

4. Haploidização

A haploidização, ou criação de gâmetas artificiais a partir de células somáticas adultas, foi desenvolvida pelo meu grupo de trabalho no sentido de se tentar criar gâmetas in-vitro (ovócitos e espermatozoides) para oferecer uma alternativa quer à doação de ovócitos ou de espermatozoides, quer à clonagem somática reprodutiva. Destina-se aos homens com azoospermia secretora em que a biópsia testicular não revelou a presença de espermátides e em que a cultura de células estaminais testiculares falhou ou não é possível, aos homens sem testículos (remoção cirúrgica), ou às mulheres que não produzem ovócitos (anomalias dos ovários, quimioterapia, radioterapia, menopausa) ou não têm ovários (remoção cirúrgica).

Várias experiências em animais sugerem que é possível aproveitar o estágio MII dos ovócitos para conseguir no seu ooplasma induzir a meiose de outras células. No rato, quando se microinjecta um espermátocito secundário (em profase II da meiose) num ovócito MII (metafase II da meiose: 1N2C: um conjunto haplóide de cromossomas cada um com 2 cromátides), o ooplasma rico em MPF (mitosis promoting factor) actua sobre o DNA masculino condensando os cromossomas e a eles associando um fuso. Se este constructo for artificialmente activado por impulso eléctrico (electroactivação) 2h após a microinjecção, quer o fuso MII do ovócito, quer o fuso MII do espermátocito secundário, segregam os seus cromátides, havendo extrusão de dois glóbulos polares e formação de dois pronúcleos, feminino e masculino, em 75% dos casos (Fig. 11). Destes zigotos, cerca de 65% atingiram o estágio de blastocisto que, quando transferidos, originaram em 24% dos casos uma descendência normal e fértil [29].

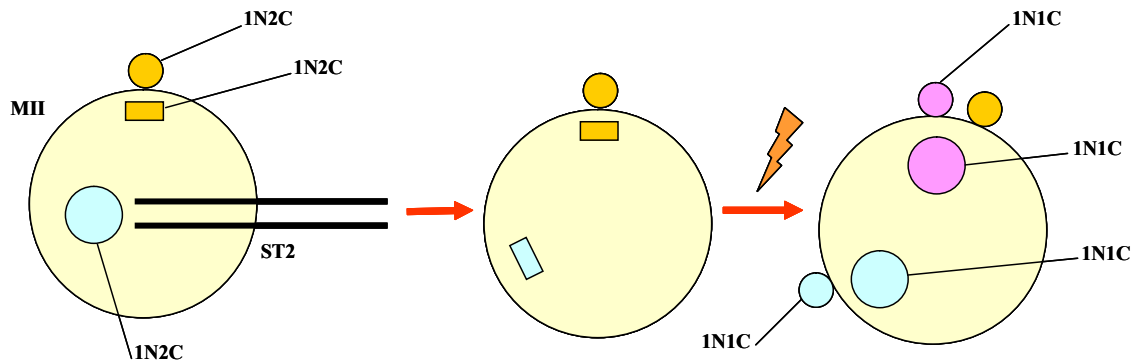


Figura 11. Transferência nuclear de espermátocitos secundários (ST2) para ovócitos MII não enucleados, seguido de activação eléctrica.

Do mesmo modo, no rato, quando se microinjecta um espermátocito primário (em profase I da meiose) num ovócito MII, o ooplasma rico em MPF actua sobre o DNA masculino condensando os cromossomas e a eles associando um fuso. Cerca de 2h depois, efectuou-se uma electroactivação e quer o fuso MII do ovócito, quer o fuso MI do espermátocito primário, segregaram os seus cromátides (ovócito) e cromossomas homólogos (espermátocito I), havendo extrusão de dois glóbulos polares (2º glóbulo polar feminino e 1º pseudo glóbulo polar masculino) e formação em 50% dos casos de dois pronúcleos, um feminino haplóide, e um masculino ainda diplóide (cada cromossoma ainda contém dois cromátides). O pseudo glóbulo polar masculino foi então microinjectado noutro ovócito MII. O ooplasma rico em MPF actuou sobre o DNA masculino (2h) condensando os cromossomas e a eles associando um fuso. Após electroactivação, os dois fusos segregaram os cromátides, havendo em 50% dos casos extrusão de dois glóbulos polares e formação de dois pronúcleos, feminino e masculino (Fig. 12). Destes zigotos, apenas 12% atingiram o estágio de blastocisto que, após transferência, originaram descendência em apenas 0.8% (2/258) dos casos, tendo os animais morrido pouco após o nascimento [37].

Estas experiências permitem pressupor que existem factores no ooplasma capazes de induzir a condensação dos cromossomas de outra célula, capazes de lhes associar um fuso meiótico, e capazes de induzir uma citocinese desigual. Supõe-se que a condensação dos cromossomas depende do MPF, mas desconhecem-se os factores que controlam a síntese do fuso e a citocinese desigual. No entanto, os maus resultados obtidos com os espermátocitos I (células germinais diplóides) sugerem que o ovócito não consegue induzir a formação de um fuso meiótico I ou que não é capaz de induzir a segregação correcta dos homólogos. De facto, a primeira

divisão meiótica, responsável pela separação dos cromossomas homólogos, necessita que se forme um cinetocoro por cromossoma de cada par de cromossomas homólogos. Pelo contrário, na segunda divisão meiótica (similar a uma mitose), responsável pela separação dos cromatídeos, forma-se um cinetocoro em cada cromatídeo do mesmo cromossoma.

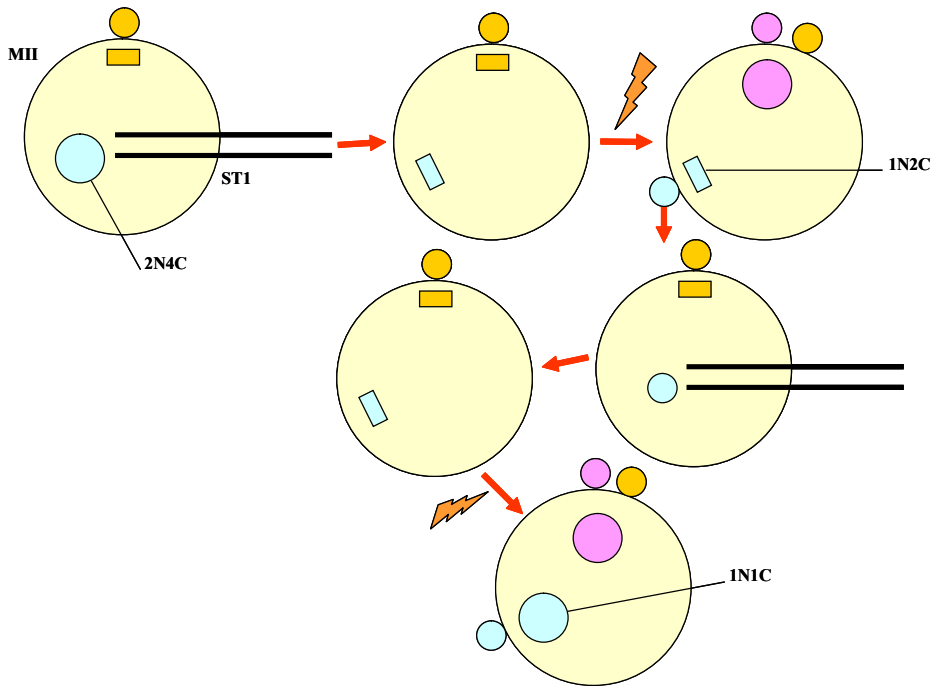


Figura 12. Transferência nuclear de espermátocitos primários (ST1) para ovócitos MII não enucleados, seguido de activação eléctrica. Transferência nuclear dos pseudo-glóbulos polares masculinos para ovócitos MII não enucleados, seguido de activação eléctrica.

Para se tentar ultrapassar este problema, decidiu-se sincronizar os estádios dos ovócitos com a profase I masculina. Fez-se então a microinjecção de espermátocitos primários em ovócitos também em profase I da meiose (estádio de vesícula germinal ou GV). Em consequência, condensaram-se os cromossomas femininos e masculinos, formou-se em 75% dos casos uma única placa metafásica I contendo ambos os cromossomas, seguindo-se a segregação conjunta dos homólogos com extrusão de um glóbulo polar e formação de um pronúcleo misto diplóide. Porém, dos embriões transferidos não se obteve qualquer descendência nos ratinhos [34].

