CLONAGEM & CÉLULAS ESTAMINAIS

1. Fertilização e Desenvolvimento Embrionário

Na espécie humana, a gónada feminina (ovário) produz os gâmetas femininos (ou ovócitos) e a gónada masculina (testículo) produz os gâmetas masculinos (ou espermatozóides) [4,14,39,69]. O ovócito possui uma camada externa protectora denominada zona pelúcida (ZP). A principal diferença existente entre os gâmetas e as restantes células do organismo (ou células somáticas) reside no número de cromossomas. As células somáticas são diplóides (46 cromossomas: 46,XX na mulher e 46,XY no homem), enquanto que os gâmetas são haplóides (23 cromossomas: 23,X nos ovócitos; 23,X ou 23,Y nos espermatozóides). A razão de ser da formação dos gâmetas é a fecundação, processo que culmina na formação de um embrião diplóide por junção dos 23 cromossomas maternos e dos 23 cromossomas paternos.

A fecundação (Fig. 1) inicia-se quando a membrana de um espermatozóide se funde com a membrana de um ovócito (na fecundação normal ou na fecundação in vitro) ou quando o espermatozóide é micro-injectado no interior de um ovócito [20,46,58].

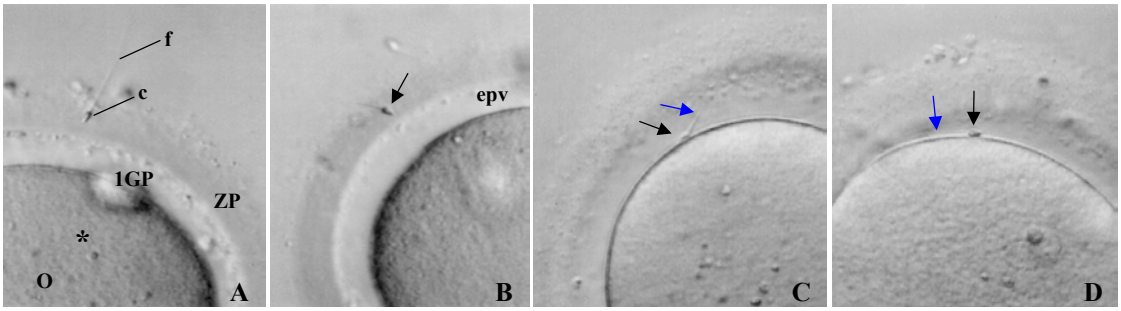

Figura 1. (**A**) Ligação à ZP. (**B**) Penetração da ZP. (**C**) Entrada no espaço perivitelino (entre a ZP e a membrana do ovócito). (**D**) fusão entre as membranas dos gâmetas. Quando a cabeça do espermatozóide (c; seta preta) toca na membrana do ovócito (oolema), o flagelo (f; seta azul) perde a mobilidade e o espermatozóide queda imóvel e paralelo à membrana do ovócito.

A fecundação desencadeia a activação do ovócito, a qual se caracteriza por uma sucessão temporal de diferentes etapas: (a) defesa contra a entrada de novos espermatozóides (bloqueio contra a polispermia); (b) activação do metabolismo celular e da absorção de nutrientes; (c) formação do pronúcleo feminino contendo os cromossomas maternos e do pronúcleo masculino contendo os cromossomas paternos [26,40-46,59,62,63].

Quando se formam os dois pronúcleos com extrusão do segundo glóbulo polar (8-12h após a fecundação), o ovócito fecundado denomina-se zigoto (Fig. 2).

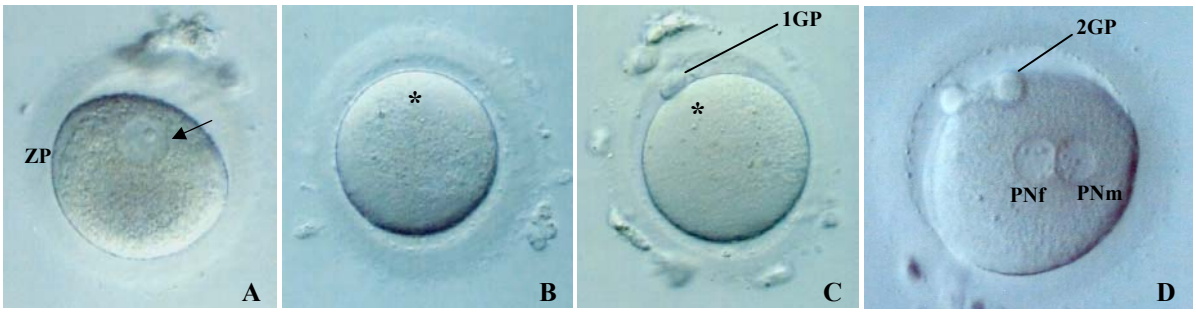

Figura 2. Maturação do ovócito humano. (**A**) Profase I. O núcleo (VG: vesícula germinal) contém 2N4C cromossomas (2N: dois cromossomas homólogos; 4C: cada homólogo está replicado e contém dois cromatídeos). (**B**) Metafase I (MI). A VG perdeu o invólucro nuclear e os 46 cromossomas encontram-se numa placa metafásica (*). (**C**) Metafase II (MII). Como resultado da primeira divisão meiótica, deu-se a segregação dos homólogos com extrusão do 1º glóbulo polar (1GP). Os 23 cromossomas (23,X) que ficam no ovócito encontram-se numa placa metafásica (*). Quer o 1GP quer o MII contêm 1N2C (um homólogo, cada um com dois cromatídeos). É na fase MII que o ovócito humano é ovulado. (**D**) Após a fecundação, o ovócito retoma e termina a segunda divisão meiótica, com segregação dos cromatídeos e extrusão do 2º glóbulo polar (2GP), e formação dos pronúcleos materno (23,X: 1N1C) e paterno (23,X ou 23,Y: 1N1C).

