



FACULDADE DE MEDICINA  
UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA – TRABALHO FINAL

ANDRÉ LEONARDO FIGUEIREDO ESCULCAS ZHU

***Terapêuticas de substituição mitocondrial: nova técnica  
reprodutiva para prevenir transmissão de doenças genéticas***

ARTIGO DE REVISÃO NARRATIVA

ÁREA CIENTÍFICA DE GINECOLOGIA

Trabalho realizado sob a orientação de:

PROF DOUTORA ISABEL MARGARIDA DE FIGUEIREDO SILVESTRE

ABRIL/2022



# **TERAPÊUTICAS DE SUBSTITUIÇÃO MITOCONDRIAL: NOVA TÉCNICA REPRODUTIVA PARA PREVENIR TRANSMISSÃO DE DOENÇAS GENÉTICAS**

André Leonardo Figueiredo Esculcas Zhu <sup>1</sup>, Isabel Margarida de Figueiredo Silvestre<sup>1</sup>

1. Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal

Professora Doutora Isabel Margarida de Figueiredo Silvestre

Professora Auxiliar Convidada, Regente da Unidade Curricular de Ética, Deontologia e Exercício Profissional; Docente convidada da Unidade Curricular de Ginecologia; Assistente Graduada de Ginecologia-Obstetrícia; Subespecialista em Medicina da Reprodução.

Polo III, Azinhaga de Santa Comba, Celas, 3000-548 Coimbra, Portugal

msilvestre@fmed.uc.pt

## Índice

Lista de abreviaturas.....	Página 1
Resumo/ <i>Abstract</i> .....	Página 2
Palavras-chave/ <i>Keywords</i> .....	Página 4
Introdução.....	Página 4
Metodologia.....	Página 6
Discussão.....	Página 8
➤ Patologias Mitocondriais.....	Página 8
➤ Terapia de Substituição Mitocondrial.....	Página 9
➤ Técnicas usadas.....	Página 10
○ Transferência do pronúcleo.....	Página 10
○ Transferência do fuso materno.....	Página 12
○ Transferência do genoma do corpo polar 1.....	Página 18
○ Transferência do genoma do corpo polar 2.....	Página 20
○ Transferência da vesícula germinativa.....	Página 24
○ Transferência de citoplasma.....	Página 25
➤ Aplicações clínicas.....	Página 25
○ Prevenção de doenças.....	Página 26
○ Infertilidade.....	Página 26
○ Casais homossexuais femininos.....	Página 28
➤ Vantagens.....	Página 28
○ Vantagens sobre diagnóstico genético pré-implantação.....	Página 28
○ Vantagens das terapias de substituição mitocondrial.....	Página 29
➤ Problemas.....	Página 30
○ Desvantagens/ limitações.....	Página 30
○ Problemas legais.....	Página 31
○ Questões éticas.....	Página 32
➤ O panorama português.....	Página 33
➤ Perspetivas de futuro.....	Página 34
Conclusão.....	Página 34
Referências.....	Página 36

## **Lista de abreviaturas**

Acidente isquêmico transitório (AIT)

Acidente vascular cerebral (AVC)

Ácido desoxirribonucleico mitocondrial (mtDNA)

Ácido desoxirribonucleico nuclear (nDNA)

Ácido ribonucleico (RNA)

Adenosina trifosfato (ATP)

Citocalasina D (Cyto D)

Corpo polar 1 (CP1)

Corpo polar 2 (CP2)

Diagnóstico Genético Pré-implantação (DGPI)

Estados Unidos da América (EUA)

*Food and Drug Administration* (FDA)

Injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI)

*In vitro fertilization* (IVF)

Metáfase II (MII)

Procriação medicamente assistida (PMA)

Terapias de substituição mitocondrial (TSM)

Transferência da vesícula germinativa (TVG)

Transferência de fuso materno (TFM)

Transferência do genoma do corpo polar (TGCP)

Transferência do genoma do corpo polar 1 (TGCP1)

Transferência do genoma do corpo polar 2 (TGCP2)

Transferência do genoma do corpo polar 2 protocolo B (TGCP2b)

Transferência do pronúcleo (TPN)

Vesícula germinal (VG)

## Resumo

**Introdução:** As técnicas de procriação medicamente assistida surgiram inicialmente para tratar a infertilidade, permitindo a casais inférteis ter descendência biológica. Com o passar do tempo, novas técnicas têm surgido com novas indicações, entre elas as terapias de substituição mitocondrial, um novo conjunto de técnicas que poderá ter um grande impacto na prática clínica quer a nível da infertilidade, quer a nível da prevenção de doenças mitocondriais. Este trabalho teve como objetivo conhecer a investigação em curso e aplicações clínicas que esta técnica tem no âmbito da medicina de reprodução, especificamente na área relacionada com patologia mitocondrial.

**Metodologia:** Esta revisão narrativa realizou-se utilizando os motores de busca da *Pubmed/Medline*, da *Embase* e da *Web of Science*. Efetuou-se uma primeira pesquisa em 30/3/2021, que foi atualizada em fevereiro de 2022, utilizando como palavra-chave o termo "*mitochondrial replacement therapy*", tendo recolhido material desde 2017, e cruzado a pesquisa com outras palavras-chave. Por fim, adicionou-se trabalhos relevantes prévios a 2017 encontrados nas citações bibliográficas dos artigos consultados, bem como artigos importantes que, entretanto, foram publicados.

**Discussão:** As técnicas de substituição mitocondrial permitem obter um embrião com material genético proveniente de 3 pessoas (material nuclear proveniente de um casal e a maioria do material mitocondrial proveniente de uma dadora). Estas técnicas têm inúmeras possíveis aplicações a nível da procriação medicamente assistida na área da infertilidade feminina de causa ovocitária, por causas como a idade materna avançada, uma vez que, com a substituição do citoplasma dos ovócitos de pacientes mais velhas, muitas vezes consegue-se aumentar as taxas de gravidez. Para além disso, pode-se vir a evitar a transmissão de inúmeras patologias que têm como base mutações no mtDNA, que afetam imensos doentes, com atingimento de vários órgãos e sistemas e com variadas apresentações, e cuja maioria não tem tratamentos modificadores de doença. Estas técnicas apresentam-se num contexto que não fornece alternativas relevantes à prevenção de herança de mtDNA mutado, com o objetivo de gerar descendência biológica, sendo por isso de fundamental importância a sua compreensão, estudo e desenvolvimento de modo a estabelecer-se um uso clínico seguro.

**Conclusão:** Estas técnicas têm um grande potencial de virem a revolucionar completamente a prática clínica dentro da área da ginecologia-obstetrícia a nível da

procriação medicamente assistida, sendo que algumas destas já têm dado evidências de serem verdadeiramente úteis; assim, tornam-se necessários novos estudos que fundamentem a sua real aplicabilidade clínica, sem negligenciar as responsabilidades éticas inerentes a este tipo de técnicas.