Tentou-se então a microinjecção de espermátocitos primários em ovócitos em metafase I da meiose (estádio MI). Os cromossomas masculinos condensaram e ficaram associados a um fuso, seguindo-se a segregação dos homólogos com extrusão em 80% dos casos de um pseudo glóbulo polar e formação de uma placa metafásica II masculina. Em simultâneo, o ovócito segregou os seus cromossomas homólogos com extrusão do 1º glóbulo polar e formação da placa metafásica II feminina. Cerca de 2h depois, induziu-se a activação artificial do ovócito para simular a fecundação pelo espermatozóide (electroactivação). Em consequência, os dois fusos segregaram os cromatídeos (meiose II), havendo em 50% dos casos extrusão de dois glóbulos polares e formação de dois pronúcleos, feminino e masculino. Porém, dos embriões transferidos não se obteve qualquer descendência nos ratinhos [34].

Novamente, estes resultados sugerem que o ovócito, mesmo em profase I ou em metafase I, não consegue induzir numa célula estranha a formação de um fuso meiótico I ou de induzir a segregação correcta dos cromossomas homólogos.

Outro resultado que veio sustentar a hipótese de ser possível induzir artificialmente a meiose veio das experiências de clonagem de células somáticas adultas [66]. Durante a clonagem somática adulta do primeiro ratinho, os autores descobriram que após a microinjecção das células foliculares (células somáticas adultas em G0/G1) e a activação (1-3h após a microinjecção: 10 mM Sr^{2+} em meio sem Ca^{2+}) os ooplastos efectuavam a extrusão de um pseudo glóbulo polar. Para assegurar a diploidia do núcleo transferido, foi assim necessário

incubar as células com citocalasina B durante a activação (6h com 10 mM Sr^{2+} + 5 μ g/ml CKB em meio sem Ca^{2+}) para inibir a extrusão do pseudo glóbulo polar (Fig. 13). Conseguiram, deste modo, 93% de activação com diploidização, 12% de blastocistos e 2% de recém-nascidos.

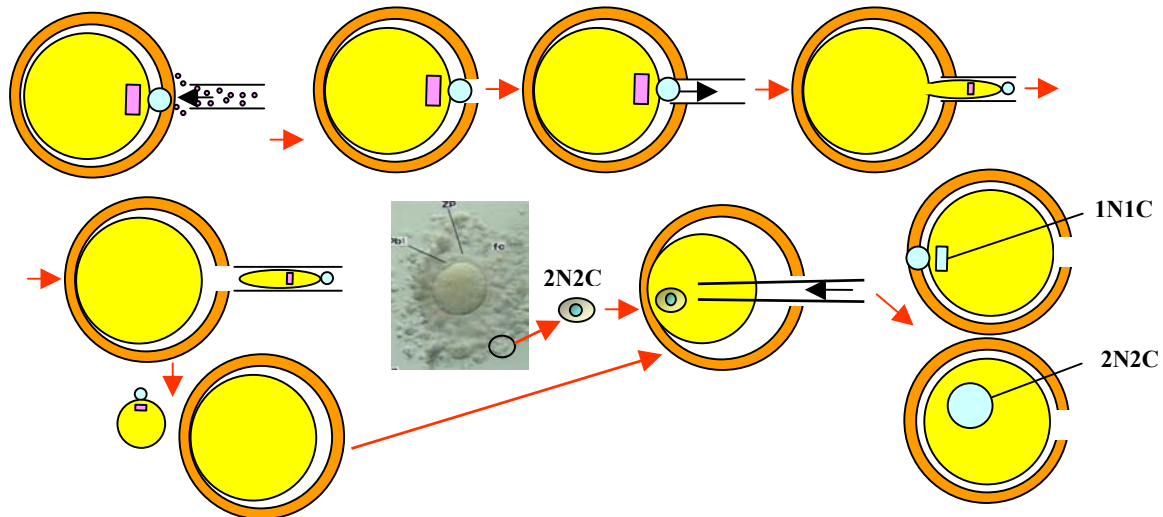


Figura 13. Transferência nuclear de células foliculares para ovócitos MII enucleados, seguida de activação. A diploidização só se consegue com inibição da citocinese.

Haploidização

Baseados nestes resultados, tentamos obter uma haploidização de células somáticas adultas com o objectivo de, caso conseguíssemos induzir *in vitro* a meiose, podermos vir a resolver o problema de infertilidade dos casais sem gâmetas, deixando assim de ser necessário o uso da doação de gâmetas ou a clonagem reprodutiva.

Para esse efeito, modificamos a técnica de clonagem. Na clonagem somática reprodutiva, os ovócitos MII são enucleados. Para isso, o ovócito é colocado numa solução de citocalasina que despolimeriza os microfilamentos submembranares e torna a sua membrana viscosa. De seguida, efectua-se uma abertura na zona pelúcida (ZP) utilizando uma substância ácida contida numa micropipeta. 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 da meiose II. Parando a aspiração e retraíndo a micropipeta, destaca-se o citoplasma aspirado. Deste modo, obtém-se um ovócito sem material genético (citoplasto, ooplasto) e uma pequena porção de citoplasma com os cromossomas do ovócito (nucleoplasto). A remoção desta porção do citoplasma não rompe o ovócito porque a viscosidade aumentada do oolema faz com que as membranas rompidas selem de imediato e de modo espontâneo. Cerca de 2-4h depois da enucleação, efectua-se a transferência nuclear. Neste processo, e através do orifício aberto na ZP, a célula somática a clonar é colocada em contacto com a membrana do ooplasto. Por breves descargas eléctricas, a célula é levada a fundir-se com a membrana do citoplasto (electrofusão). Alternativamente, a célula pode ser microinjectada directamente no ooplasto. Deste modo, os cromossomas da célula diplóide ficam incorporados no citoplasto. Nas 2-4h seguintes, espera-se que os factores do ooplasma actuem sobre o DNA exógeno, reprogramando-o e depois condensando-o numa placa metafásica. O constructo é então activado farmacologicamente (Sr^{2+} , ionoforo para o cálcio, electroactivação). Nestas condições, verificou-se haver extrusão de um pseudo glóbulo polar. Porque o objectivo da clonagem é manter a constituição diplóide do constructo, a activação efectua-se na presença de citocalasina, a qual impede a citocinese e induz, desse modo, a diploidização celular (Figs. 7, 13). Deste modo, a célula funciona como se fora possuidora de um DNA resultante dos pronúcleos feminino e masculino oriundos de uma fecundação normal, divide-se e forma um embrião [66].

Transferência nuclear de células foliculares para ovócitos MII humanos enucleados, seguida de activação por ICSI

Pelo contrário, na nossa ideia original, decidimos evitar a diploidização. Sabemos que o material genético dos ovócitos MII ainda tem que perder metade dos cromossomas, fenómeno que apenas ocorre após a fecundação pelo espermatozóide. Então, decidimos enganar duas vezes o ovócito. Em primeiro lugar, tiramos o material genético ao ovócito e colocamos dentro dele uma célula somática. O ovócito é então enganado uma vez porque reage sobre o material genético exógeno como se fosse o seu próprio material genético, induzindo a condensação dos cromossomas e desenvolvendo um fuso metafásico. De seguida, activamos artificialmente o constructo. O ovócito é então enganado uma segunda vez porque reage como se tivera sido fecundado, pelo que se observa a perda de metade dos cromossomas da célula somática, ficando apenas com 23 cromossomas. Ora, uma célula com 23 cromossomas é potencialmente um gâmeta, ovócito (se a célula somática é da mulher) ou espermatozóide (se a célula somática é do homem) (Fig. 14).