Os pronúcleos migram então para o centro sob orientação dos microtúbulos polimerizados pelo centríolo do espermatozóide. Aí, justapõem-se e interdigitam-se, a que se segue a fragmentação dos invólucros nucleares, permitindo deste modo a mistura entre os cromossomas maternos e paternos. Reposto o número diplóide de cromossomas (46,XX ou 46,XY), o zigoto inicia divisões mitóticas sucessivas (Fig. 3).

Ás 48h, a clivagem embrionária origina um embrião com 2-4 células (ou blastómeros). Ao 3º dia, o embrião apresenta 6-8 blastómeros, e ao 4º dia as divisões mitóticas dão origem a um embrião com mais de 12-16 blastómeros (fase de mórula). Neste processo, ocorre o fenómeno da compactação dos blastómeros e o início da cavitação. Na cavitação, os blastómeros mais externos alongam-se e transportam nutrientes e água para o interior da ZP, criando cavidades líquidas. A fecundação e o desenvolvimento embrionário até à fase de mórula ocorre naturalmente nos oviductos (ou trompas de Falópio).

Ao 5º dia, já na cavidade uterina, a mórula transforma-se num blastocisto. Neste processo, os blastómeros mais superficiais diferenciam-se numa monocamada de células alongadas que recobre a face interna da zona pelúcida e forma o trofoblasto (ou trofectoderme). Pelo contrário, os blastómeros mais internos do embrião mantêm-se redondos e acumulam-se num dos polos, dando origem à massa celular interna. A trofectoderme inicia então um maciço transporte de água e de nutrientes para o interior do embrião, dando origem a uma grande cavidade líquida, o blastocélio (ou cavidade blastocélica).

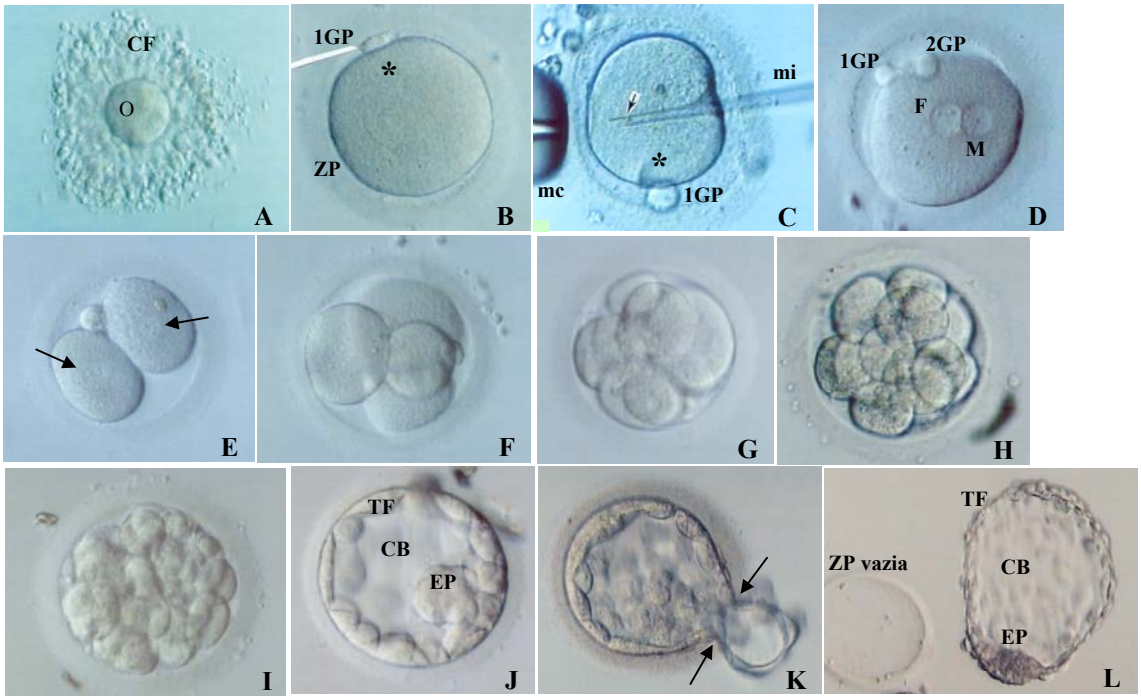

Figura 3. (**A**) Folículo ovárico com o ovócito (O) e as células foliculares (CF) que o rodeiam. (**B**) Ovócito despido das células foliculares: ZP, zona pelúcida; 1GP, primeiro glóbulo polar (meiose I); (*) zona que contém os cromossomas em metafase II. (**C**) Microinjecção: mc, micropipeta de contenção; mi, micropipeta de injecção; seta, espermatozóide na extremidade da micropipeta. (**D**) Zigoto (8-18h): 2GP, segundo glóbulo polar; F, pronúcleo feminino; M, pronúcleo masculino. (**E**) Embrião de 2 células (48h): as setas apontam para os núcleos dos dois blastómeros. (**F**) Embrião de 4 células (48h). (**G**) Embrião de 8 células (72h). (**H**) Embrião de 12 células (3-4º dia). (**I**) mórula (4º dia). (**J**) Blastocisto (5-6º dia): TF, trofectoderme; CB, cavidade blastocélica; EP, epiblasto. (**K**) Eclosão: as setas apontam para o orifício na ZP por onde o embrião eclode. (**L**) Blastocisto eclodido (6-7º dia). Imagens de microscopia invertida Hoffman tiradas sob consentimento no Centro de Genética da Reprodução Prof. Alberto Barros, Porto.

Ao 6º dia, o trofoblasto segrega uma enzima proteolítica do tipo quimotripsina que abre um orifício na zona pelúcida. A pressão enorme da cavidade blastocélica expulsa então o embrião para o exterior através desse orifício (fase da eclosão). Uma vez fora do seu invólucro, as células da trofectoderme expressam na sua membrana ligandos específicos para receptores presentes nas membranas do epitélio superficial do endométrio. A ligação entre ambos permite a adesão do blastocisto ao endométrio (fase de adesão). De seguida, o trofoblasto migra por entre as células epiteliais do endométrio, levando o embrião a invadir o tecido conjuntivo do endométrio (fase da implantação). Após a implantação, a trofectoderme origina a placenta e segrega a

βhCG, a cavidade blastocélica transforma-se na cavidade amniótica e a massa celular interna dá origem ao feto (Fig. 3).