### **Abstract**

*Introduction: Medically assisted procreation techniques initially emerged to treat infertility, allowing infertile couples to have biological offspring. Over time, new techniques have emerged with new indications, among them are the mitochondrial replacement therapies, a new set of techniques that could have a great impact on clinical practice, both in terms of infertility and in the prevention of mitochondrial diseases. This work aimed to understand the ongoing research and clinical applications that this technique has in the field of reproductive medicine, specifically in the area related to mitochondrial pathology.*

*Methodology: This narrative review was carried out using Pubmed/Medline, Embase and Web of Science as search engines. A first research was carried out on 30/3/2021, which was updated in February 2022, using the term "mitochondrial replacement therapy" as a keyword, having collected material since 2017, and crossing the search with other key words. Finally, relevant works prior to 2017 found in the bibliographic citations of the consulted articles were added, as well as important articles that were published in the meanwhile.*

*Discussion: Mitochondrial replacement techniques allow us to obtain an embryo with genetic material from 3 people (nuclear material from a couple and most of the mitochondrial material from a donor). These techniques have numerous possible applications in medically assisted procreation in the area of female infertility due to oocyte problems from causes such as advanced maternal age, since, with the replacement of the cytoplasm of the oocytes of older patients, it is often possible to increase pregnancy rates. In addition, they may help avoid numerous pathologies that are based on mtDNA mutations, which affect many patients as well as various organs and systems and with extremely variable presentations, most of which do not have disease-modifying treatments. These techniques are presented in a context that does not provide relevant alternatives to the prevention of the inheritance of mutated mtDNA, with the objective of generating biological offspring, therefore their understanding, study and development are of fundamental importance in order to establish a safe clinical use.*

*Conclusion: These techniques have great potential to completely revolutionize clinical practice within the area of gynecology-obstetrics in the field of medically assisted procreation, and some of these have already given evidence of being truly useful; thus, further studies are needed to support the real clinical applicability, without neglecting the ethical responsibilities inherent to this type of technique.*

## **Palavras-Chave**

Terapia de Substituição Mitocondrial; Medicina Reprodutiva; Doenças Mitocondriais; Fertilização *In Vitro*; Infertilidade Feminina

## **Keywords**

*Mitochondrial Replacement Therapy; Reproductive Medicine; Mitochondrial Disorders; IVF; Female Infertility*

## **Introdução**

As técnicas de procriação medicamente assistida (PMA) surgiram inicialmente para tratar a infertilidade, permitindo a casais inférteis ter descendência biológica. No entanto, novas indicações para variados contextos clínicos têm surgindo ao longo do tempo, quer de carácter médico (para prevenção da transmissão de doenças à descendência, podendo aliar-se o uso de Diagnóstico Genético Pré-implantação (DGPI);<sup>1</sup> preservação do potencial reprodutivo em caso de doença/tratamento que ponha em causa o potencial reprodutivo; seleção de embriões compatíveis a nível do sistema antigénio leucocitário humano com um familiar doente, com o intuito de utilizar células estaminais) quer de carácter biológico ou social (como, por exemplo, nos novos modelos de família, monoparentais ou homossexuais ou para preservar potencial reprodutivo a ser utilizado mais tarde, quando as condições de fertilidade podem já não ser as melhores devido à idade).

Com o progredir do conhecimento e tecnologia é expectável que muitas mais novas técnicas e aplicações destas venham a surgir no futuro,<sup>2</sup> com novas indicações para a PMA a aparecerem na clínica. Dentro destas novas indicações, a prevenção de transmissão de patologia derivada de mutações do ácido desoxirribonucleico mitocondrial (mtDNA) tem se vindo a apresentar como uma importante e promissora técnica que irei explorar neste trabalho.



As patologias mitocondriais são um grupo heterogêneo de doenças hereditárias, a grande maioria sem cura, que resultam de mutações no mtDNA e que por norma é transmitido por via materna pelas mitocôndrias presentes no citoplasma do ovócito.<sup>3</sup> Aproximadamente 1 em 5.000 nascimentos apresentam mutações no mtDNA, sendo que as doenças associadas a mutações do mtDNA têm uma apresentação extremamente variável,<sup>4</sup> que se deve, entre outras causas, ao comportamento do mtDNA:

- Em primeiro lugar, o fenómeno da heteroplasmia (ou seja, podem existir várias mitocôndrias com diferentes percentagens de mtDNA mutado em cada célula);<sup>3</sup>
- Em segundo lugar, a segregação replicativa estocástica (que é a capacidade de variação na proporção de heteroplasmia após cada divisão celular);<sup>3</sup>
- Em terceiro lugar, a gravidade da doença depende do tipo de mutação, das necessidades energéticas do tecido afetado e da percentagem de mtDNA mutado atingir um limiar suficiente para haver expressão fenotípica.<sup>3</sup>

Tudo isto dificulta a previsão da progressão da doença, bem como o desenvolvimento de estratégias terapêuticas.<sup>4</sup>

No entanto, tem-se vindo a desenvolver e a aperfeiçoar um conjunto de técnicas *in vitro* que permitem substituir o mtDNA anormal de uma mulher pelo mtDNA saudável de uma dadora<sup>5</sup>, obtendo-se uma célula com o ácido desoxirribonucleico nuclear (nDNA) da doente, mas com a grande maioria do mtDNA saudável da dadora, substituindo o DNA mitocondrial original anormal,<sup>5,6</sup> sendo que para além da prevenção da transmissão de mtDNA mutado, estas técnicas têm vindo a mostrar potencial em outras áreas como a da infertilidade de causa feminina,<sup>7</sup> muitas vezes relacionada com a idade materna avançada, que é considerada como uma das 10 principais prioridades para futuras pesquisas sobre infertilidade.<sup>8</sup>

Enquanto organelos vitais para o metabolismo energético celular, as mitocôndrias são essenciais para a maturação do ovócito, fertilização e desenvolvimento embrionário normal. Assim, anomalias na quantidade, qualidade e função mitocondrial relacionam-se muitas vezes com baixa fertilidade e situações de infertilidade, como diminuição da reserva ovárica, má qualidade ovocitária, envelhecimento ovárico prematuro e envelhecimento ovárico, bem como patologia mitocondrial de herança materna por mutações no mtDNA. Deste modo, as mitocôndrias são um importante alvo terapêutico em técnicas de procriação medicamente assistida para situações de infertilidade feminina de causa ovocitária.<sup>9,10</sup>

A estas técnicas dá-se o nome de terapias de substituição mitocondrial (TSM), que podem ser utilizadas no âmbito da procriação medicamente assistida. Esta área desperta-me bastante interesse, e com o objetivo de conhecer melhor esta temática, propus-me a elaborar um artigo de revisão narrativa, para perceber as aplicações clínicas destas técnicas.