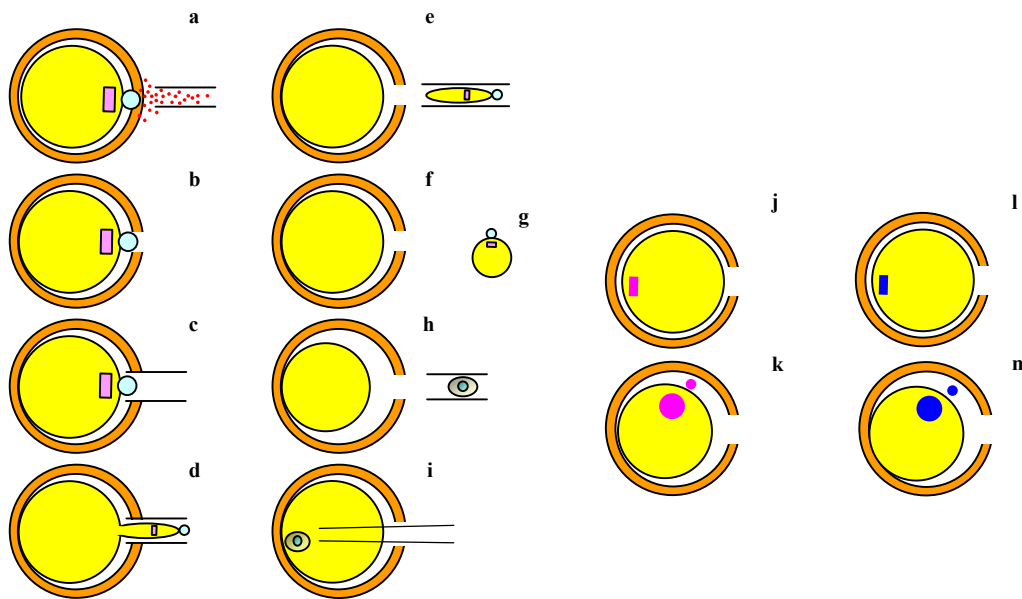


Figura 14. Transferência nuclear de células foliculares para ovócitos MII humanos enucleados, seguida de activação por ICSI. (a, b) A um ovócito dador efectua-se uma abertura na zona pelúcida (ZP) utilizando uma substância ácida contida numa micropipeta. (c, d) O ovócito é depois colocado numa solução (citocalasina B) que despolimeriza os microfilamentos submembranares (citoesqueleto). Pelo orifício da ZP, aspira-se o 1º glóbulo polar e uma pequena parte do citoplasma que lhe fica subjacente (Enucleação). Esta porção de citoplasma contém os cromossomas do ovócito. (e) Parando a aspiração e retraíndo a micropipeta, destaca-se o citoplasma aspirado. (f, g) Deste modo, obtém-se um ovócito sem material genético, ou citoplasto (f) e uma pequena porção de citoplasma com os cromossomas do ovócito, ou nucleoplasto (g). (h, i) Através do orifício da ZP, o linfócito (feminino ou masculino) é microinjectado (Transferência Nuclear) no interior do citoplasto. (j, l) Deixando o citoplasto algumas horas em repouso, os cromossomas do linfócito (j: feminino; l: masculino) condensam-se e adquirem a conformation natural do ovócito inicial (ver "a"). (k, m) O citoplasto é activado quimicamente (ionoforo de cálcio), induzindo a libertação para o exterior de metade dos cromossomas do linfócito, pelo que no citoplasto apenas ficam 23 cromossomas, femininos (k) ou masculinos (m).

Baseados nestas observações, iniciamos as primeiras experiências nos humanos, injectando células foliculares em 14 ovócitos MII enucleados. O núcleo da célula folicular ficou condensado no ooplasto cerca de 1h após a microinjecção, o que sugeriu que conseguimos microinjectar sem activar o ovócito, uma vez que apenas uma actividade alta do MPF poderia ser responsável pela condensação dos cromossomas. Para conseguirmos obter um gâmeta feminino artificial (núcleo haplóide derivado do núcleo diplóide da célula folicular), a extrusão do pseudo glóbulo polar não foi inibida com citocalasina B. Para activar o ovócito e restaurar a diploidia da fecundação, os ooplastos foram microinjectados com um espermatozóide (ICSI) do parceiro da paciente cerca de 14h após a transferência nuclear. Cerca de 5h após a ICSI, observamos extrusão do pseudo glóbulo polar em 3/14 (21.4%) dos ooplastos. Destes, conseguimos isolar dois para FISH, que deu um resultado haplóide para os cromossomas 13, 18, 21, X and Y. Cerca de 10h após a ICSI, 2/3 dos ooplastos reconstruídos com extrusão do pseudo glóbulo polar desenvolveram dois pró-núcleos e clivaram para embriões

de duas células ao 2º dia (2/14, 14.3%) tendo depois sido criopreservados [65]. Estes resultados constituíram um marco no estudo da clonagem, pois foram os primeiros embriões humanos obtidos por clonagem, por clonagem terapêutica e por haploidização (Figs. 15).

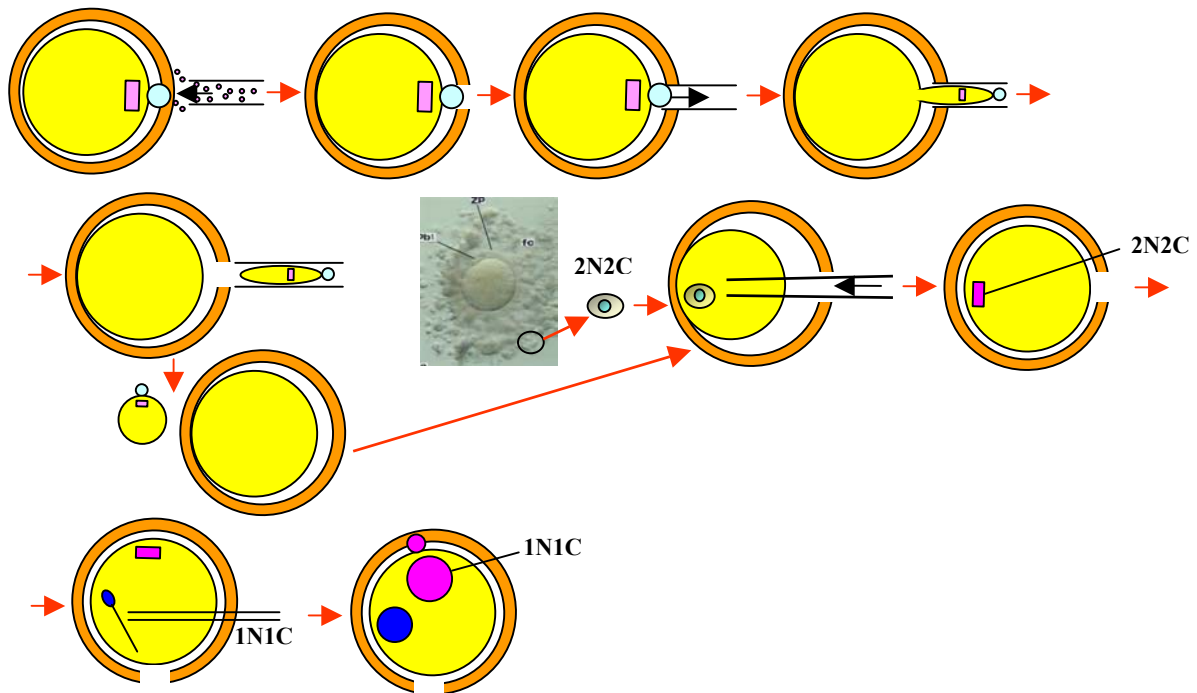


Figura 15. Transferência nuclear de uma célula folicular para ovócitos MII enucleados, seguida de ativação por ICSI. A haploidização feminina é conseguida omitindo a citocalasina B na ativação e cultura.

Outros autores vieram depois confirmar os nossos resultados [31,35]. Porém, nestes trabalhos de confirmação, os autores não usaram metodologias moleculares para confirmar que se tinha obtido uma haploidização e uma reconstrução da diploidia correctas. Num dos trabalhos, ovócitos MII de rato foram microinjectados com núcleos diploides femininos de células foliculares ou com fibroblastos masculinos da pele. Cerca de 1h após a transferência nuclear, os ovócitos foram activados com 8% etanol, mas apenas 20-29% efectuaram a extrusão do 2º glóbulo polar feminino e 1 pseudo glóbulo polar, formando zigotos com 2PN. Apesar da maioria destes zigotos terem clivado, apenas 8-22% atingiram o estágio de blastocisto [31]. No outro estudo, ovócitos GV de rato foram enucleados, electrofundidos com células diploides femininas do estroma do endométrio humano, e cultivados por 14-16h. Destes, 9/23 (39.1%) efectuaram a extrusão de um pseudo glóbulo polar, o que revela o seu potencial para a maturação in vitro [35].