Até à fase de 8-12 células, o embrião é constituído por células estaminais totipotentes. Células estaminais totipotentes são aquelas que, em condições laboratoriais específicas, apresentam uma capacidade de divisão ilimitada, sem senescência nem diferenciação, e que possuem a capacidade de originar de novo um embrião. Na fase de mórula, os blastómeros apresentam características de diferenciação que culminam com a formação da trofectoderme e da massa celular interna no blastocisto. Algumas das células da massa celular interna (epiblasto) apresentam características pluripotentes. Células estaminais pluripotentes são aquelas que, em condições laboratoriais específicas, apresentam uma capacidade de divisão ilimitada, sem senescência nem diferenciação, e que possuem a capacidade de originar os diferentes tecidos embrionários mas não a capacidade de originar de novo um embrião.

Após a implantação, as inter-relações complexas com os sinais maternos induzem as células estaminais pluripotentes do epiblasto a diferenciarem-se nos três principais tecidos embrionários: ectoderme, mesoderme e endoderme. Nestes tecidos as células diferenciam-se em células estaminais multipotentes, as quais apenas retêm a capacidade de poder gerar os diferentes tecidos que formam os orgãos: da ectoderme origina-se o sistema nervoso, os orgãos sensoriais, a pele e anexos (incluindo glândulas, pêlos, dentes e unhas); da mesoderme origina-se o aparelho cardiovascular, as células do sangue, os ossos, as cartilagens, os músculos, as gónadas e o tecido conjuntivo; e da endoderme formam-se os orgãos ocos, como os aparelhos respiratório, digestivo e urinário, e as glândulas anexas destes aparelhos, como a tiróide, paratiróide, fígado, vesícula biliar e pâncreas.

Após a implantação, o sistema nervoso inicia o seu desenvolvimento ao 14º dia de vida, às 8-10 semanas o embrião pós-implantação tem os orgãos definidos e denomina-se feto humano, e após os 4-5 meses de gestação (20 semanas), o sistema nervoso central possui já uma rede neuronal que permite a criação de consciência, memória e raciocínio, o que faz com que o feto interaja activamente com a mãe e o ambiente.

2. Estatuto do Embrião Humano

Para os cientistas da área da embriologia humana é difícil atribuir o início do embrião a qualquer uma das fases do desenvolvimento embrionário: fusão entre as membranas dos dois gâmetas (fecundação); formação dos pronúcleos (zigoto); mistura dos cromossomas paternos e maternos (embrião de uma célula); fase de 4-8 células em que se inicia a expressão comum dos genes maternos e paternos (3º dia); implantação (6º dia); formação do sistema nervoso (14º dia); formação dos orgãos (8-10 semanas); formação da rede neuronal (12 semanas). Existem argumentos a favor e contra em todas estas opções.

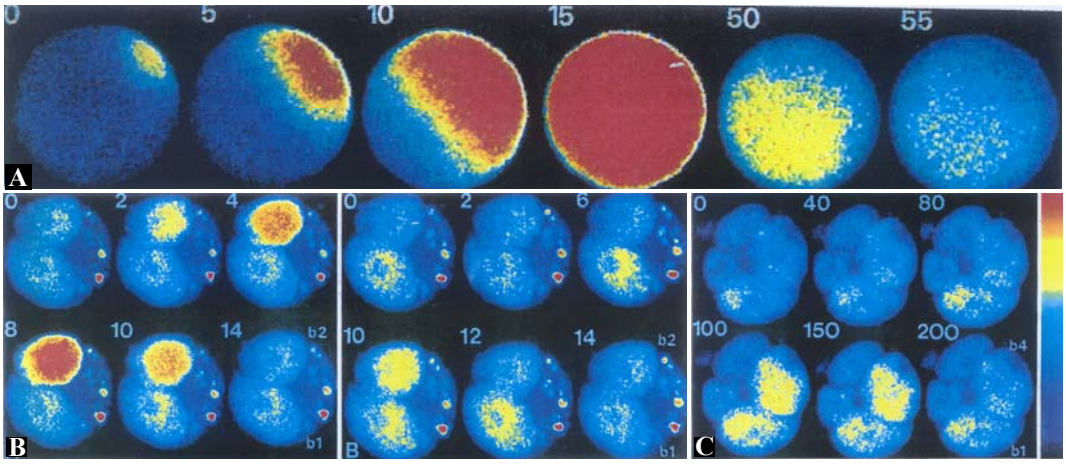

Figura 4. Aumentos cíclicos da concentração livre citosólica do ião cálcio em ovócitos e embriões humanos vivos. (**A**) A fecundação desencadeia uma onda de libertação de cálcio que se inicia no local de fusão entre os gâmetas. Esta onda activa o ovócito, repetindo-se depois de modo autónomo ao longo de todo o desenvolvimento embrionário. Embriões de 2 (**B**) e 4 (**C**) células: as ondas de cálcio nos diferentes blastómeros diferem na intensidade e no tempo. Estas ondas correspondem à linguagem dos embriões, podendo assinalar a sua viabilidade ou degenerescência. Imagens de microscopia confocal. A concentração do cálcio vai de um mínimo (azul na escala) a um máximo relativo (vermelho na escala). Os números referem-se ao tempo em segundos entre as imagens.

Na minha experiência, o programa embrionário inicia-se com a fecundação, uma vez que é a partir desse momento que surge um mecanismo novo, intrínseco e autónomo que, na ausência de patologia, culmina no desenvolvimento embrionário normal [46].

Experiências em animais e nos humanos [40-46] mostraram que os blastómeros se comportam autonomamente antes da implantação. Estes dados sugerem que o embrião pré-implantação não funciona como uma unidade, não é um indivíduo nem tão pouco permite uma consciência. Esta noção deriva das seguintes observações: (a) cada blastómero apresenta um ciclo celular relativamente independente dos outros (Fig. 4); (b) a desagregação e a separação dos blastómeros em pequenos grupos permite criar de novo vários embriões pré-implantação (Fig. 5); e (c) a remoção ou a degenerescência de uma parte dos blastómeros na fase de totipotência não impede o desenvolvimento dos restantes [3,11].