Por ter sido publicado em 2018 uma revisão sistemática com meta-análise sobre o tema que abarcou artigos até 2016, <sup>11</sup> é necessária uma resenha do estado atual da técnica, seus diversos subtipos, aplicações clínicas, riscos e limitações bem como observar de modo sumário problemas legais; questões éticas; perspectivas de futuro e qual o panorama português atual.

## **Metodologia**

Esta revisão narrativa foi realizada utilizando os motores de busca da *Pubmed/Medline*, da *Embase* e da *Web of Science*. Foi realizada uma primeira pesquisa em 30/3/2021, que foi atualizada em fevereiro de 2022, utilizando como palavra-chave o termo "*mitochondrial replacement therapy*", tendo-se recolhido material desde 2017, excluindo todos os artigos não publicados em inglês. Na *Pubmed/Medline* não se aplicaram filtros quanto ao tipo de artigos. A nível da *Embase* selecionaram-se quanto ao tipo de publicação as seguintes categorias: "*article*", "*article in press*", "*data papers*", "*editorial*", "*erratum*", "*letter*", "*short survey*". Na *Web of Science* selecionou-se quanto ao tipo de documento "*article or early access or editorial material*". Desta compilação de artigos foram depois selecionados os mais relevantes através dos critérios que exponho na Figura 1.



## PRISMA 2009 Flow Diagram

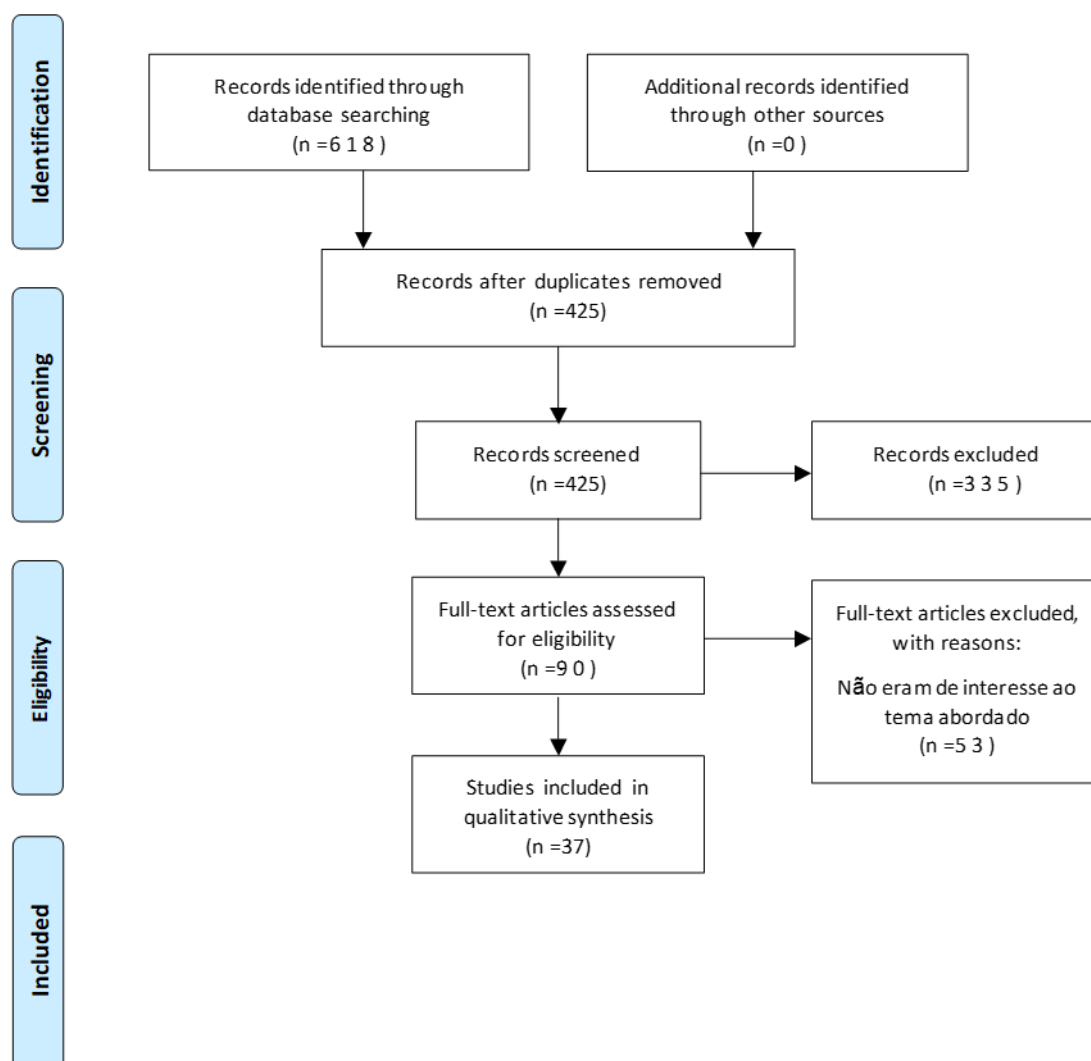


Figura 1. *Prisma flow diagram*. Adaptado de: Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, The PRISMA Group (2009). Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement. PLoS Med 6(7): e1000097. doi:10.1371/journal.pmed1000097

A data foi escolhida devido ao facto de em 2018 ter saído uma revisão sistemática com meta-análise sobre o tema que abarcou artigos até 2016. <sup>11</sup>

Para além disso, cruzou-se a pesquisa com os termos: “*reproductive medicine*” “*mitochondrial disorders*” “*IVF*” e “*female infertility*”. Foram também adicionados trabalhos relevantes prévios a 2017 encontrados nas citações bibliográficas dos artigos

consultados, bem como artigos importantes que, entretanto, foram publicados, e informação recebida após inquérito no Serviço de Genética da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto.

## **Discussão**

### **Patologias Mitocondriais**

A patologia mitocondrial derivada de mutações no mtDNA pode afetar diferentes tecidos e resultar em doença grave, quer por defeitos na função da cadeia respiratória<sup>5</sup>, quer por disfunção na produção de energia.<sup>12</sup> Consequentemente, pode levar à falência ou disfunção de órgãos/estruturas metabolicamente mais ativos, como o coração, pulmões, rins, cérebro, retina, nervo óptico, fígado e músculos.<sup>5,13</sup> Isto pode levar a diversas manifestações clínicas como disfunção hepática, falência da medula óssea, diabetes mellitus, surdez, retinopatia e oftalmoparésias, falência respiratória, acidente vascular cerebral (AVC), acidente isquémico transitório (AIT), doenças cardíacas, doenças neurodegenerativas, entre outras, que são coletivamente referidas como doenças mitocondriais.<sup>12, 14</sup>

Em cada célula existem inúmeras cópias de mtDNA, ao contrário do que ocorre com o nDNA.<sup>5</sup> O início e a gravidade das doenças mitocondriais dependem da quantidade de mtDNA mutado atingir um limiar específico, (cujo valor exato ainda não foi bem precisado) dentro da célula, suficiente para levar ao aparecimento de doença<sup>5</sup>, bem como do tipo de mutações presentes, dos genes mutados e o tipo de órgão/tecido afetado.<sup>12</sup>

Adicionalmente, o mtDNA é instável por natureza, o que dificulta localizar com precisão quando este sofre alterações,<sup>5</sup> e prever como uma patologia mitocondrial se vai comportar ao longo do tempo.