Pelo contrário, outro estudo veio demonstrar que nos ratinhos é impossível usar ovócitos maduros MII para criar um genoma haplóide funcional a partir de um núcleo diplóide somático [57]. Neste trabalho, 168 ovócitos MII de rato foram enucleados e microinjectados com núcleos de células somáticas (diploides) adultas femininas (células foliculares). Cerca de 2-3h após a microinjecção, os ooplastos foram activados por 2h com 5 mM SrCl₂ em meio sem Ca²⁺. Depois da extrusão do pseudo glóbulo polar, as células foram analisadas por FISH, tendo os autores verificado a presença de fusos aberrantes e aneuploidias cromossómicas (153/168, 91.1%). Estas experiências sugeriram que na ausência dos eventos normais da profase meiótica (sinapse dos bivalentes e recombinação entre os cromossomas homólogos), não existem condições físicas que assegurem a segregação ordenada dos cromossomas homólogos. Os autores também sugeriram que mesmo que ocorra por acaso uma segregação correcta de cromossomas homólogos, será praticamente impossível assegurar que o complemento cromossómico contenha em exclusividade apenas os cromossomas paternos ou maternos de modo a que se consiga uma expressão adequada dos genes sujeitos a imprinting no desenvolvimento embrionário.

Num outro estudo [10], os autores enuclearam ovócitos GV de rato (G2/M) e efectuaram uma electrofusão dos ooplastos com fibroblastos femininos da pele de ratinhos (G2/M; 2N,4C). Os ovócitos

reconstruídos foram cultivados por 17h para estudar se ocorria a primeira divisão meiótica (1N,2C por extrusão do 1º pseudo glóbulo polar). A activação foi depois efectuada com 10 mM Sr^{2+} em meio sem Ca^{2+} por 6h de modo a estudar a ocorrência da segunda divisão meiótica (1N,1C). O pseudo-estadio MII (1N,2C) foi atingido por 62/119 (52.1%) dos ovócitos, mas apenas 41/119 (34.5%) efectuaram uma divisão assimétrica. Destes, apesar de 16/29 (55.2%) apresentarem condensação dos cromossomas, nenhum apresentou um fuso normal com cromossomas correctamente alinhados. No entanto, como a activação com Sr^{2+} causava fragmentação, os autores bloquearam a citocinese com citocalasina B. Apesar de tudo, 12/27 (44.4%) efectuaram a extrusão dos dois pseudo glóbulos polares. Sendo muito interessante, no entanto também este estudo não avaliou o conteúdo haplóide nem o potencial de desenvolvimento embrionário dos constructos.

Transferência nuclear de linfócitos masculinos do sangue periférico para ovócitos MII humanos enucleados, seguido de activação farmacológica

Estudamos primeiro a capacidade e a possibilidade de transformar células sanguíneas (linfócitos) humanas em ovócitos e espermatozóides (haploidização) usando a técnica de transferência nuclear para ovócitos MII humanos enucleados, uma actividade que remonta a 1997. Sabíamos que os linfócitos de mamífero se encontram em G0/G1 e que podem ser utilizados por microinjecção em ovócitos MII [18,27,30,38,56,]. Mais tarde, provou-se que possuem toda a capacidade de reprogramação após transferência nuclear, uma vez que por clonagem somática animal em bovinos, se obtiveram 17% de blastocistos e 2% de recém-nascidos masculinos [23].

Enucleamos 110 ovócitos MII humanos em meio de cultura SPM contendo Hepes e 5 μ g/ml de citocalasina B. Os ovócitos MII foram doados benevolmente por pacientes em tratamento de infertilidade, correspondendo a ovócitos maduros excedentários e por isso não utilizados no ciclo de tratamento do casal. Para isso, o 1º glóbulo polar (1GP) foi posicionado às 3h e abriu-se um orifício de 10 μ m na Zona Pelúcida (ZP) com tirode ácido. Pelo orifício, aspirou-se o 1GP e uma pequena porção de ooplasma subjacente com uma pipeta de biópsia (20 μ m). Os nucleoplastos foram transferidos para lâminas de vidro revestidas por poli-L-lisina contendo um círculo com 1 μ l de tampão de lise, secas ao ar e montadas com Vectashield contendo DAPI. Da análise dos carioplastos verificamos uma eficiência de enucleação de 60% que depois conseguimos elevar para 81% com o aumento da experiência de enucleação/transferência nuclear. Após a enucleação, os citoplastos foram colocados em meio de cultura sem citocalasina e deixados a recuperar durante 2-4h (37°C, 5% CO_2) (Fig. 16).

Os ooplastos foram então microinjectados (transferência nuclear) com linfócitos humanos masculinos de tamanho médio (6-9 μ m) (Fig. 17). Os linfócitos foram obtidos de amostras de sangue periférico, separados por Ficoll, estimulados com fitohemaglutinina (PHA) por 48-72h, parados em G0/G1 por cultura com privação parcial de soro durante 3-5 dias, e criopreservados até ao seu uso. Após a microinjecção, os ovócitos reconstruídos foram deixados em cultura por 2-4h, de modo a que o ooplasma reprogramme o DNA exógeno, condense os cromossomas e os organize numa placa metafásica.

Os ovócitos reconstruídos foram então activados farmacologicamente com um inoforo de cálcio, 10 μ M A23187 por 5-10 min [61], para saber se os cromossomas do linfócito sofriam haploidização, ou seja, se expulsavam 23 dos 46 cromossomas, transformando-se em potenciais gâmetas (Fig. 18).

Ao processo de enucleação, microinjecção e activação sobreviveram 101/110 (91.8%) dos ovócitos MII, enquanto que 9/110 (8.2%) degeneraram (Fig. 19K). Dos 101 ovócitos reconstruídos e activados, 87/101 (86.1%) formaram um pronúcleo (1PN) (Fig. 19A-F) e 14/101 (13.9%) 2-3PN (Fig. 19G-J). Dos 87 com 1PN, 49/87 (56.3%) não efectuaram extrusão do 1GP (Fig. 19A,D), 27/87 (31%) apresentaram extrusão do 1GP (Fig. 19B,E), e 11/87 (12.6%) exibiram 2GP (Fig. 19C,F). Ou seja, em teoria, 38/101 (37.6%) ou 38/87 (43.7%) das células conseguiram efectuar a meiose artificial e seriam provavelmente haplóides.

Estes constructos foram deixados evoluir em cultura embrionária. Dos 49 ovócitos com 1PN/0GP, 30/49 (61.2%) clivaram mas nenhum atingiu o estadio de blastocisto, e apenas 2/30 (6.7%) atingiram a fase de 12 células. Dos 38 ovócitos com 1PN/1-2GP, 20/38 (52.6%) clivaram e 5/20 (25%) atingiram o estadio de blastocisto.