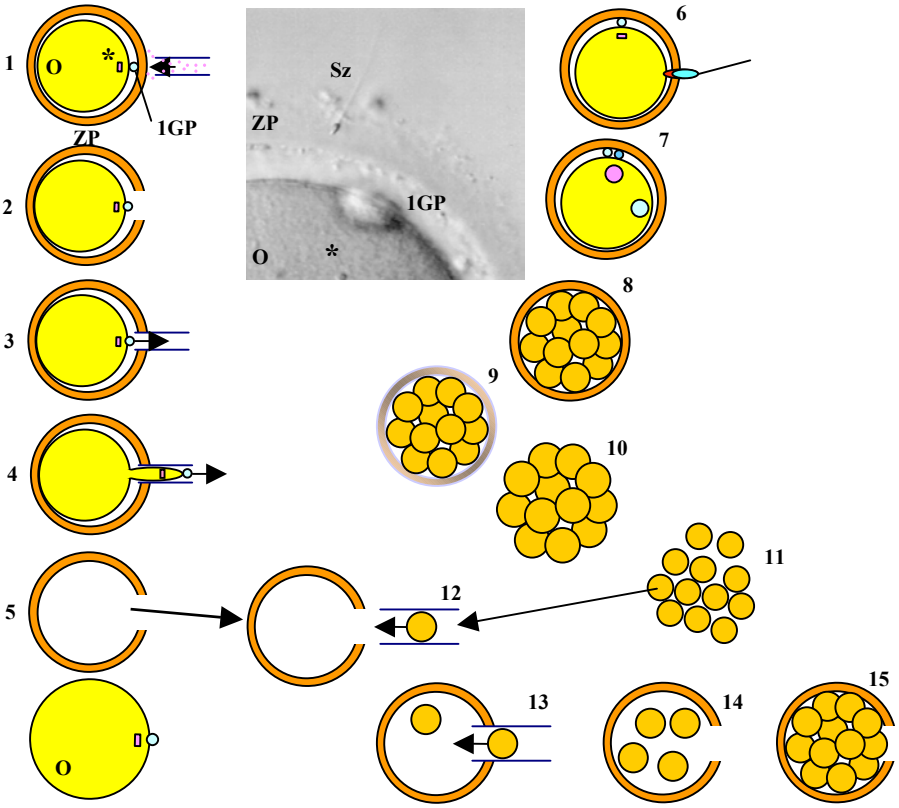

Figura 5. Partição embrionária. (**1-5**) Produção de zonas pelúcidas (ZP). De animais fêmeas não seleccionadas (matadouro), removem-se múltiplos ovócitos dos ovários e em cada ovócito (O) efectua-se uma abertura na ZP utilizando uma substância ácida contida numa micropipeta (1,2). Pelo orifício da ZP, aspira-se o ovócito com outra micropipeta (3,4), obtendo-se assim ZP vazias (5). (**6-15**) Partição embrionária. Efectua-se uma fecundação in vitro com os gâmetas de animais seleccionados (6) para obter zigotos (7) e depois embriões com 8-12 células (8). A estes, remove-se a ZP com uma protease (9,10), separando-se depois os blastómeros em meio sem cálcio (11). Dentro de cada ZP vazia, colocam-se então 4 blastómeros com a ajuda de uma micropipeta (12-14). Após cultura, os blastómeros dividem-se e reformam um novo embrião (15) geneticamente igual ao embrião original (8).

O embrião pré-implantação também não possui uma potencialidade elevada de originar um novo ser humano, já que cerca de 75-80% dos embriões pré-implantação apresentam anomalias genéticas graves que ou impedem a sua implantação ou desencadeiam o seu abortamento espontâneo precoce (Fig. 6) [3,11].

Se o embrião contém em si mesmo todo o potencial de desenvolvimento para gerar um novo ser humano, então deve a ele ser atribuído uma identidade e uma protecção legal. Porém, a potencialidade de um embrião em gerar um novo ser humano não faz dele um ser humano. De facto, em casos em que não se dispõe de mais de um embrião, podem-se separar os blastómeros para eles autonomamente recriarem dois ou mais embriões iguais entre si. Esta técnica de partição embrionária é uma reprodução laboratorial do que se passa in vivo nos casos em que ocorrem gémeos idênticos, e é um recurso que pode permitir uma gravidez em casos

muito difíceis de se atingir a concepção desejada. Assim, a partição embrionária demonstra que um embrião é apenas uma potencialidade e não um indivíduo, uma vez que de um se podem gerar vários.

Por outro lado, para além dos gâmetas, várias células têm a potencialidade de gerar embriões [16,65-67]. De facto, pode-se artificialmente gerar um embrião com potencialidade de originar um novo ser humano, sem recurso a espermatozóide, quer por manipulação química do ovócito (partenogénese com diploidização), quer por transferência nuclear somática (clonagem reprodutiva).

A potencialidade de um embrião também carece de um determinismo contextual, ou seja, o embrião poderá originar um novo ser humano só se implantar e se desenvolver normalmente. Apesar de ser apenas uma potencialidade, o meu parecer técnico é a de que todo o embrião deve ser devidamente protegido. No entanto, é também meu parecer que se o embrião humano tem um estatuto legal, então, tal como com as crianças menores, o seu destino deve ser dirigido pelos progenitores. Tal como ocorre nos transplantes, em que os indivíduos oferecem benevolamente os orgãos para salvar vidas, também os progenitores dos embriões excedentários oriundos de ciclos de tratamento deveriam ter a liberdade de, não desejando a sua criopreservação, os doar para transplante e investigação, oferecendo à humanidade a oportunidade de salvar vidas, em vez de simplesmente os deixar morrer sem fim benévolo.