Atualmente acredita-se que mutações no mtDNA são responsáveis por 10-15% das doenças mitocondriais<sup>5</sup>, o que se traduz numa incidência de aproximadamente 1 em cada 5.000-10.000 adultos, mas que pode ser muito superior, uma vez que estas apresentam um espectro extraordinariamente amplo de sintomas, o que dificulta o diagnóstico.<sup>12</sup> É importante realçar que a disfunção mitocondrial pode resultar de uma mutação tanto no mtDNA quanto no nDNA.<sup>5</sup>

Com as armas terapêuticas atualmente disponíveis, apenas algumas doenças mitocondriais respondem aos tratamentos oferecidos<sup>4,5</sup>. Até ao momento, o único tratamento modificador da doença aprovado é a idebenona, para o tratamento da

neuropatia óptica hereditária de *Leber*, estando a terapia genética intravítrea para o tratamento desta doença a aguardar aprovação pela Agência Europeia do Medicamento.<sup>14</sup> Para as outras patologias mitocondriais ainda não há terapêuticas fundamentais/curativas,<sup>12,15</sup> limitando-se o tratamento ao controlo de sintomas.<sup>12</sup>

Por fim, estas doenças apresentam um padrão de hereditariedade distinto das doenças relacionadas com o nDNA devido a uma herança materna, heteroplasmia do mtDNA (que é a proporção de mtDNA mutante em relação ao mtDNA total de uma célula) e segregação replicativa de mtDNA (que é a capacidade de haver vários genótipos distintos de mtDNA em cada tecido).<sup>12</sup> Para além disso, ocorre por duas vezes um efeito de gargalo ou “bottleneck”:<sup>12</sup> um durante a ovogénese, em que as células germinativas primordiais contendo mtDNA mutado normalmente sofrem uma redução dramática no conteúdo de mtDNA;<sup>12</sup> o outro quando os ovócitos estão a amadurecer, pois recebem apenas um número limitado de moléculas de mtDNA, que são amplificadas de modo a produzir várias centenas de milhares de cópias de mtDNA, como é observado em ovócitos maduros.<sup>12</sup>

Esta redução seletiva nas cópias de mtDNA tem como objetivo garantir que muito poucas cópias de mtDNA possam ser amplificadas, mas muitas vezes resulta em variabilidade na percentagem de moléculas de mtDNA mutantes em diferentes ovócitos, com transmissão variável de mtDNA mutado da mãe para a descendência.<sup>12</sup>

### **Terapia de Substituição Mitocondrial**

Este procedimento visa substituir o mtDNA anómalo de uma mulher pelo mtDNA saudável de uma dadora<sup>5</sup>, prevenindo a transmissão de mtDNA defeituoso, num contexto onde anteriormente não havia opções preventivas relevantes<sup>16</sup> nem opções terapêuticas fundamentais<sup>12</sup>. Adicionalmente, poderá vir a revelar-se uma importante terapia para a infertilidade relacionada com a idade materna avançada<sup>7</sup>, uma vez que ao substituir o citoplasma dos ovócitos de pacientes mais velhas consegue-se aumentar a taxas de gravidez após a fertilização *in vitro* (IVF).<sup>7</sup> Este tipo de terapia pode ser alcançado através de várias técnicas, entre elas: transferência do pronúcleo, transferência do fuso materno e transferência do genoma do corpo polar.<sup>5</sup>

## Técnicas usadas <sup>5</sup>

### 1) Transferência do pronúcleo (TPN)

Nesta técnica é necessário haver a fertilização dos ovócitos da doente e da dadora, através de injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI), devendo o ovócito da doente ser fertilizado com o espermatozoide do indivíduo escolhido para ser o pai biológico. Deste modo há a formação dos pronúcleos, sendo que, após a sua formação, os pronúcleos que vão fornecer o material genético nuclear são extraídos durante a 1ª divisão mitótica.<sup>17</sup> (Figura 2).

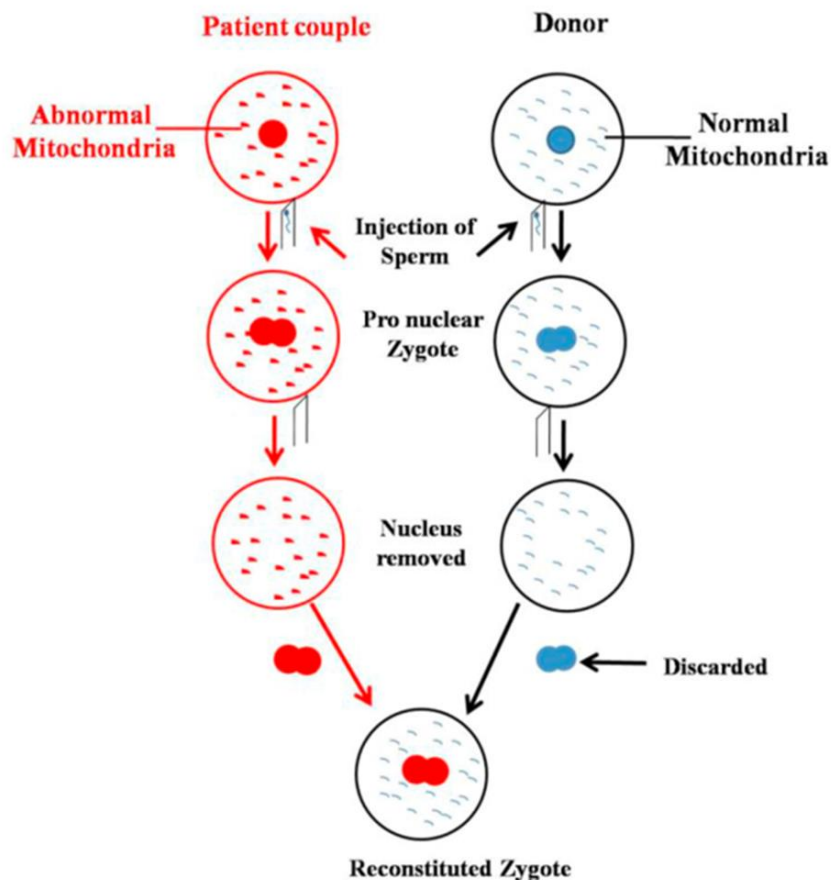


Figura 2. Transferência do pronúcleo. Adaptada de: Sharma H, Singh D, Mahant A, Sohal SK, Kesavan AK, Samiksha. Development of mitochondrial replacement therapy: A review. Heliyon 2020;6(9):e04643.