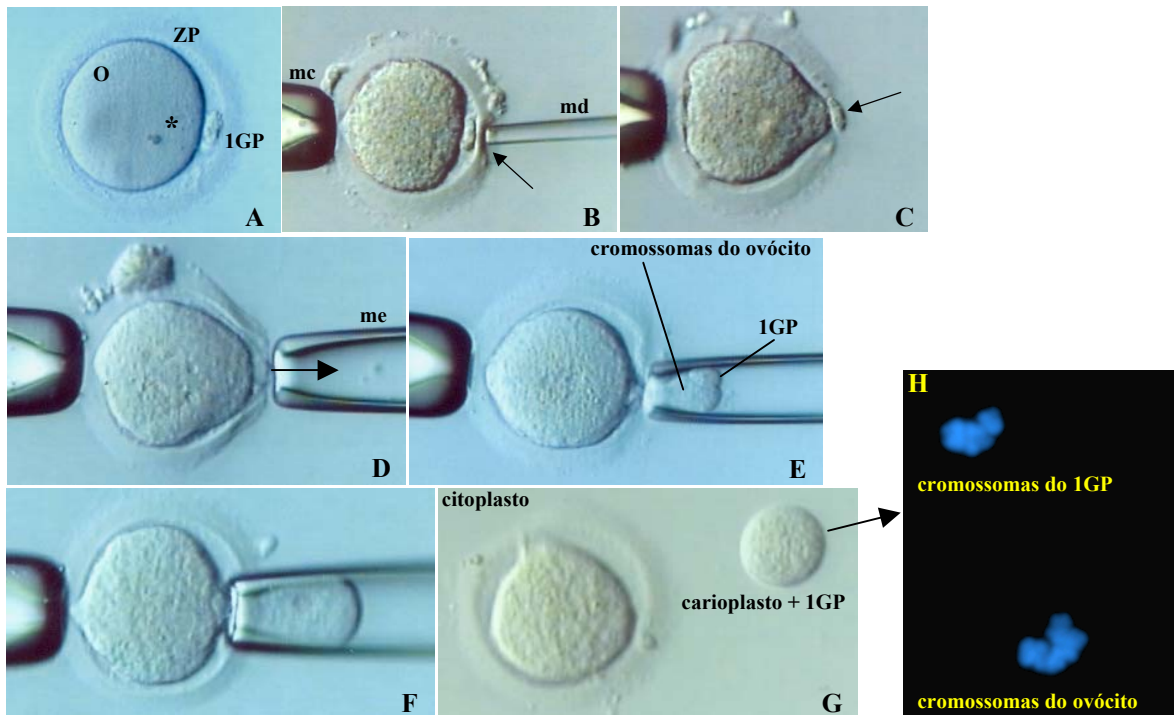


Figura 16. Transferência nuclear de linfócitos masculinos para ovócitos MII humanos enucleados, seguida de activação farmacológica. (A) Ovócito dador (O) rodeado pelo seu invólucro, a zona pelúcida (Z). Os cromossomos (*) do ovócito estão sob o 1º glóbulo polar (1GP). (B) O ovócito é segurado por uma micropipeta de contenção (mc) enquanto a micropipeta de digestão (md) lança uma solução ácida para abrir um orifício na ZP (seta). (C) Depois de se abrir o orifício na ZP, o 1º glóbulo polar faz saliência para o exterior (seta). (D) No orifício da ZP, insere-se uma micropipeta de enucleação (me). (E, F) Pelo orifício da ZP, aspira-se o 1º glóbulo polar e uma pequena parte do citoplasma que lhe fica subjacente (Enucleação). Esta porção de citoplasma contém os cromossomos do ovócito. (G) Parando a aspiração e retraíndo a micropipeta, destaca-se o citoplasma aspirado. Deste modo, obtém-se um ovócito sem material genético (citoplasto) e uma pequena porção de citoplasma com os cromossomos do ovócito (carioplasto). (H) A coloração do DNA (azul) no material aspirado, mostra que a enucleação foi eficaz.

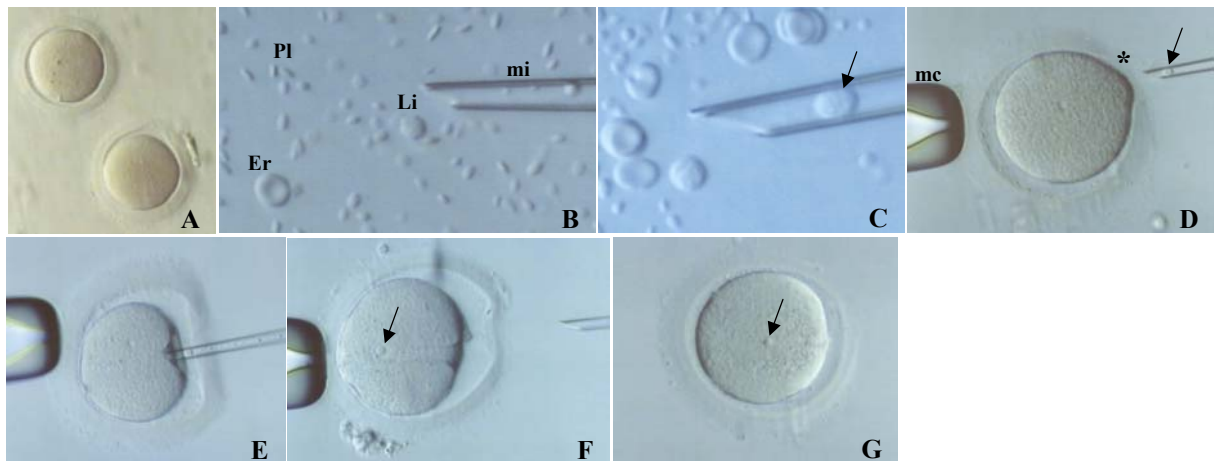


Figura 17. Transferência nuclear de linfócitos masculinos para ovócitos MII humanos enucleados, seguida de activação farmacológica. (A) ooplastos. (B,C) Com uma micropipeta de injeção (mi) selecciona-se (B) e aspira-se (C) um linfócito (Li; seta). Pl. Plaquetas; Er, eritrócito. (D) O citoplasto (ovócito dador enucleado) é segurado por uma micropipeta de contenção (mc) enquanto a micropipeta de injeção (mi), contendo o linfócito (seta), se aproxima do orifício (*) na ZP. (E) Penetração (microinjeção) do citoplasto pela micropipeta de injeção. (F,G) O linfócito é deixado (transferência nuclear) no interior do citoplasto (setas).

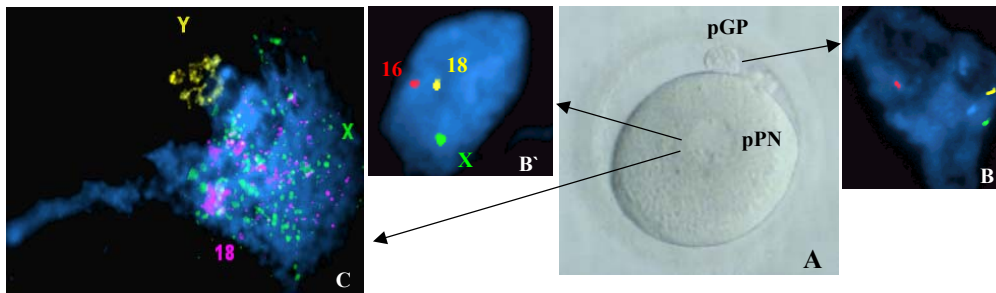


Figura 18. Transferência nuclear de linfócitos masculinos para ovócitos MII humanos enucleados, seguida de activação farmacológica. (A) Por activação química, o genoma diplóide do linfócito divide-se em duas partes, uma que fica dentro do citoplasto (pseudo-pronúcleo) e outra que é expulsa para o exterior (pseudo-glóbulo polar). Apresentam-se dois casos de análise genética por FISH do citoplasto reconstruído. (B,B') Genomas haplóides (haploidização conseguida por ter havido segregação dos homólogos). (C) Genoma caótico, por fragmentação cromossómica diplóide.

