aos da mãe (grupo sanguíneo, estatura, raça, cor de pele, cabelos e olhos) ou de acordo com as opções da mulher. Deste modo, a doação faz com que cerca de 75% das características maternas do bebé sejam da mãe e não da dadora.

A FIV também se destina aos casos que necessitam de **doação de embriões**. Nesta situação rara, ambos os membros do casal não possuem gâmetas (por exemplo: mulher de 30 anos com menopausa precoce e parceiro sem espermatozóides). Também se destina a casos de infertilidade de uma mulher ou de um homem sem parceiro(a).

Até 1991, a IUI e a FIV permitiam resolver praticamente todos os casos de infertilidade feminina (50% das causas de infertilidade conjugal), ficando sem tratamento as de causa masculina. Em 1992 (Bruxelas, Bélgica) e 1993 (Paris, França, nosso grupo de trabalho: primeiros bebés em França), dois grupos desenvolveram então uma nova tecnologia, a microinjecção. Esta técnica veio resolver cerca de 75% das causas de infertilidade masculina. Em 1994, o nosso grupo de Paris aplicou a técnica a espermatozóides do testículo (primeiros bebés franceses), depois às células precursoras de espermatozóides (primeiros bebés a nível mundial). Deste modo, em apenas 3 anos resolvemos cerca de 95% das causas de infertilidade masculina.

## **Microinjecção de espermatozóides**

A ICSI destina-se aos casais com falhas em FIV, na ejaculação retrógrada, nos paraplégicos, nos casos em que os espermatozóides não possuem mínimos de qualidade (em número, morfologia, motilidade e/ou vitalidade), na azoospermia (obstrutiva ou secretora), nos casos de colheita de sémen pós-mortem, e nos casos para diagnóstico genético pré-implantação.

Neste método, a mulher é estimulada como na FIV, só que, com o auxílio de um potente microscópio e de micromanipulação, um espermatozóide (o mais normal possível) é seleccionado e depois injectado em cada óvulo. Deste modo, já não se precisa de 1 milhão de espermatozóides normais e móveis como para a IUU, ou de 50000 espermatozóides normais e móveis como para a FIV. Por mais poucos e anormais e imóveis que sejam, é praticamente sempre possível encontrar alguns (5-8), mesmo que praticamente imóveis e mesmo que morfologicamente não sejam totalmente perfeitos. Ao 3º dia transferem-se os embriões (2 se <35 anos, 3 se > 35 anos).

A taxa de gravidez é cerca de 27-35% por ciclo (uma das melhores a nível europeu), taxa que varia consoante a idade feminina. Ou seja, em média são precisas 4 tentativas. A microinjecção foi introduzida pelo grupo do Porto em 1994 (primeiros bebés portugueses; primeiros bebés a nível mundial com espermatozóides imóveis).

## **Microinjecção de Espermatídeos**

Em 1995, a nossa equipe conseguiu os primeiros bebés (saudáveis) em casais franceses em que o parceiro masculino não possuía espermatozóides, utilizando a microinjecção de células precursoras isoladas do testículo. Em 1997, podemos permitir com esta tecnologia o primeiro bebé em Espanha, e em 1998 em Portugal. Nesta técnica, os rapazes com azoospermia secretora sofrem biópsia testicular e depois tentamos encontrar no tecido um pequeno foco de células-mãe contendo os precursores dos espermatozóides. Em cerca de 60% destes rapazes conseguimos este propósito, e o grupo do Porto publica no início do próximo ano a maior série a nível mundial de doentes tratados e de bebés normais e saudáveis nascidos com microinjecção de espermatídeos.

## Cultura In Vitro de Células-Mãe Testiculares

Em 1998, no Porto, conseguimos produzir espermátides após cultura in-vitro do tecido germinal em casos de rapazes que possuíam na biópsia testicular células-mãe mas não espermátides.

Porém, estes sucessos são individuais, quer dizer, não funcionam em todos os pacientes. Para já, permanece por isso uma técnica de esperança mas não uma certeza, estando no entanto disponibilizada a todos os doentes que dela necessitem.