Este processo, pelo que se sabe até hoje, deve ser feito de modo precoce, idealmente 8-10 horas após a ICSI, na fase G1 da 1ª divisão mitótica, uma vez que quando comparado com colheitas mais tardias (16-20hr), que são efetuadas na fase G2, uma colheita precoce promove a taxa de sobrevivência (92% TPN precoce vs 59% TPN

tardia) bem como um maior número de primeiras divisões mitóticas normais, o que indica que o centríolo do espermatozoide é menos afetado.<sup>17</sup>

O pronúcleo é colhido na forma de carioplasto, que é depois inserido na célula da dadora já enucleada que vai fornecer o material genético mitocondrial bem como todo o restante citoplasma.<sup>5, 18</sup> Antes da fusão, o carioplasto é vitrificado e o excesso de citoplasma é removido.<sup>12</sup> Para que a fusão ocorra com sucesso é necessário utilizar pulsos elétricos ou vírus hemaglutinante do Japão (HVJ) inativo.<sup>5, 17</sup>

Apesar do tamanho relativamente grande do pronúcleo (25–30 µm), a TPN em humanos mostra-se compatível com um normal desenvolvimento até à fase de blastocisto<sup>18</sup> e apresenta um nível de “*carry-over*” de mtDNA proveniente do carioplasto inferior a 2% em 79% dos blastocistos<sup>12</sup> (mas que pode variar de indetetável até menos de 5%<sup>5, 7, 19</sup>), valor bem abaixo do limiar necessário para se manifestar doença.<sup>17,18,20</sup> Sendo que para a maioria das doenças relacionadas com o mtDNA é necessário atingir-se um limiar mínimo de 60% de mtDNA mutado para se manifestar clinicamente doença.<sup>21</sup>

## **Vantagens**

Um estudo realizado em zigotos humanos provenientes de TPN que apresentavam uma fertilização normal revelou que estes apresentavam uma elevada taxa (62%) de desenvolvimento até blastocisto, semelhante aos controlos.<sup>20</sup>

Sabe-se também que utilizando uma TPN com colheita precoce dos pronúcleos, a incidência de aneuploidias é comparável à dos controlos, tendo-se utilizado uma técnica de *array*-CGH (hibridização genómica comparativa) para fazer a comparação. Assim pode-se dizer que esta técnica não aumenta a incidência de aneuploidias em blastocistos.<sup>17</sup>

Esta técnica também não altera o padrão de expressão genética dos blastocistos, sendo que quer a expressão génica global quer a expressão génica associada a linhagens celulares é indistinguível entre blastocistos de controlo e blastocistos gerados por TPN com colheita dos pronúcleos precoce.<sup>17</sup>

Adicionalmente, estudos efetuados sobre a TPN com colheita precoce sugerem que a substituição dos genomas nucleares não afeta a expressão dos genes mitocondriais.<sup>17</sup>

Para além disso, a vitrificação dos ovócitos da doente não parece interferir com a técnica, sendo que até provavelmente contribui para diminuir o “*carry over*”, o que permite armazenar ovócitos da paciente.<sup>17</sup>

Este armazenamento não só permite ter uma colheita assíncrona de ovócitos da doente e da dadora, como permite também utilizar ovócitos colhidos quando a doente era mais jovem e podia ainda não desejar ter filhos, podendo estes ser usados no futuro, evitando assim maior suscetibilidade para aneuploidias meióticas relacionadas com a idade. O mesmo não ocorre quando se vitrifica os ovócitos da dadora.<sup>17</sup>

## **Limitações**

Até ao momento esta técnica necessita que ocorra fertilização antes da colheita dos pronúcleos, o que leva a problemas éticos relativamente à destruição de embriões.<sup>7</sup>

Apesar de teoricamente ser possível colher ovócitos imaturos e transplantar a vesícula germinal (VG) (que é a designação dada ao grande núcleo do ovócito primário quando este se encontra na prófase I da meiose I) sem que seja necessária uma fertilização, esta transferência (da vesícula germinal) com a tecnologia disponível atualmente leva sempre à remoção das células do cumulus, que se pensa serem importantes para a normal maturação do ovócito.<sup>18</sup>

Assim, de modo a isto funcionar são necessárias estratégias que compensem a ausência do complexo cumulus-ovócito intacto, sendo que até o momento não há relatos de transferência de VG bem-sucedida em ovócitos humanos.<sup>18</sup>

Além disso esta técnica revelou ter um “*carry over*” de mtDNA ligeiramente aumentado quando aplicada em citoplastos que tiveram origem em ovócitos previamente vitrificados, que pode ser devido à alta incidência de extravasamento citoplasmático. Assim, de modo a diminuir o “*carry over*”, neste caso será melhor que os ovócitos que vão dar origem ao citoplasto não tenham sido vitrificados.<sup>17</sup>

Assim, apesar da TPN ter o potencial para diminuir o risco de doenças causadas por patologia no mtDNA, ainda não se pode dizer que garante a sua prevenção.<sup>4,17</sup> São também ainda precisos alguns estudos para determinar como variações na heteroplasmia, que poderão advir de um “*carry over*” baixo, mas não nulo, podem vir a afetar o desenvolvimento *in vivo*.<sup>17</sup> Uma solução pode passar por uma combinação entre TPN e diagnósticos pré natais mais apertados,<sup>17,19</sup> mas é importante resolver algumas destas questões antes de um uso clínico disseminado.

## 2) Transferência de fuso materno (TFM)

Esta técnica, também chamada de transferência do complexo do fuso-cromossómico<sup>22</sup>, ocorre antes da fertilização durante a metafase II (MII), quando o complexo do fuso cromossómico está isolado na forma de carioplasto envolvido por membrana<sup>18, 22</sup>. Este



fuso cromossômico (fuso materno) é então extraído do ovócito da doente, sendo transferido para o espaço perivitelino do ovócito em metáfase II da doadora saudável, que foi previamente enucleado, possuindo este mitocôndrias saudáveis<sup>5</sup>. A esta célula enucleada (sem material nuclear) que recebe o fuso dá-se o nome de citoplasto. (Figura 3).