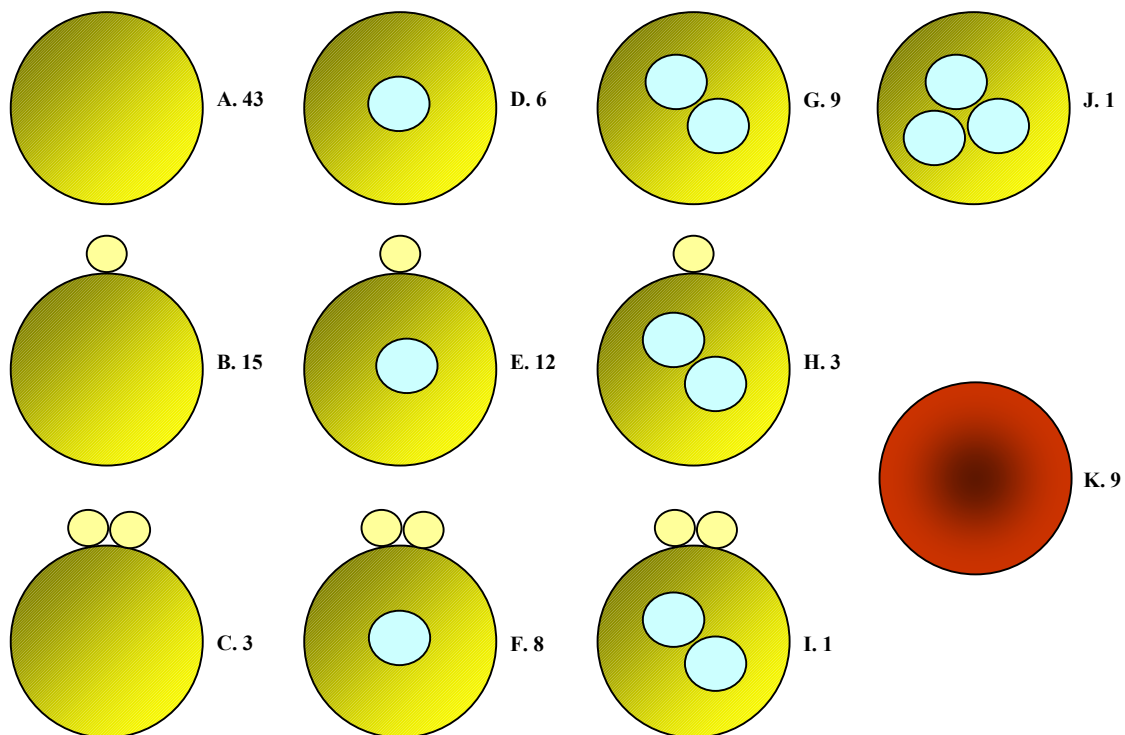


Figura 19. Transferência nuclear de linfócitos masculinos para ovócitos MII humanos enucleados, seguida de activação farmacológica. Resultados dos constructos após activação (número de casos observados por situação).

Os embriões foram processados para análise genética por FISH (Fig. 20). Os embriões dos 14 ovócitos 2-3PN e os embriões dos 49 ovócitos 1PN/0GP mostraram uma constituição diplóide, como esperado. Os embriões dos 38 ovócitos 1PN/1-2GP não mostraram divisões mitóticas normais, o que também era esperado caso fossem realmente haplóides. Destes, de 20 embriões conseguiu-se uma marcação FISH completa em 16 casos, que evidenciou 7/16 (43.75%) embriões com predomínio de blastómeros diplóides e 9/16 (56.25%) embriões com predomínio de blastómeros haplóides. Especificamente, 2 mosaicos diplóide/poliplóide, 4 diplóides e 1 poliplóide (dos 7 diplóides), e 8 mosaicos haplóide/diplóide e 1 haplóide (dos 9 haplóides). Assim sendo, dos 101 ovócitos MII enucleados com sucesso, 9/101 (8.9%) sofreram realmente haploidização, ou 9/38 (23.7%) se considerarmos os ovócitos 1PN/1-2GP [16].

Estas experiências sugerem que apesar de ser possível induzir a haploidização de genomas diplóides pela técnica da transferência nuclear para ovócitos MII enucleados, se trata de um evento raro em humanos.

As inferências biológicas são muito interessantes. Apesar das células somáticas adultas masculinas terem os homólogos separados (sem ligações de meiótico entre os homólogos), quando são transferidos para ooplastos conseguem sofrer condensação sem replicação e segregação homóloga como numa meiose. Isto implica também que o MPF do ooplasma mantém a sua capacidade de condensação cromossómica mesmo actuando sobre genomas diplóides; que o ooplasma é capaz de induzir a formação de um fuso que adere aos cromossomas diplóides, apesar de pressupormos que os centríolos masculinos dirigem a nucleação dos microtúbulos; que o ooplasma é capaz de induzir a formação de ligações de tipo meiótico entre os homólogos, uma vez que os microtúbulos se ligam aos homólogos de modo oposto e disparam a segregação dos homólogos para pólos opostos; e que o ooplasma é capaz de induzir uma divisão assimétrica apesar de actuar sobre um genoma diplóide.

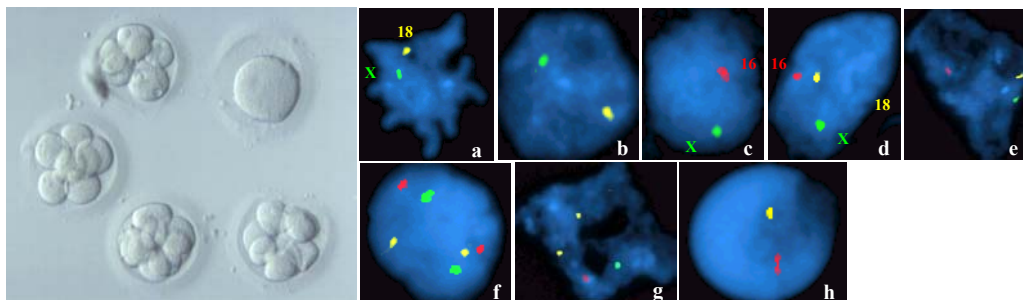


Figura 20. Transferência nuclear de linfócitos masculinos para ovócitos MII humanos enucleados, seguida de activação farmacológica e cultura dos constructos. Análise por FISH dos embriões resultantes. (a-e) Haplóides, (f) Diplóides. (g,h) Aneuplóides.

Transferência nuclear de linfócitos masculinos do sangue periférico para ovócitos MII humanos não enucleados e sem activação farmacológica

Numa outra série de experiências, transferimos linfócitos masculinos (2N, 2C) isolados por Ficoll do sangue periférico (G0/G1) mas sem estimulação pelo PHA nem cultura em meio pobre em nutrientes. Cuidadosamente, fragilizamos a sua membrana usando uma micropipeta de 5 µm de diâmetro (pipeta de ICSI) e injectamos um por ovócito MII (não enucleados) sem aspirar o ooplasma de modo a evitar a activação prematura do ovócito (Fig. 21).

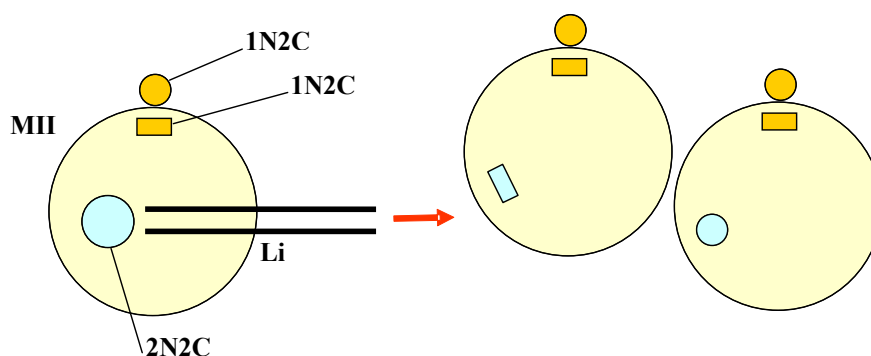


Figura 21. Transferência nuclear de linfócitos masculinos (Li) para ovócitos MII não enucleados e sem activação farmacológica.

De 11 ovócitos MII, 10/11 (90.9%) apresentaram um linfócito intacto no ooplasma até 15h após a microinjecção. Destes, em 10/11 (90.9%) conseguiu-se visualizar a cromatina com DAPI, e 4/10 (40%) apresentaram um aspecto condensado da cromatina. A análise FISH, possível em 8/10 (80%) casos, confirmou

a diploidia dos linfócitos (Fig. 22). Estes resultados mostram que é possível injectar linfócitos sem activar o ooplasma (90.9%) e que a eficiência da rotura da membrana dos linfócitos ainda foi reduzida (40%).