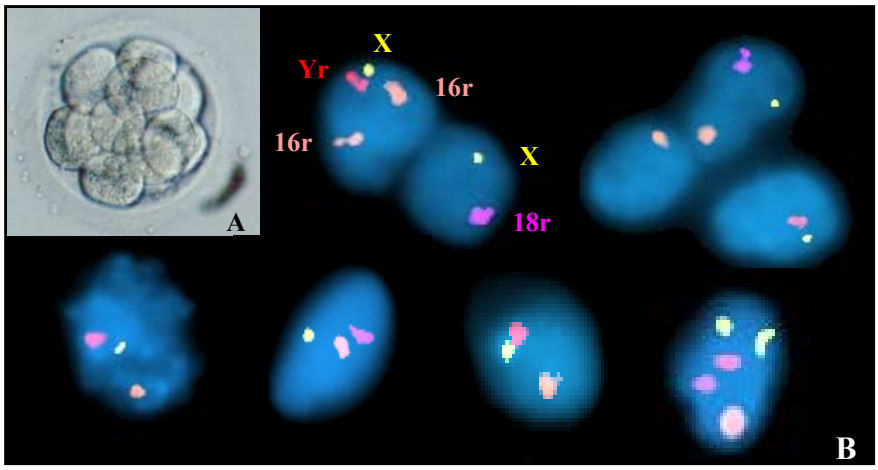

Figura 6. (**A**) Embrião de nove células (blastómeros). (**B**) Análise genética do embrião (do sexo masculino). O DNA de cada blastómero foi marcado a azul, e em cada blastómero detectou-se a presença dos dois cromossomas sexuais, X (amarelo) e Y (vermelho), e de dois cromossomas autossómicos, o 16 (laranja) e o 18 (rosa). Se cada blastómero fosse normal (diplóide), deveria apresentar um sinal vermelho (cromossoma Y), um sinal amarelo (cromossoma X), dois sinais laranja (dois cromossomas 16) e dois sinais rosa (dois cromossomas 18). Porém, no caso presente, os blastómeros são aneuplóides (veja os dois exemplos: XY,1616 e X,18 em vez de XY,1616,1818). Sempre que 2 sinais se encontrem juntos, corresponde a um só cromossoma replicado (com 2 cromatídeos).

3. Clonagem Reprodutiva

Desde há muitos anos que em veterinária se produzem animais com recurso à clonagem de células embrionárias e fetais (Fig. 7). A clonagem embrionária é mais eficiente do que a partição embrionária, pelo que é preferencialmente utilizada quando se tem um animal fêmea e/ou macho com características genéticas excepcionais que se desejam preservar. Para isso, por fecundação in vitro obtêm-se embriões a partir dos gâmetas desses animais seleccionados. A esses embriões, remove-se a zona pelúcida e separam-se os blastómeros (de embriões com 8-12 células) ou as células da massa celular interna (de blastocistos). De seguida, removem-se os cromossomas (enucleação) de ovócitos dadores recolhidos de animais de menor interesse genético para assim se produzirem citoplastos (ovócitos sem material genético). Finalmente, efectua-se uma electrofusão entre uma célula embrionária e um citoplasto, de modo que dentro do ovócito sem material genético passa a estar o conjunto diplóide de cromossomas da célula que se deseja clonar (transferência nuclear). Após a fusão, o citoplasto é activado farmacologicamente para simular as ondas de célcio da fecundação (activação). Espera-se então que ocorra a reprogramação genética do DNA e que o citoplasto se divida para originar um novo embrião. Ou seja, de um embrião original podem-se produzir, por clonagem das suas células, múltiplos embriões geneticamente iguais ao embrião original. Estes embriões são depois criopreservados para poderem ser transportados e vendidos no mercado. Depois de descongelados, são transferidos para o útero de animais fêmeas portadoras, que darão à luz animais com aquelas características

excepcionais. Esta tecnologia é muito eficiente e não origina animais doentes, pois o material genético das células embrionárias totipotente (blastómeros) ou pluripotente (epiblasto). A clonagem embrionária também pode ser aplicada a casais inférteis cuja mulher não produz mais do que 1-2 ovócitos e/ou embriões. Na clonagem fetal, o procedimento é o mesmo. Porém, como as células somáticas fetais são mais diferenciadas, é uma técnica menos eficiente.

Até ao sucesso da ovelha Dolly (Fig. 7), e apesar de inúmeras tentativas, não se conseguiam clonar células somáticas adultas, removidas de tecidos de seres vivos ou mortos, usando a transferência nuclear para citoplastos.