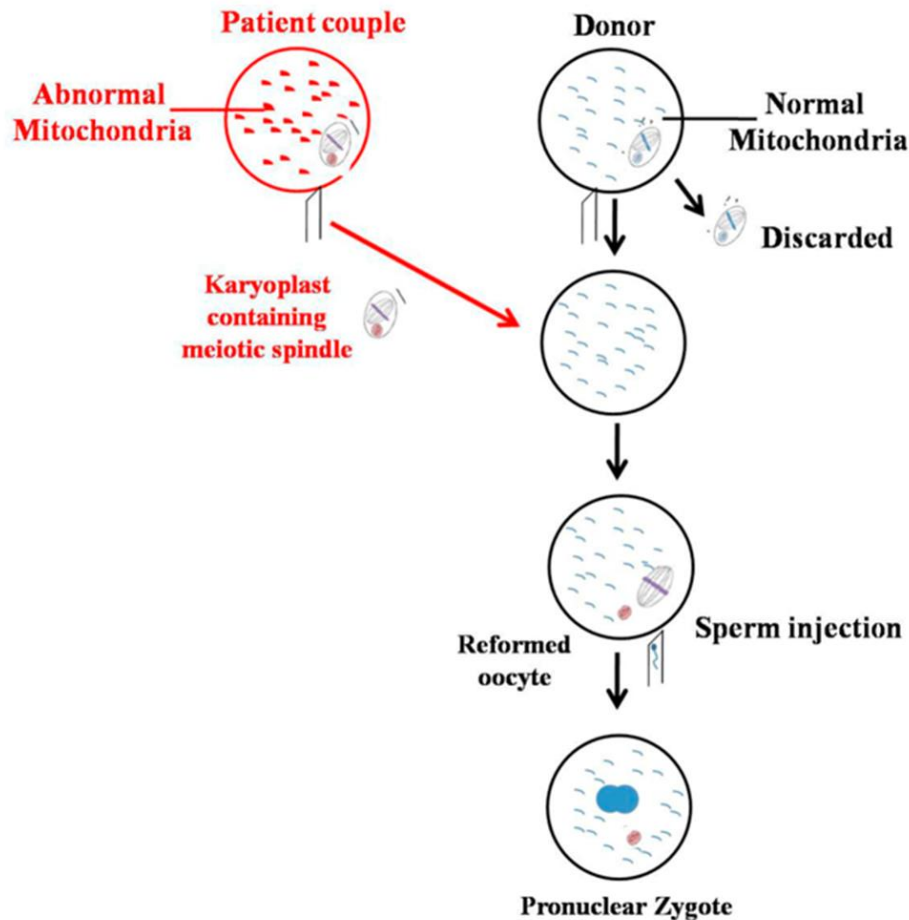


Figura 3. Transferência do Fuso materno. Adaptada de: Sharma H, Singh D, Mahant A, Sohal SK, Kesavan AK, Samiksha. Development of mitochondrial replacement therapy: A review. Heliyon 2020;6(9):e04643.

Deste modo, consegue-se isolar o material genético nuclear e transplantá-lo do ovócito não fertilizado da doente para o citoplasma de outro ovócito enucleado, que vem de uma doadora saudável, contendo mtDNA saudável, bem como outros organelos, ácido ribonucleico (RNA) e proteínas.<sup>21</sup>

Esta célula com o material genético nuclear da doente, mas com o restante citoplasma de uma doadora é posteriormente sujeitada a ICSI ou outra técnica, que leve à sua fertilização. A criança que resulta deste procedimento é geneticamente filha da doente

e do dador do espermatozoide, mas tem o material genético mitocondrial saudável da dadora.

Para o sucesso da técnica são necessários certos compostos, sendo de destacar dois em particular: inibidores do citoesqueleto, como a citocalasina B, que diminui a rigidez do citoplasma e da membrana celular, tornando-os menos propensos à lise, tanto durante o isolamento como durante a transferência do carioplasto<sup>22</sup>, e o envelope do HVJ para induzir uma fusão de membrana eficiente, uma vez que previne uma ativação prematura<sup>22</sup>. Os estudos realizados sobre estes compostos revelaram que, caso usados de modo correto, são seguros, não tendo sido encontrada nenhuma possível consequência futura.<sup>22</sup>

Para esta técnica ser segura e eficaz, a quantidade de mtDNA do ovócito que fornece o fuso materno deve ser pouca ou idealmente nula, sendo que para a maioria das doenças relacionadas com o mtDNA é necessário atingir-se um limiar mínimo de 60% de mtDNA mutado para se manifestar clinicamente doença<sup>21</sup>. Após alguns testes, chegou-se à conclusão que esta técnica aparenta ter um “*carryover*” de mtDNA desprezável, ou é indetetável ou é inferior a 1%, podendo segundo alguns estudos ir até 3% de heteroplasmia.<sup>20,21,22</sup> Este valor é suficiente para prevenir doença bem como a sua transmissão às gerações futuras.<sup>22</sup>

Adicionalmente, estudos efetuados em células estaminais embrionárias provenientes de blastocistos humanos que resultaram da TFM revelaram que a expressão dos marcadores de pluripotência, os perfis metabólicos bem como o cariótipo eram normais.<sup>18</sup> A análise do mtDNA nas células estaminais embrionárias bem como nas linhagens celulares delas derivadas revelou também níveis muito baixos (tipicamente <1%), de mtDNA associado ao carioplasto.<sup>18</sup>

Por fim, estudos desenvolvidos em primatas revelaram um desenvolvimento até à idade adulta normal.<sup>7</sup>

## **Vantagens**

O fuso materno não possui mitocôndrias e, para além de ser relativamente pequeno, contém muito pouco citoplasma, havendo um baixo risco de “*carryover*” de mtDNA mutado.<sup>5,18,22</sup>

Adicionalmente, esta técnica não necessita de maturação *in vitro* antes da fertilização, podendo esta ocorrer após a TFM, o que não ocorre na transferência da vesícula germinal.<sup>22</sup>

Esta técnica, ao contrário da TPN, não requer a destruição de zigotos para obter citoplastos, uma vez que utiliza ovócitos enucleados. Assim pode-se argumentar que tem menos implicações éticas que a TPN.<sup>22</sup>

Por último, sabe-se que esta técnica funciona em humanos, uma vez que culminou com o nascimento de uma criança em 2016, com publicação do nascimento em 2017.<sup>23</sup> Foi escolhido para implantação um blastocisto euploide masculino contendo 5,7% de mtDNA mutado, sendo que o recém-nascido, à altura, aparentava ser saudável.<sup>23</sup> Este nasceu com uma carga de mutação do mtDNA entre 2,36% e 9,23% em cada tecido (âmnio, 6,77%; epitélio bucal, 3,52%; prepúcio, 9,23%; folículos pilosos, 5,59%; e precipitado de urina, 2,36%).<sup>12</sup> O bebé apresentava-se saudável aos 7 meses de idade.<sup>12</sup> Contudo, é crucial uma vigilância muito apertada e prolongada.

No entanto, este nascimento veio também reiterar que apesar da técnica funcionar, ainda é necessário mais estudos acerca destas técnicas, bem como um entendimento mais pormenorizado dos vários processos que ocorrem *in vitro* e *in vivo* e que vão influenciar, por exemplo, a percentagem de mtDNA mutado que vai ficar em diferentes células dos vários tecidos, e que repercussões isso terá quer nas pessoas resultantes deste tipo de técnicas, quer nos seus futuros descendentes.