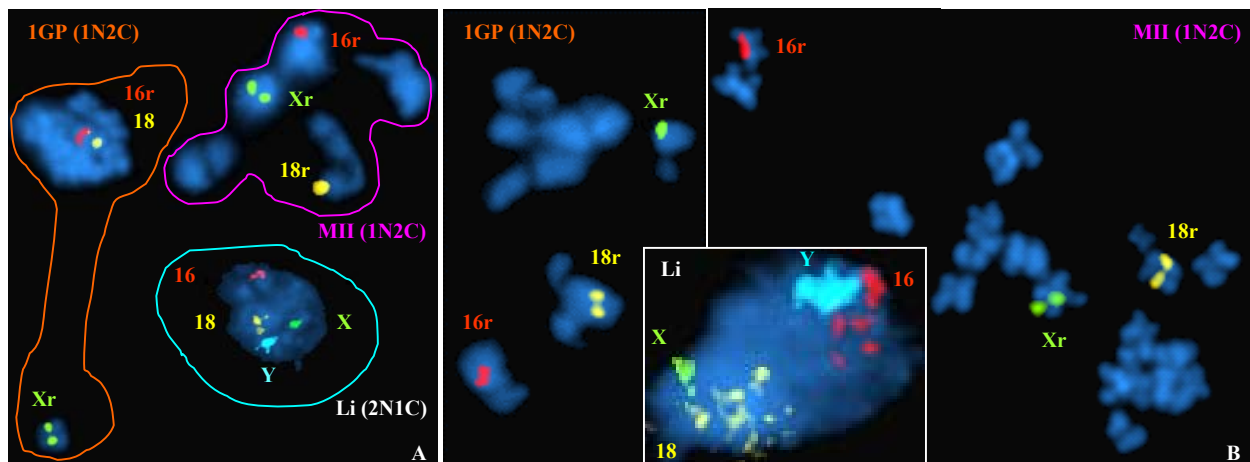


Fig. 22. Transferência nuclear de linfócitos masculinos para ovócitos MII não enucleados e sem activação farmacológica. Análise por FISH de dois casos. (A) O linfócito (Li) apresenta condensação da cromatina com emparelhamento dos autossomas. (B) O linfócito (Li) apresenta cromatina não condensada e ausência de emparelhamento entre os homólogos. (1GP) 1º glóbulo polar. (MII) ovócito maduro. A letra (r) a seguir aos cromossomas denota a presença de cromátides (replicação do cromossoma).

Transferência nuclear de linfócitos masculinos para ovócitos MII humanos não enucleados, seguida de activação farmacológica

Noutro conjunto de experiências, utilizamos 37 ovócitos MII (não-enucleados), que foram microinjectados com linfócitos segundo as condições anteriormente descritas. De seguida, após diferentes intervalos de tempo (2-6h), activamos os ovócitos com 10 μ M A23187 por 10 min. Após cerca de 15h de cultura, os ovócitos foram processados para FISH (Fig. 23).

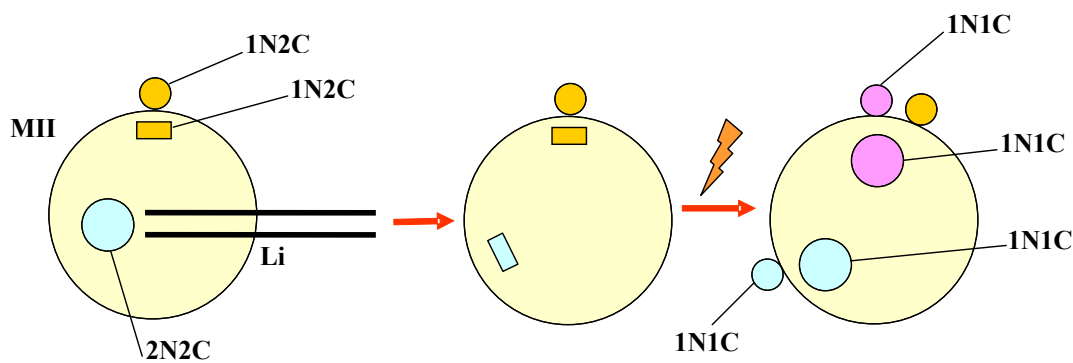


Fig. 23. Transferência nuclear de linfócitos masculinos (Li) para ovócitos MII humanos não enucleados, seguida de activação farmacológica.

Dos 15 ovócitos MII activados 6h após a microinjecção, 11/15 (73.3%) formaram zigotos 1PN/2PB e 4/15 (26.7%) permaneceram não-activados (ovócitos 0PN/1PB). A análise por FISH forneceu resultados em 10/11 (90.9%) dos zigotos 1PN-2PB. Destes, em 10/10 (100%) dos casos, os linfócitos apresentaram um genoma diplóide, dos quais 8/10 (80%) com condensação da cromatina (Fig. 24).

Estes resultados mostram que a activação quando efectuada 6h após a transferência nuclear activa eficazmente os ovócitos (73.3%), com retoma da meiose II feminina, e induz eficazmente a condensação da cromatina dos linfócitos (80%). No entanto, não foi capaz de induzir a formação de uma placa metafásica nem a segregação dos homólogos dos linfócitos (haploidização).

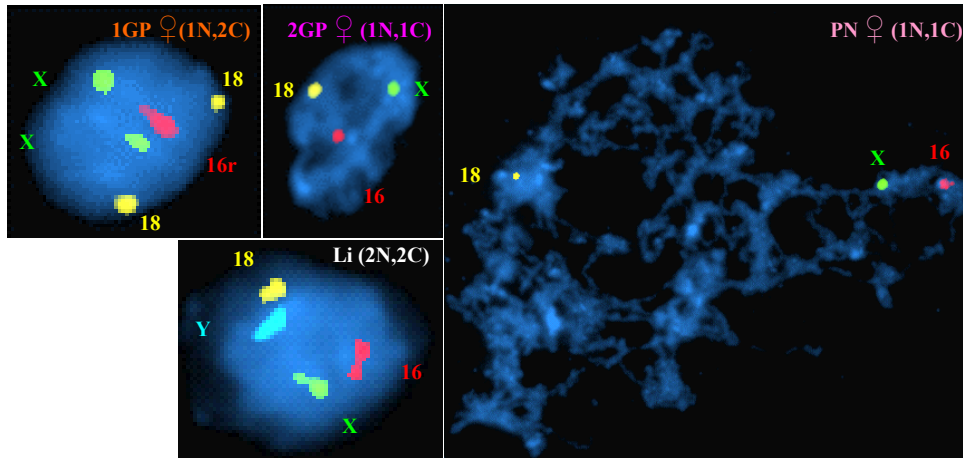


Fig. 24. Transferência nuclear de linfócitos masculinos (Li) para ovócitos MII humanos não enucleados, seguida de activação farmacológica 6h após a microinjecção. Análise por FISH dos zigotos 1PN/2GP obtidos. O linfócito (Li) apresenta condensação da cromatina com emparelhamento dos autossomas.

Dos 12 ovócitos MII activados 4h após a microinjecção, 2/12 (8.3%) activaram e formaram zigotos 1PN/2PB enquanto que 11/12 (91.7%) permaneceram não-activados (ovócitos 0PN/1PB). A análise por FISH forneceu resultados em 11/12 (91.7%) dos constructos. Destes, em 11/11 (100%) dos casos os linfócitos apresentaram um genoma diplóide, dos quais 9/11 (81.8%) com condensação da cromatina (Fig. 25).