## Haploidização

A haploidização, ou criação de gâmetas artificiais a partir de células somáticas adultas, destina-se a fabricar gâmetas in-vitro para evitar a doação de óvulos ou de espermatozoides. Poderá vir a ajudar os rapazes com azoospermia secretora em que a cultura de células-mãe falhou ou não é possível, os rapazes sem testículos (remoção cirúrgica, quimioterapia, radioterapia), ou as mulheres que não produzem óvulos (anomalias dos ovários, menopausa) ou não têm ovários (remoção cirúrgica, quimioterapia, radioterapia).

Nos inícios de 2001, publicamos um artigo no qual se demonstra que em vez de clonar pessoas para tratar a esterilidade, se poderia usar antes as técnicas da clonagem para tornar uma célula somática, adulta e diferenciada, numa célula germinal. Ainda não passamos à fase clínica uma vez que estas técnicas, apesar do sucesso que tivemos, apresentem os mesmos riscos dos da clonagem. Assim, há primeiro que estudar se estes gâmetas artificiais e os embriões deles derivados não originam doenças. Esperemos que consigamos uma confirmação positiva dos sucessos nos próximos anos, pois daríamos oportunidade de fabricar gâmetas femininos e masculinos a quem não os têm, evitando-se a corrida impensada à clonagem somática como falsa reprodução, e terminando definitivamente com a necessidade da doação de gâmetas ou embriões.

## Diagnóstico Genético Pré-Implantação

O DGPI foi criado em Londres em 1991, mas só passou a ser aplicado desde 1995. Após ter ajudado a montar essa técnica nesse ano na Holanda, o grupo do Porto introduziu o DGPI em Portugal no ano de 1997 após formar uma equipe de genética molecular.

O DGPI permite seleccionar embriões que não possuam doenças hereditárias de que seus pais têm elevado risco de transmitir, pex: trissomia 21 (mongoloidismo), translocações, síndrome de Klinefelter (rapazes 47XXY em vez de serem 46XY), aneuploidias (causadoras de abortamentos de repetição; mulheres com mais de 37 anos), doenças ligadas ao cromossoma X (atraso mental, distrofia muscular, hemofilia), doenças ligadas ao cromossoma Y (homens sem espermatozóides no sémen), fibrose cística, doença de Huntington, talassemias, para-amiloidose, doença de Tay-Sachs, etc.

Nesta técnica, os embriões são produzidos por ICSI. Ao 3º dia, quando os embriões têm 8 células, fazemos uma microcirurgia de modo a retirar 2 células. Estas são então analisadas geneticamente, de modo que só se transferem para o útero os embriões sem doença. Assim, deixa de ser necessário a interrupção voluntária da gravidez por doença fetal grave, e deixam de nascer crianças com deficiências graves. Em média, são precisas 4 tentativas para se conseguir engravidar por este método, mas vale a pena. No futuro próximo (5 anos), iremos aceitar pedidos para evitar a transmissão de cancro hereditário (mama, cólon, estômago). No futuro mais longínquo, a selecção embrionária poderá envolver as doenças cardiovasculares, a diabetes, a asma, etc.

## Útero de Aluguer

Destina-se primariamente aos casais em que a parceira não possui útero (malformações uterinas congénitas; remoção cirúrgica do útero por tumor ou rotura).

Pode também ser utilizado nos casais homossexuais, nos indivíduos masculinos só e nas mulheres que não desejam engravidar.

## Clonagem somática

O primeiro sucesso com experiências de clonagem somática foi obtida em 1996 com recurso a células somáticas adultas oriundas da glândula mamária de uma ovelha (células dadoras), e que foram fundidas através de pulsos eléctricos (electrofusão) com ovócitos removidos dos ovários de uma outra ovelha e às quais se retirou previamente o material genético que continham (células receptoras). Desta electrofusão, o material genético da célula dadora, por motivos ainda

desconhecidos, readquiriu as capacidades de uma célula jovem (ou embrionária), dividiu-se e originou um “embrião somático”. Quando esse “embrião somático” foi colocado no útero de uma outra ovelha (mãe de aluguer), implantou, originou um feto viável e finalmente nasceu a ovelha Dolly. Esta experiência decorreu na Escócia, e o sucesso levou mais de vinte anos de investigação num imenso laboratório com fundos essencialmente privados. O 1º ratinho clonado também com células somáticas nasceu em 1998, utilizando-se como células dadoras as células que recobriam os ovócitos (células foliculares), e utilizando-se a microinjecção em vez da electrofusão. De seguida, conseguiu-se o mesmo com vacas, cabras, porcos e macacos.