No caso referido anteriormente, apenas se conseguiram valores de “*carry over*” inferiores a 6% para os blastocistos obtidos,<sup>12,20, 23</sup> apesar da maioria dos estudos mencionarem taxas de “*carry over*” inferiores a 3%.<sup>23</sup> Adicionalmente, também relataram num estudo feito em células estaminais embrionárias derivadas de blastocistos que nem todos os grupos de células estudados mantiveram a quantidade de “*carry over*” sempre estável, tendo havido algumas variações por motivos ainda desconhecidos.<sup>23</sup> Como tal, é necessário um conhecimento mais aprofundado para se implementar esta técnica na prática clínica com segurança.

Por fim, sabe-se que é reprodutível e eficaz<sup>24</sup> tendo sido isto provado por laboratórios independentes.<sup>22</sup>

## **Criopreservação**

Uma vez que os protocolos iniciais de TFM utilizavam ovócitos a fresco, podia levantar-se o problema de ser difícil ter uma estimulação ovárica síncrona da doente e da dadora.

Em macacos sabe-se que, se a vitrificação for feita de modo adequado, é possível proceder a TFM utilizando ovócitos vitrificados como fornecedores do fuso, sendo que o ovócito que vai dar origem ao citoplasto deve ser colhido no dia do procedimento.<sup>22</sup> No caso dos humanos, os estudos revelaram que a taxa geral de fertilização usando ovócitos vitrificados foi comparável à transferência de fuso a fresco, enquanto a formação de zigotos diploides normais foi reduzida. Quanto ao desenvolvimento, este foi semelhante, exceto quanto à fertilização normal, que foi significativamente menor nos grupos em que ocorreu transferência de fuso colhido de um ovócito criopreservado na prófase 2 da meiose.<sup>25</sup>

### **Limitações**

Os fusos meióticos, por motivos que ainda não são bem entendidos, mas que se acredita serem devidos à manipulação, em alguns casos são ativados prematuramente, o que leva a uma atividade meiótica incompleta e desadequada após a fertilização, com padrões de fertilização anormais presentes em quase metade dos zigotos<sup>12</sup>; tal não se verifica em ovócitos de controle.<sup>21</sup>

Adicionalmente, em alguns casos limitados verifica-se uma reversão do mtDNA da dadora para o mtDNA mutado em células estaminais embrionárias,<sup>25</sup> que se acredita ser devido a polimorfismos que conferem uma vantagem replicativa às mitocôndrias afetadas.<sup>4</sup>

### **Limitações ultrapassadas**

Algumas limitações técnicas também foram já ultrapassadas como:

A dificuldade de visualizar o fuso na MII, que atualmente é possível utilizando um microscópio de luz polarizada;<sup>22</sup> a dificuldade em isolar de modo confiável e transferir os fusos em MII, que atualmente é possível utilizando uma objetiva laser;<sup>22</sup> a ativação prematura à qual o fuso em MII é suscetível (e que pode levar a problemas como um número anormal de pronúcleos<sup>18</sup>) foi resolvida com o uso do envelope do HVJ).<sup>22</sup>

Relativamente ao HVJ, apesar de altas concentrações deste vírus estarem associadas a um aumento de fertilizações humanas anormais, esta limitação é ultrapassada com a diminuição da concentração do mesmo.<sup>22</sup>

Uma incompatibilidade nuclear e mitocondrial, ou interações inapropriadas entre o mtDNA e o DNA nuclear podem ser preocupações legítimas, uma vez que pode haver um impacto negativo quer na produção de adenosina trifosfato (ATP) quer numa seleção que leve a proliferação de haplótipos de mtDNA defeituosos<sup>22</sup>. No entanto, alguns estudos realizados em macacos *Rhesus* não mostraram diferenças entre macacos normais e macacos em que foi feito TFM, concluindo que é pouco provável ocorrerem interações adversas entre o mtDNA e o nDNA em primatas não humanos, que possam por em causa uma normal progressão do desenvolvimento.<sup>20,21,22</sup>

Adicionalmente, não se verificou em macacos resultantes de TFM nem segregação do mtDNA para determinados tecidos nem aumentos na heteroplasmia.<sup>22</sup>

No entanto, e por vários mecanismos ainda não muito bem compreendidos, é clara a necessidade de estudos adicionais de modo a chegar a uma combinação adequada de haplótipo de mtDNA entre a dadora e a doente para evitar deriva genética peri-implantação ou efeito “*bottleneck*” a nível mitocondrial, de modo a ter uma técnica segura para aplicação clínica e que garanta resultados a longo prazo.<sup>22</sup>

Pode-se ainda colocar o problema de haver segregação do mtDNA mutado em tecidos específicos durante o desenvolvimento, que com o tempo leva a um efeito cumulativo que pode levar a doença. No entanto, em estudos com macacos (*rhesus*) com um *follow up* de 3 anos, os macacos resultantes de TFM, em amostras de sangue e de pele, não apresentaram mudanças significativas na transmissão de mtDNA nem nos níveis de heteroplasmia mitocondrial durante o desenvolvimento pós-natal durante os 3 anos.<sup>21</sup>

### **Perspetivas futuras**

Esta técnica também foi aplicada em ovócitos criopreservados de macacos, tendo-se transferido fusos provenientes de ovócitos criopreservados na prófase 2 da meiose, para ovócitos enucleados frescos, com bons resultados relativamente aos controlos<sup>21</sup>. Assim, para além de funcionar como uma terapia de substituição mitocondrial, a TFM pode também vir a ser usada para resgate de ovócitos que não foram criopreservados da forma ideal, por meio do transplante do fuso do ovócito criopreservado para um ovócito enucleado fresco.<sup>21</sup>

Esta técnica pode vir a ser utilizada em doentes oncológicas que fizeram criopreservação de ovócitos ou em mulheres de idade mais avançada e com baixa reserva ovocitária, uma vez que ao transferir o fuso materno, conforme a fase em que os ovócitos tenham

sido criopreservados, podem-se obter 2 ou 4 células que poderão vir a dar origem a zigotos. No entanto, esta técnica ainda não está suficientemente desenvolvida para ser utilizada em tratamentos de infertilidade, já para não falar nas questões éticas a serem ultrapassadas nomeadamente no que toca ao sexo do embrião. Por um lado, escolher embriões masculinos iria, em teoria, prevenir possíveis transmissões de mtDNA mutado a futuras gerações, tornando teoricamente a técnica mais segura. Por outro, não é claro que esta escolha possa ser eticamente aceitável, sendo necessário ultrapassar questões como o destino a dar a embriões femininos, entre outras.<sup>22</sup>

### 3) Transferência do genoma do corpo polar 1 (TGCP1)

Nesta técnica transfere-se o núcleo do 1º globo polar (célula diploide que se origina da 1ª divisão meiótica que ocorre na formação do ovócito<sup>5</sup>), para um citoplasto (originado da enucleação de um ovócito em MII) de uma dadora,<sup>26</sup> formando um ovócito com o material genético nuclear da dadora do corpo polar, mas com mtDNA da dadora do citoplasto.<sup>5</sup> (Figura 4).