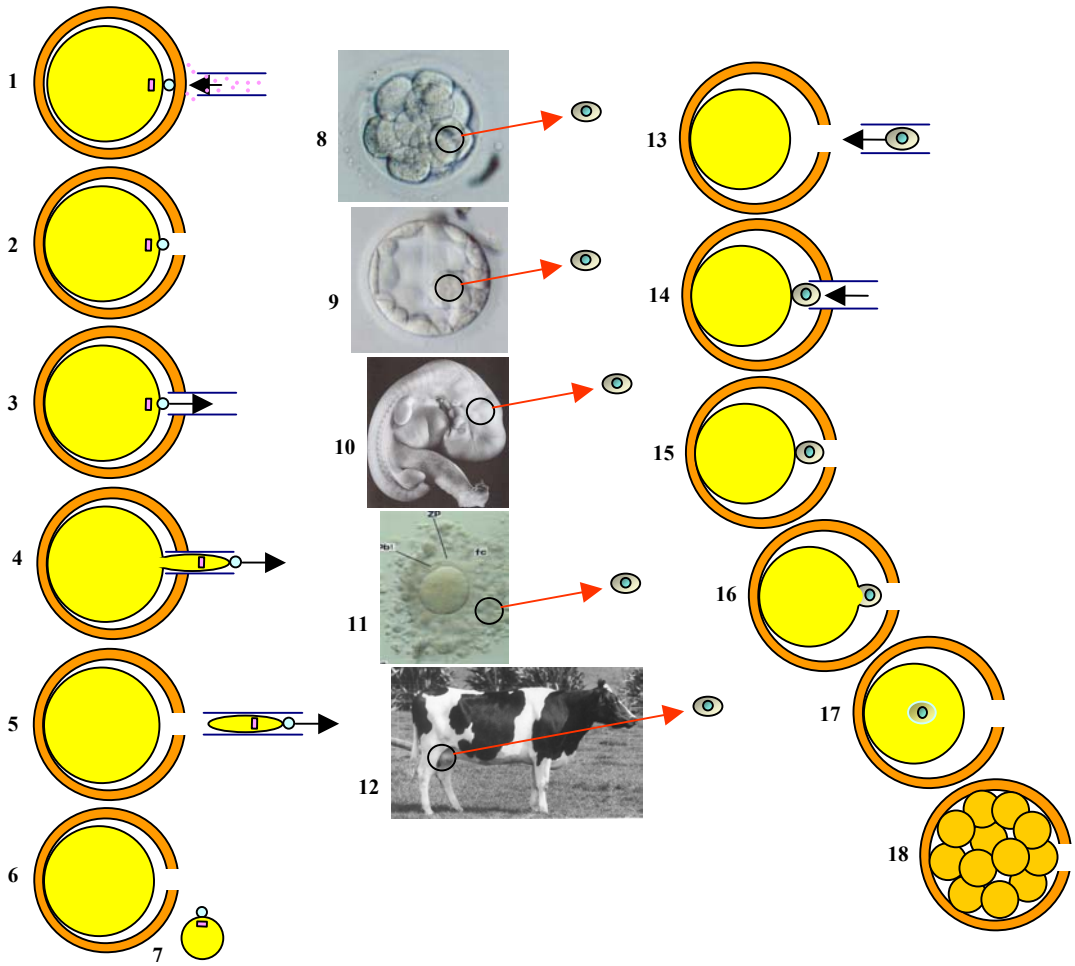

Figura 7. Clonagem embrionária, fetal e somática adulta. (**1-7**) Enucleação: de animais fêmeas não seleccionadas (matadouro), removem-se os ovócitos dos ovários e em cada efectua-se uma abertura na zona pelúcida (ZP) utilizando uma substância ácida contida numa micropipeta (1,2). O ovócito é então colocado numa solução que despolimeriza os microfilamentos submembranares. Pelo orifício da ZP, aspira-se o 1º glóbulo polar e uma pequena parte do citoplasma que lhe fica subjacente. Esta porção de citoplasma contém os cromossomas do ovócito que se encontram em metafase II (3,4). Parando a aspiração e retraíndo a micropipeta, destaca-se o citoplasma aspirado (5). Deste modo, obtém-se um ovócito sem material genético, ou citoplasto (6) e uma pequena porção de citoplasma com os cromossomas do ovócito, ou nucleoplasto (7). (**8-12**) Isolamento de blastómeros totipotentes de um embrião com 8-12 células (8), de células pluripotentes do epiblasto de um blastocisto (9), de células somáticas fetais multipotentes (10), e de células somáticas adultas, foliculares (11) e fibroblastos (12). (**13-18**) Transferência nuclear: através do orifício da ZP, a célula a clonar é colocada em contacto com a membrana do citoplasto (13-15). Por breves descargas eléctricas funde-se (electrofusão) a membrana da célula a clonar com a membrana do citoplasto (16). Deste modo, os cromossomas da célula diplóide ficam incorporados no citoplasto. O citoplasto é então activado farmacologicamente (17). Após cultura, o citoplasto reprograma o DNA transferido como se fora o DNA resultante dos pronúcleos feminino e masculino de uma fecundação normal. Deste modo, a célula divide-se e forma um embrião (18).

Só se conseguiu ultrapassar este problema [67] quando se descobriu que antes da electrofusão as células somáticas adultas tinham de ser cultivadas durante 5-7 dias em meio de cultura pobre em nutrientes de modo a obrigar a célula a diminuir o seu metabolismo e a parar a replicação do seu DNA (indução da fase G0) (Fig. 8).

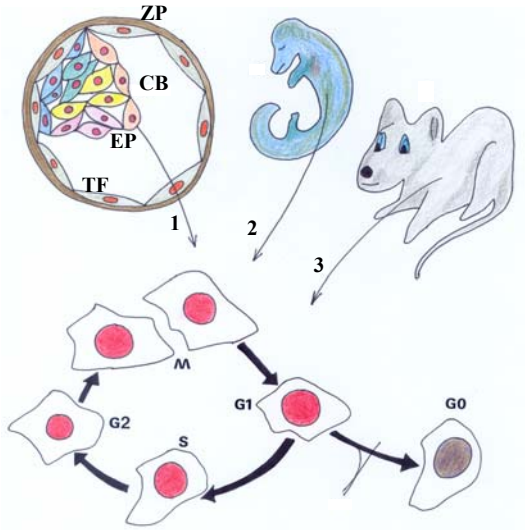

Figura 8. As células pluripotentes do epiblasto do blastocisto (1) e as células multipotentes fetais (2) podem ser clonadas de modo relativamente fácil nos citoplastos porque o seu DNA ainda se encontra muito indiferenciado. Porém, o DNA das células somáticas adultas (3) encontra-se muito modificado (são células diferenciadas) e senescente (são células mortais). Por estes motivos, a sua clonagem em citoplastos é muito ineficiente e induz neoplasias malignas, múltiplas deformidades e variadas doenças. No entanto, o aumento da eficiência técnica pode ser conseguido cultivando fibroblastos da pele em meio pobre em nutrientes. Esta cultura faz com que as células párem na fase G0 do seu ciclo celular. O ciclo celular normal compreende cinco fases: mitose (M), preparação para a replicação do DNA (G1), replicação do DNA (S) e preparação para a mitose (G2). Em G0, fase de inactivação metabólica, o DNA parece ser mais susceptível à reprogramação genética induzida pelos citoplastos. É uma situação semelhante à da fecundação, pois o DNA do espermatozóide também se encontra em G0. Porém, e apesar do DNA da célula somática adulta estar em G0, a reprogramação genética origina deficiências porque o DNA, na maioria dos casos, não perde as suas características diferenciadas e envelhecidas.