A clonagem somática refere-se, pois, à técnica de criar um novo ser vivo a partir de uma célula somática removida do corpo de um animal já nascido. Uma célula somática é toda aquela que não é uma célula germinial. As células germinais são os gâmetas (os ovócitos na mulher e os espermatozóides no homem), enquanto que as células somáticas são todas as outras que formam o nosso corpo (sangue, ossos, músculos, pele, glândulas, pulmões, fígado, intestinos, rins, cérebro, etc.). Os gâmetas fundem-se na fertilização, e da união dos dois materiais genéticos origina-se um embrião. Quando esse embrião consegue implantar no útero e originar um feto, as células embrionárias diferenciam-se em células somáticas, cada uma específica de um órgão. Apesar de todas as células possuírem a mesma informação genética, quando se transformam em células diferenciadas só executam a função do órgão em que se localizam.

A clonagem somática animal tem objectivos muito concretos para além do puro saber. Esse objectivos passam por se cultivar *in vitro* as células somáticas para lhes introduzir genes específicos. Só depois essas células somáticas serão clonadas nos citoplastos. Deste modo, os embriões somáticos têm esse gene em todas as suas células, e esse gene também estará presente em todas as células do animal que nascer. Por este método, já se criaram vacas que libertam para o leite certas substâncias específicas, nomeadamente medicamentos. Como elas produzem enormes quantidades de leite, esses medicamentos tornar-se-ão mais baratos (insulina, factor de crescimento, factores da coagulação para hemofílicos, etc.). Outros leites possuirão nutrientes e vacinas importantes e poderão ajudar a alimentar e a defender crianças em situações de pobreza e miséria extrema. Por outro lado, como o porco tem órgãos com anatomia parecida com a nossa, os porcos obtidos por clonagem somática poderão vir a servir como dadores de

órgãos para transplante, uma vez que o porco clonado levará um gene especial que evitará a rejeição dos seus órgãos pelos humanos.

O grande problema técnico actual da clonagem somática reside no desconhecimento de como o citoplasto consegue tornar de novo totipotente e indiferenciado o material genético da célula somática adulta e diferenciada. E como desconhecemos esses mecanismos, o sucesso da clonagem somática é actualmente realizado por tentativa e erro. Por exemplo, foi preciso criar e transferir cerca de 1000 embriões somáticos de ovelha até um ter realmente a capacidade de originar a Dolly. Actualmente, esta taxa baixou para 1/500 ou mesmo 1/300. Tal não teria importância se todos os outros embriões não fossem capazes de implantar. Porém, muitos implantam e originam ou morte fetal, ou cancro da placenta, ou fetos com malformações anatómicas e genéticas graves e fatais (monstros).

O outro grande problema actual da clonagem somática diz respeito ao envelhecimento. Sabe-se já que de cada vez que uma célula se divide para manter os órgãos intactos ao longo da vida do animal, o material genético vai acumulando erros. São esses erros que estão na origem de certos tipos de cancro e do envelhecimento. Na realidade, qualquer célula somática de um animal já percorreu um longo caminho, no qual se inscrevem milhares de divisões celulares, desde o embrião inicial até ao órgão em que vive. Por isso, qualquer célula somática já é muito idosa em relação à célula de embrião natural concebido pela fecundação. Por isso, quando colocamos o material genético de uma célula somática no citoplasto, o embrião que se forma não é tão jovem, o que explica as anomalias e o envelhecimento precoce da Dolly, ou a longevidade descontrolada das vaquinhas americanas.