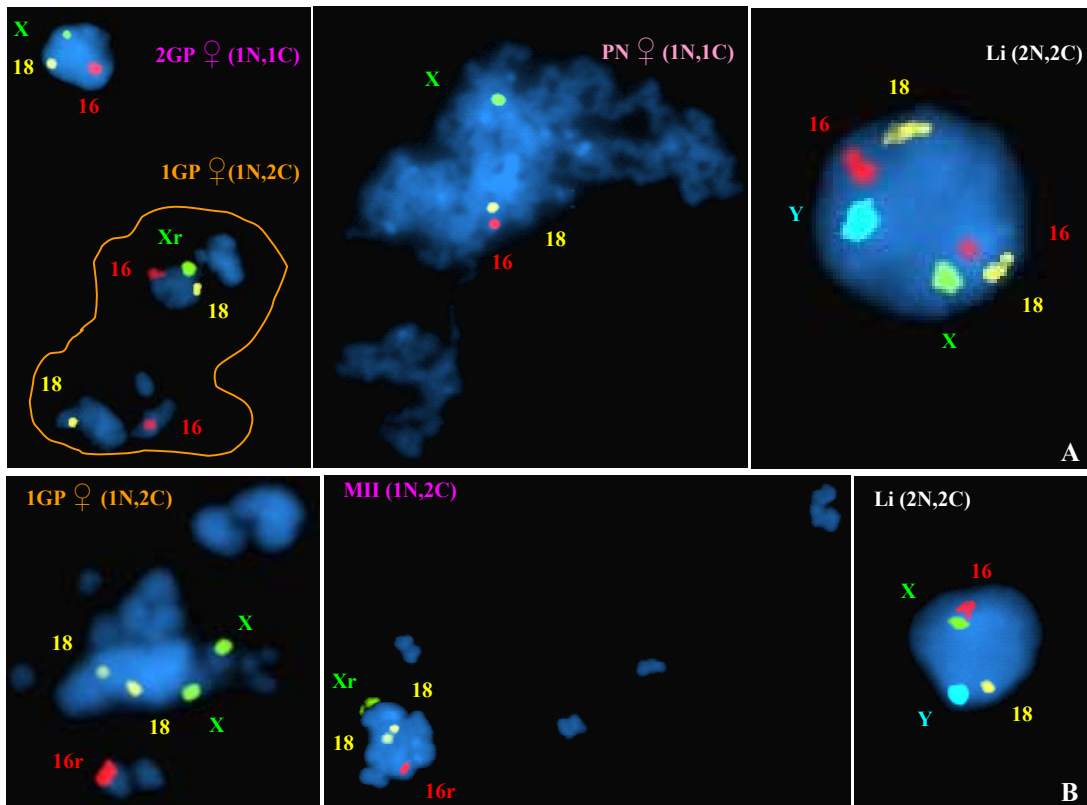


Fig. 25. Transferência nuclear de linfócitos masculinos (Li) para ovócitos MII humanos não enucleados, seguida de activação farmacológica 4h após a microinjecção. Análise por FISH dos constructos. (A) Condensação da cromatina sem emparelhamento dos homólogos. (B) condensação da cromatina com emparelhamento dos autossomas.

Estes resultados mostram que a activação quando efectuada 4h após a transferência nuclear não activa eficazmente a retoma da meiose II feminina (8.3%), induz eficazmente a condensação da cromatina dos linfócitos (80%), e não é capaz de induzir a formação de uma placa metafásica nem a segregação dos homólogos dos linfócitos.

Dos 10 ovócitos MII activados 2h após a microinjecção, 3/10 (30%) activaram e formaram zigotos 1PN/2PB enquanto que 7/10 (70%) permaneceram não-activados (ovócitos 0PN/1PB). A análise por DAPI evidenciou a presença de cromatina dos linfócitos em 8/10 (80%) dos casos. A análise por FISH forneceu resultados em 6/8 (75%) dos constructos. Destes, em 6/6 (100%) dos casos os linfócitos apresentaram um genoma diplóide, dos quais 3/6 (50%) com condensação da cromatina e 2/6 (33.3%) exibindo uma configuração metafásica (Fig. 26).

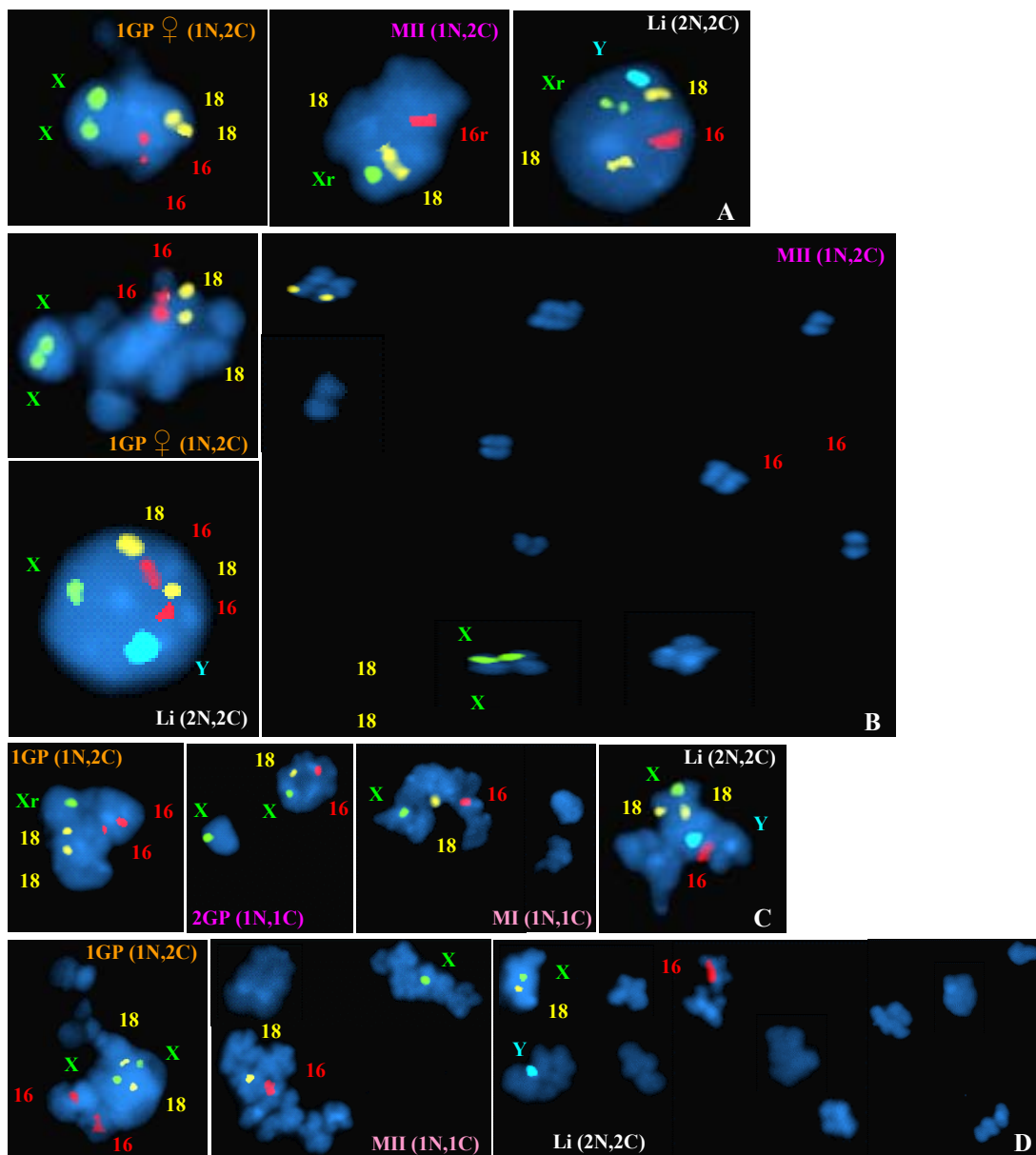


Fig. 26. Transferência nuclear de linfócitos masculinos (Li) para ovócitos MII humanos não enucleados, seguida de activação farmacológica 2h após a microinjecção. Análise por FISH dos constructos. (A) Condensação da cromatina Li com emparelhamento parcial

dos homólogos e sinais de replicação. (B) Condensação da cromatina Li sem emparelhamento dos autossomas. (C) Metafase Li com emparelhamento parcial dos homólogos. (D) Metafase Li com emparelhamento dos homólogos.

Estes resultados mostram que a activação quando efectuada 2h após a transferência nuclear activa parcialmente a retoma da meiose II feminina (30%), induz parcialmente a condensação da cromatina (50%) e a formação de uma placa metafásica (33.3%) nos linfócitos, mas não induz a segregação dos homólogos dos linfócitos.

Em conclusão, estes resultados evidenciam que os linfócitos podem ser microinjectados em ovócitos MII sem activação do ovócito (80-92%), um requisito essencial para a reprogramação do genoma do linfócito; que o melhor intervalo de tempo para iniciar a activação farmacológica do ovócito são 2-3h após a microinjecção, com reactivação da meiose II do ovócito (30-73%); que é possível induzir a condensação da cromatina do linfócito pelo MPF do ovócito (50-80%); que é possível induzir a formação de uma placa metafásica do linfócito (33%); que é possível conseguir uma segregação dos homólogos do linfócito, com citocinese desigual caracterizada pela extrusão de um pseudo-glóbulo polar haplóide e formação de um pseudo-pronúcleo haplóide (haploidização: 8.9%).

Os resultados também indiciam que a presença da placa metafásica II e a retoma da meiose II do ovócito inibem a condensação da cromatina, a formação de um fuso associado ao genoma e a segregação dos homólogos do linfócito.

Finalmente, os resultados também sugerem que a activação farmacológica pelo ionoforo de cálcio A23187, que induz um pico único de libertação endógena de cálcio, não é o estímulo mais eficaz para indução da haploidização nestas condições.