A eficiência pode ainda ser adicionalmente aumentada utilizando a técnica da reclonagem (Fig. 9). Mesmo assim, a clonagem de células somáticas adultas é muito ineficiente. Por este motivo, a clonagem de células somáticas adultas é realizada por tentativa e erro até que uma das transferências nucleares resulte num embrião, sendo a sua taxa de cerca de 17%. No entanto, na maioria dos casos, estes embriões não conseguem implantar. Por exemplo, foi preciso criar e transferir cerca de 1000 embriões-somáticos de ovelha até um conseguir originar a Dolly. Actualmente, esta taxa baixou para 1/500, 1/300 ou mesmo 1/100, consoante os laboratórios e as espécies animais.

Para além deste problema, quando ocorre implantação observam-se anomalias embrionárias, placentárias e fetais na maioria dos casos; dos animais que conseguem nascer, uma grande parte apresenta dificuldades respiratórias que rapidamente se tornam fatais; e dos que nascem aparentemente bem, todos os animais vivos acabaram por desenvolver variadas doenças (obesidade, artrite, diabetes, tumores malignos, envelhecimento precoce, longevidade descontrolada). A baixa eficiência da técnica e as anomalias encontradas são devidos à incapacidade do citoplasto em actuar eficientemente sobre o material genético da célula somática para o tornar totipotente. Esta incapacidade resulta do facto do material genético de uma célula somática adulta possuir alterações que, ao contrário das células embrionárias, o tornam diferenciado e mortal [32,68].

Nos animais, a clonagem somática adulta é vista como a melhor técnica para se obterem cópias genéticas de um animal com características excepcionais. De facto, na clonagem embrionária, em que os embriões originais derivam da fecundação in vitro, o material genético dos blastómeros não corresponde ao do animal que se deseja clonar por haver mistura com os cromossomas do outro gâmeta utilizado.

Na clonagem somática adulta, os veterinários podem alterar ou introduzir novos genes no material genético das células somáticas a clonar. Deste modo, os embriões apresentarão esse novo gene em todas as suas células, e esse gene também estará presente em todas as células do animal que nascer. Por este método, podem-se produzir animais com novas características: animais resistentes a ambientes difíceis e extremos (estepes, desertos), o que ajudaria as populações que aí vivem; animais com maior produção de leite; animais com maior produção de carne; animais com produção de leite modificado, alergénico (crianças com alergia ao leite), com suplementos vitamínicos e/ou com vacinas (para ajudar a alimentar e a defender crianças em situações de pobreza e miséria extrema); animais com secreção de medicamentos no leite, tornando a sua produção mais

barata (insulina, factor de crescimento, factores da coagulação para hemofílicos, etc.). Por outro lado, como o porco tem orgãos com anatomia parecida com a humana, os porcos obtidos por clonagem poderão vir a servir como dadores de orgãos para transplante provisório (enquanto se aguarda por um dador compatível), uma vez que o porco clonado levará um gene especial que evitará a rejeição dos seus orgãos pelos humanos. Finalmente, esta técnica também está a ser aplicada para preservar espécies animais em extinção devido à influência humana no ambiente.

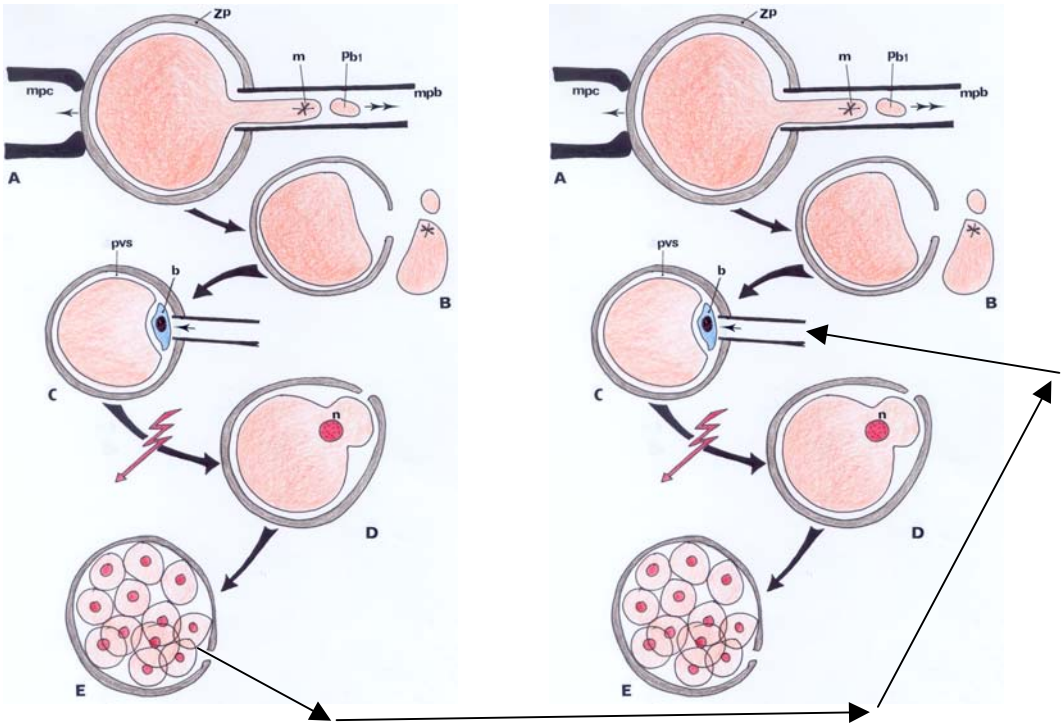

Figura 9. Reclonagem. Para se ter melhor certeza da normalidade dos embriões clonados, poder-se-ia reclonar os blastómeros dos embriões clonados que atingissem as 8-12 células. Teoricamente, um embrião que atinja as 8-12 células já sofreu reprogramação genética e o seu potencial de desenvolvimento é maior. A reclonagem em citoplastos dos seus blastómeros teria duas vantagens. Voltaria a impor uma nova selecção dos embriões e permitiria obter vários embriões na situação frequente em que apenas um embrião de 8-12 células se forma originalmente.