Estas técnicas são de aplicação fácil aos humanos. Porém, não são para já permitidas por vários motivos:

1º. Só se pode aplicar uma técnica em Medicina quando se conhece em detalhe o seu mecanismo e quando as experiências em animais não mostram qualquer risco.

2º. Qual a razão para efectuar uma cópia de um ser humano já existente ou falecido? E como se legislará em relação à identidade?

3º. mesmo em relação aos casais inférteis, clonar um deles não é reprodução, pois o embrião não resulta da fusão do material genético do pai e da mãe mas provém somente de um deles.

Como acima explicado, enquanto a clonagem somática for uma técnica que procede por tentativa e erro, devido ao desconhecimento dos mecanismos envolvidos, é totalmente inaceitável a sua aplicação à espécie humana. É inaceitável porque tanto podemos ter sorte e nenhum embrião anormal implantar ou implantar apenas um embrião normal, como podemos ter azar e originar um cancro, um feto morto, ou um feto com malformações. É também inaceitável porque, e pelos mesmos motivos, poderemos ter a sorte de obter um bebé normal, como poderemos sem querer originar uma criança com doenças graves ou envelhecimento precoce. Tem sido norma médica nunca aplicar aos humanos qualquer tecnologia que ainda não dominamos, quer na sua execução, quer nas suas consequências, ou em que previamente se demonstrou dar problemas nos animais de laboratório.

## Terapia Genética

Foi sempre um grande sonho do Homem conseguir que uma célula diferenciada pudesse voltar à fase embrionária, de modo que pudessemos criar no laboratório tecidos e órgãos para transplante. Porém, ainda não o sabemos fazer. Quando o conseguirmos, já não será necessário usar ovócitos nem criar embriões. Envolve basicamente três tipos de objectivos e tecnologias.

Uma, é a que se denomina de **terapia genética somática**. Nesta, faz-se uma biópsia de um órgão doente para isolarmos as suas células, que são então modificadas geneticamente in-vitro de forma que se tornem saudáveis. Depois, poderemos injectá-las nos órgãos doentes, para a curar a doença.

A outra hipótese é a da **indiferenciação-diferenciação**. Nesta, far-se-á uma biópsia de um tecido normal, para isolar e cultivar as células, e torná-las de novo jovens, imortais e indiferenciadas in-vitro. Depois, teremos de conseguir induzir a sua diferenciação em células específicas de tecido, de modo a se fabricarem in-vitro tecidos diferentes para uso em transplantes.

A terceira metodologia, denomina-se **terapia genética germinal**. Nesta, não se biopsia um tecido somático mas o tecido germinal (ovário, testículo). As células-mãe dos gâmetas poderiam então ser alteradas geneticamente, pelo que os descendentes (os bebés) já não apresentariam as doenças genéticas dos pais. A mesma tecnologia, aplicada a casais sem problemas genéticos, poderia permitir a construção de uma nova espécie sem doenças importantes, como também

uma espécie para sempre jovem, bonita, forte, inteligente, saudável, imortal. Mas, para já, tudo isto ainda é ficção, apesar destas experiências já estarem em curso.

Algo diferente do da clonagem somática, mas também do da terapia genética somática ou germinal, é o que se tenta fazer com a **clonagem terapêutica**. Nesta técnica, usam-se não células de tecidos adultos mas células de embriões. Esta ideia surgiu porque, actualmente, não se sabe como tornar uma célula adulta numa célula jovem, e também para não se correr o risco de se usar um material genético usado e envelhecido como na clonagem somática. Na realidade, a clonagem terapêutica não é uma clonagem no sentido de se produzirem embriões para se obterem gravidezes, mas no sentido de se multiplicar in-vitro o número dessas mesmas células embrionárias. Como as células dos embriões têm a capacidade de se diferenciarem em qualquer tecido, em primeiro lugar tornamo-las imortais para conseguirmos, por multiplicação das mesmas, obter uma grande quantidade de células iguais. Depois, como é mais fácil induzir a sua diferenciação em um qualquer tecido, ficamos na esperança de os poder produzir mais atempadamente e depois os vender para transplantes. Esta tecnologia também permitirá modificar in-vitro geneticamente essas células, de modo que elas poderão ser também utilizadas em programas de terapia genética de tipo somática, após a sua diferenciação in-vitro no tecido-alvo, como também poderão ser clonadas em citoplastos ou em embriões precoces, para efeitos de terapia genética de tipo germinal.

1. TESARIK, J., SOUSA, M. and TESTART, J. (1994). Human oocyte activation after intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.* **26**: 511-518.
2. TESARIK, J. and SOUSA, M. (1994). Comparison of  $Ca^{2+}$  responses in human oocytes fertilized by subzonal insemination and by intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril.* **62**: 1197-1204.
3. SOUSA, M. and TESARIK, J. (1994). Ultrastructural analysis of fertilization failure after intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.* **9**: 2374-2380.
4. TESARIK, J. and SOUSA, M. (1995). More than 90% fertilization rates after intracytoplasmic sperm injection and artificial induction of oocyte activation with calcium ionophore. *Fertil. Steril.* **63**: 343-349.
5. TESARIK, J., SOUSA, M. and MENDOZA, C. (1995). Sperm-induced calcium oscillations of human oocytes show distinct features in oocyte center and periphery. *Molec. Reprod. Develop.* **41**: 257-263.
6. TESARIK, J. and SOUSA, M. (1995). Key elements of a highly efficient intracytoplasmic sperm injection technique:  $Ca^{2+}$  fluxes and oocyte cytoplasmic dislocation. *Fertil. Steril.* **64**: 770-776.
7. SOUSA, M., BARROS, A. and TESARIK, J. (1996). The role of ryanodine-sensitive calcium stores in the calcium-oscillation machine of human oocytes. *Mol. Hum. Reprod.* **2**: 265-272.
8. TESARIK, J. and SOUSA, M. (1996). Mechanism of calcium oscillations in human oocytes: a two-store model. *Mol. Hum. Reprod.* **2**: 383-386.
9. SOUSA, M., BARROS, A., MENDOZA, C. and TESARIK, J. (1996). Effects of protein kinase C activation and inhibition on sperm-, thimerosal-, and ryanodine-induced calcium responses of human oocytes. *Mol. Hum. Reprod.* **2**: 699-708.
10. SOUSA, M., BARROS, A. and TESARIK, J. (1996). Human oocyte activation after intracytoplasmic injection of leucocytes, spermatocytes and round spermatids: comparison of calcium responses. *Mol. Hum. Reprod.* **2**: 853-857.
11. SOUSA, M., BARROS, A. and TESARIK, J. (1996). Developmental changes in calcium dynamics, protein kinase C distribution and endoplasmic reticulum organization in human preimplantation embryos. *Mol. Hum. Reprod.* **2**: 967-977.
12. SOUSA, M., BARROS, A., SILVA, J. and TESARIK, J. (1997). Developmental and cell-cycle-related changes in calcium content of ultrastructurally distinct subcellular compartments of preimplantation human embryos. *Mol. Hum. Reprod.* **3**: 83-90.
13. BARROS, A., SOUSA, M., SILVA, J., ALMEIDA, V. and ROCHA, E. (1997). Aging, hyaluronidase removal of the cumulus, and microinjection do not affect the sperm binding potential of human oocytes. *J. Assisted Reprod. Genetics* **14**: 97-101.
14. BARROS, A., SOUSA, M., OLIVEIRA, C., SILVA, J., ALMEIDA, V. and BEIRES, J. (1997). Pregnancy and birth after intracytoplasmic sperm injection with totally immotile sperm from the ejaculate. *Fertil. Steril.* **67**: 1091-1094.