As células somáticas adultas mais usadas na clonagem reprodutiva animal são as células foliculares e os fibroblastos. As células foliculares já se encontram em fase G0, pelo que podem ser de imediato utilizadas. Para além disso, como são pequenas, podem ser microinjectadas no citoplasto, tornando desnecessária a electrofusão. No entanto, apenas os fibroblastos permitem a modificação genética da célula antes desta ser clonada, uma vez que sobrevivem muito bem em cultura prolongada e mantêm a capacidade de divisão celular. As células foliculares, como são de origem feminina, apenas geram animais clonados fêmeas. Já os fibroblastos permitem obter animais clonados de ambos os sexos (Fig. 7).

Alternativamente, pode-se clonar um animal com recurso à activação partenogenética, mas neste caso apenas se poderão clonar animais fêmeas (Fig. 10). Os ovócitos são ovulados em metafase II da meiose e a segunda divisão meiótica só ocorre com a fecundação, havendo então extrusão do 2º glóbulo polar e formação do pronúcleo feminino haplóide. Como o ovócito maduro é uma célula excitável [14,46,61], pode ser activado farmacologicamente sem haver fecundação (activação partenogenética). Se, após a activação, o ovócito for incubado numa solução com agentes químicos que impeçam a extrusão do 2º glóbulo polar, forma-se um pronúcleo diplóide (diploidização). Esta célula, activada partenogeneticamente e diploidizada, pode então dividir-se e originar um embrião partenogenético. Porém, a presença de 46 cromossomas todos da linha feminina origina anomalias genéticas que impedem o bom desenvolvimento embrionário, a implantação, ou condicionam anomalias fetais graves (com abortamento), e neoplasias malignas da placenta.

Figura 10. Partenogénese. (**A**) Ovócito maduro (MII: segunda metafase meiótica): camada externa protectora ou zona pelúcida (ZP); 1º glóbulo polar (1GP), no espaço perivitelino; cromossomas em metafase II (*), localizados na porção do citoplasma imediatamente sob o 1GP. (**B**) Activação partenogenética seguida de diploidização, com ausência de extrusão do 2GP e formação de um pronúcleo diplóide (seta). (**C**) Divisão da célula activada partenogeneticamente e diploidizada, com formação de um embrião partenogenético.

Na clonagem somática reprodutiva humana [65,67], o objectivo é criar um embrião somático construído por transferência nuclear do material genético de uma célula somática adulta, removida de um tecido ou orgão de uma pessoa viva ou morta, para um citoplasto. Este embrião destina-se a ser transferido para o útero de uma mulher de modo a que implante e origine um feto humano, que seria um clone genético de um ser vivo pré-existente.

Esta aplicação foi primariamente pensada para os casais inférteis com ausência de gâmetas e que não desejam utilizar gâmetas de dador. Não resultando da mistura da informação genética materna e paterna, não se trata de reprodução mas de criar uma cópia de um dos dois progenitores. Por isso, existe neste processo uma perda da diversidade entre os indivíduos.

A existência de indivíduos com a mesma identidade, iguais no aspecto externo (incluindo impressões digitais) e na constituição genética (incluindo grupos sanguíneos, grupos de histocompatibilidade, tendências e capacidades) pode, no entanto, não ser total, caso ocorram modificações espontâneas durante a reprogramação nuclear embrionária, durante a interacção materno-fetal, e devido aos factores educacionais e de relação com os outros indivíduos. Estas condicionantes podem não ser relevantes se a técnica ficar restrita ao pequeno número de pessoas com aquele tipo grave de infertilidade.

Tem-se considerado a aplicação da clonagem somática reprodutiva aos humanos como violação das disposições éticas que regulam a experimentação clínica humana, por se desconhecer o mecanismo de acção da técnica e por os testes animais indicarem riscos elevados de anomalias. Do mesmo modo, enquanto a técnica se revelar inadequada, também não devem ser aplicados para transplante os tecidos diferenciados de células embrionárias estaminais (do epiblasto) removidas de embriões obtidos por clonagem somática adulta ou por partenogénese com diploidização.

A tecnologia da clonagem somática reprodutiva humana tem sido solicitada como método de se obter um descendente com fins para além dos reprodutivos: (a) indivíduos que pensam que o novo ente, apresentando as mesmas capacidades e tendências, poderá dirigir melhor os seus negócios ou oligarquias; (b) indivíduos que, temendo uma futura doença, desejam ter nesse novo ente uma fonte para possíveis transplantes; (c) indivíduos que entrevêem no novo ente a possibilidade de se manterem imortais no tempo (prolongamento da sua vida, da sua personalidade, das suas capacidades); (d) indivíduos que, não aceitando a perda de entes queridos, tentam desse modo uma espécie de ressuscitação (recuperar um filho, a esposa ou os pais falecidos, mas também os ídolos, como Jesus, Hitler, Elvis Presley, etc); (e) indivíduos que, na ausência de dador compatível para transplante, tentam encontrar no clone de um filho gravemente doente, a possível cura deste último. Por a técnica actual da clonagem somática reprodutiva humana implicar uma gestação normal de 9 meses e o bebé necessitar na mesma de crescer pelo menos 18 anos até atingir a vida adulta, este tipo de clonagem não tem qualquer interesse nem é aplicável à formação de exércitos ou escravos desumanizados.

No momento em que a clonagem somática reprodutiva seja uma metodologia eficaz e segura, ela poderá também permitir a construção de uma espécie humana geneticamente melhorada. Neste procedimento, células somáticas adultas seriam cultivadas para as perpetuarmos e assim podermos modificar o seu genoma. Nesta manipulação genética, modificar-se-iam diversos genes de modo que a célula passasse a conter determinadas características favoráveis que correspondessem a um ser humano mais saudável (sem propensão para doenças), intelectualmente mais desenvolvido e imortal. Esta célula seria então clonada de forma a poder-se gerar um novo ser humano com aquelas características genéticas. Devido a estas alterações genómicas, o problema da perda da diversidade entre indivíduos poderia já não ser um problema.