15. SOUSA, M., BARROS, A., MENDOZA, C. and TESARIK, J. (1997). Role of  $Ca^{2+}$  oscillations during human preimplantation embryo development. *Ass. Reprod. Rev.* **7**: 139-150.
16. BARROS, A., SOUSA, M., ANGELOPOULOS, T. and TESARIK, J. (1997). Efficient modification of intracytoplasmic sperm injection technique for cases with total lack of sperm movement. *Hum. Reprod.* **12**: 1227-1229.
17. SOUSA, M., BARROS, A. and TESARIK, J. (1998). Current problems with spermatid conception. *Hum. Reprod.* **13**: 255-258.
18. BARROS, A., SOUSA, M., ANDRADE, M. J., OLIVEIRA, C., SILVA, J. and BEIRES, J. (1998). Birth after electroejaculation coupled to intracytoplasmic sperm injection in a gun-shot spinal-cord injured man. *Arch. Androl* **41**:5-9.
19. SOUSA, M., BARROS, A., MENDOZA, C. and TESARIK, J. (1998). Activation of the oocyte  $Ca^{2+}$  signalling. In: *Oocyte in vitro maturation and fertilization in the human*. *Proc. Univ. Bologna*, 37-41.
20. TESARIK, J., SOUSA, M., GRECO, E. and MENDOZA, C. (1998). Spermatids as gametes: indications and limitations. *Hum. Reprod.* **13** (Suppl. 3): 89-111.
21. BERNABEU, R., CREMADES, N., TAKAHASHI, K. and SOUSA, M. (1998). Pregnancy after elongated spermatid injection. *Hum. Reprod.* **13**: 1898-1900.
22. SOUSA, M., BARROS, A., TAKAHASHI, K., OLIVEIRA, C., SILVA, J. and TESARIK, J. (1999). Clinical efficacy of spermatid conception. Analysis using a new spermatid classification scheme. *Hum. Reprod.*, **14**: 1279-1286.
23. CREMADES, N., BERNABEU, R., BARROS, A. and SOUSA, M. (1999). *In vitro* maturation of round spermatids using coculture on Vero cells. *Hum. Reprod.*, **14**: 1287-1293.
24. SOUSA, M. and BARROS, A. (1999). How to prepare biopsed testicle samples from non obstructive patients, how to establish the anatomopathologic diagnosis in the fresh testicular tissue, and how to recognize, culture and microinject immature spermatids. *ASEBIR*, **4**: 6-14.
25. CREMADES, N., BERNABEU, R., BARROS, A. and SOUSA, M. (1999). Structured review of international studies on spermatid microinjection in non-obstructive azoospermia. The Spanish experience. *IberoAmerican Fertility J.*, **16**: 369-374.
26. WINDT, M.-L., BARROS, A. and SOUSA, M. (2000). The intracytoplasmic sperm injection technique: pitfalls and essentials. In: *Ultrastructure of Human Oocytes*, M. El.Shafie et al. (eds), Parthenon Publishing Group, New York and London, pp. 51-63.
27. SOUSA, M., BARROS, A. and EL-SHAFIE, M. (2000). Failed fertilization *in vitro*: principles and evaluation of transmission electron microscopic images. In: *Ultrastructure of Human Oocytes*, M. El.Shafie et al. (eds), Parthenon Publishing Group, New York and London, pp. 65-82.
28. EL-SHAFIE, M., WINDT, M.-L., KITSHOFF, M., MCGREGOR, P., SOUSA, M., WRANTZ, P.A.B. and KRUGER, T.F. (2000). Ultrastructure of human oocytes: a transmission electron microscopic view. In: *Ultrastructure of Human Oocytes*, M. El.Shafie et al. (eds), Parthenon Publishing Group, New York and London, pp. 83-173.

29. EL-SHAFIE, M., KITSHOFF, M., MCGREGOR, P., WRANTZ, P.A.B., KRUGER, T.F. and SOUSA, M. (2000). Materials and methods for single-cell transmission electron microscopy of the human oocyte. In: *Ultrastructure of Human Oocytes*, M. El-Shafie et al. (eds), Parthenon Publishing Group, New York and London, pp. 175-182.
30. CREMADES, N., SILVA, J., ALVES, C., BERNABEU, R., BARROS, A. and SOUSA, M. (2000). Genetical and developmental potential of germinal vesicle stage human oocytes matured *in vitro*. *IberoAmerican Fertility J.*, **17**: 1-8.
31. SOUSA, M., FERNANDES, S. and BARROS, A. (2000). Prognostic factors for successful testicle spermatid retrieval. *Mol. Cell Endocrinol.*, **166**: 37-43.
32. HEYERS, S., SOUSA, M., CANGIR, O., SCHMOLL, F., SCHELLANDER, K., van der VEN, H. and MONTAG, M. (2000). Activation of mouse eggs requires multiple sperm factors but not sperm PLC I. *Mol. Cell Endocrinol.*, **166**: 51-57.
33. BARROS, A. and SOUSA, M. (2000). IFFS surveillance 98. The Portuguese ART Centers Data. *Fertil. Steril.* **73**: 1064-1065.
34. CREMADES, C., SOUSA, M., BERNABEU, R. and BARROS, A. (2001). Developmental potential of elongating and elongated spermatids obtained after *in-vitro* maturation of isolated round spermatids. *Hum. Reprod.*, **16** (9), 1938-1944.
35. SOUSA, M., CREMADES, C., ALVES, C., SILVA, J. and BARROS, A. (2001). Developmental potential of human spermatogenic cells cocultured with Sertoli cells. *Hum. Reprod.*, **16**, (in press).
36. SOUSA, M., CREMADES, C., SILVA, J., OLIVEIRA, C., FERRAZ, L., TEIXEIRA DA SILVA, J., VIANA, P. and BARROS, A. (2001). Report on 234 consecutive treatment cycles in non-obstructive azoospermia. Predictive value of testicular histology and clinical outcome after microinjection of fresh and frozen-thawed sperm and spermatids. *Hum. Reprod.*, **16**, (in press)
37. WINDT, M.-L., KITSHOFF, M., MCGREGOR, P., SOUSA, M. and KRUGER, T.F. (2001). An ultrastructural study of a resistant and recidivant oocyte metaphase I arrest case. *Hum. Reprod.*, **16**, (in press)
38. KAMP, C., HUELLEN, K., FERNANDES, S., SOUSA, M., SCHLEGEL, P.N., MIELNIK, A., KLEIMAN, S., YAVETZ, H., KRAUSE, W., KUPKER, W., JOHANNISSON, R., SCHULZE, W., WEIDNER, W., BARROS, A. and VOGT, P.H. (2001). High deletion frequency of the complete AZFa sequence occurs only in men with complete germ cell aplasia (Sertoli-cell-only-syndrome). *Mol. Hum. Reprod.*, **7** (10), 987-994.
39. CARVALHO, F., SOUSA, M., FERNANDES, S., SILVA, J., BRAGA, J., GONÇALVES, J., SARAIVA, M.J. and BARROS, A. (2001). Preimplantation genetic diagnosis for familial amyloidotic polyneuropathy. *Prenatal Diagnosis*, december, (in press).
40. FERNANDES, S., HUELLEN, K., GONÇALVES, J., DUKAL, H., ZEISLER, J., DE MEYTS, E.R., SKAKKEBAEK, N.E., HABERMANN, B., KRAUSE, W., SOUSA, M., BARROS, A. and VOGT, P.H. (2001). DAZ gene deletions in fertile men and in patients with severe oligozoospermia point to a requirement of DAZ1 in human spermatogenesis. *Mol. Hum. Reprod.*, (submitted).
41. SOUSA, M., CREMADES, C., ALVES, C., FERNANDES, S., CARVALHO, F., SILVA, J. and

- BARROS, A. (2001). Effects of rFSH and testosterone on isolated human Sertoli-spermatogenic cell cocultures. *Hum. Reprod.*, (**submitted**).
42. ALVES, C., CARVALHO, F., CREMADES, N., SOUSA, M. and BARROS, A. (2001). Unique (Y;13) translocation in a male with oligozoospermia. Cytogenetic and molecular studies. *Eur. J. Med. Genet.*, (**submitted**).
43. TESARIK, J., NAGY, Z.P., SOUSA, M., MENDOZA, C. and ABDELMASSIH, R. (2001). Fertilizable oocytes reconstructed from patients somatic cell nuclei and donor ooplasts. *Reprod. BioMed. Online*, 2 (3), 160-164.