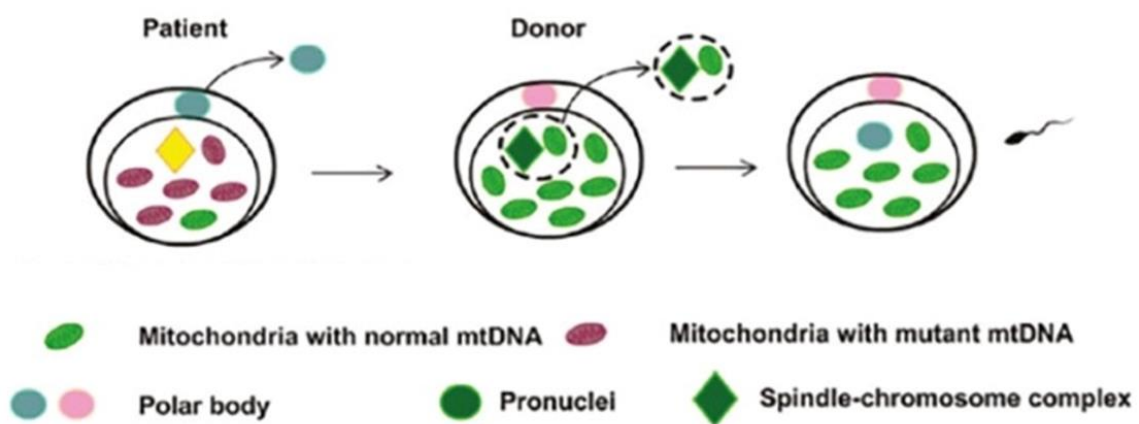


Figura 4. Transferência do genoma do corpo polar 1. Adaptado de: Farnezi HCM, Goulart ACX, Santos AD, Ramos MG, Penna MLF. Three-parent babies: Mitochondrial replacement therapies. JBRA Assist Reprod 2020;24(2):189-196.

O corpo polar 1 (CP1) é expelido no fim da 1ª divisão meiótica, não sendo necessária fertilização para este estar disponível. A colheita faz-se juntamente com o ovócito que lhe deu origem (que se encontra em MII aquando da colheita).

Apesar dos zigotos originários desta técnica progredirem para blastocistos com menos frequência (42%) do que os controlos (75%), várias análises indicam que os que progredem até zigoto não apresentam diferenças relativamente aos zigotos de controlo.<sup>26</sup>

## **Vantagens**

Com o recurso a CP1, temos acesso a uma terapia de substituição mitocondrial importante, uma vez que o corpo polar possui poucas mitocôndrias<sup>20</sup> devido à divisão desigual de citoplasma durante a meiose, o que diminui o risco de transferir mitocôndrias da doente inadvertidamente para o citoplasto, sendo que alguns estudos apontam para um “*carry-over*” em blastocistos tecnicamente indetetável ou inferior a 1%<sup>5,20</sup>. Adicionalmente, esta técnica pode ainda ser combinada com outras técnicas como a TFM, para uma maior taxa de sucesso.<sup>26</sup>

Para além de TSM, esta técnica pode também ser usada como uma fonte até agora não aproveitada de ovócitos, uma vez que ao resgatar o CP1, aumenta-se o rendimento de ovócitos disponíveis de um ciclo de estimulação, o que leva a melhores resultados de técnicas de fertilidade, bem como de taxas de gravidez superiores.<sup>26 27</sup>

Este último ponto é ainda mais relevante tendo em conta o aumento da idade materna, que se tem vindo a verificar principalmente nos países desenvolvidos<sup>27</sup>, com a consequente diminuição da reserva ovárica, podendo ser também aplicado em diversas outras situações de infertilidade em que há uma diminuição do número de ovócitos disponíveis.

Adicionalmente, a TGCP1, como utiliza micromanipulações, não necessita de compostos que sejam disruptores do citoesqueleto, o que é benéfico uma vez que estes podem estar associados a maior risco de lesão.<sup>5</sup>

Por fim, a transferência de corpos polares 1 criopreservados para um citoplasto proveniente de um ovócito colhido aquando da transferência não compromete a taxa de fertilização (75,0%) ou as taxas de evolução até blastocisto (50,0%) quando comparado com ovócitos controlo não manipulados (84,2% e 43,8%, respetivamente).<sup>12</sup> Tal torna esta técnica vantajosa, uma vez que permite colheitas em tempos diferentes dos ovócitos que vão fornecer o nDNA e o mtDNA.

## **Limitações**

Apesar de ser possível obter zigotos de um modo semelhante aos controlos, com esta técnica muitos destes não chegam à fase de blastocisto<sup>20,26</sup>, sendo necessário mais trabalho nesta área para a técnica poder ter uma boa aplicação clínica. No entanto, é de mencionar que um estudo de 2019 de Tang *et al*<sup>20</sup> que comparou várias técnicas de substituição mitocondrial (TGCP1; Transferência do genoma do corpo polar 2 protocolo B (TGCP2b); TFM; TPN) chegou à conclusão que as taxas de formação de blastocistos eram semelhantes entre elas.<sup>20</sup>

Adicionalmente, apesar de teoricamente ser possível aumentar o número de ovócitos disponíveis para técnicas de fertilidade com o aproveitamento do CP1, isto só se verifica caso a doente ainda tenha alguns folículos viáveis, não sendo uma terapia que se possa oferecer a mulheres sem reserva ovocitária.<sup>26</sup>

Outra limitação deve-se ao facto desta técnica ser muito dependente de operador, uma vez que se tratam de procedimentos que requerem um alto grau de qualificação, sendo que o grau de dano dos ovócitos bem como os níveis de transferência accidental de mtDNA podem variar de operador para operador.<sup>20</sup>

## **Limitações ultrapassadas**

O corpo polar 1 não contém fusos meióticos, no entanto, quando se funde um CP1 com um citoplasto em metáfase II, a maioria forma fusos meióticos no espaço de 1 hora após a fusão.

Contudo nem todos são fusos semelhantes aos observados em ovócitos em MII (sendo que alguns apresentam-se em prófase ou em anáfase)<sup>26</sup>.

Os fusos com apresentação em MII normalmente após ICSI apresentam uma progressão até zigotos, bem como uma capacidade pluripotente comparável à dos controlos.<sup>26</sup>

### 4) Transferência do genoma do corpo polar 2 (TGCP2)

Esta transferência pode ser alcançada de 3 formas:

#### **Convencional**

Na transferência do genoma do corpo polar 2 convencional, o núcleo de um corpo polar 2 (CP2) é isolado de um zigoto dador e transplantado para um zigoto recetor que foi



semi-enucleado, tendo-lhe sido removido o pronúcleo feminino. Este zigoto reconstruído é depois desenvolvido *in vitro* até atingir a fase de blastocisto.<sup>20</sup> (Figura 5).

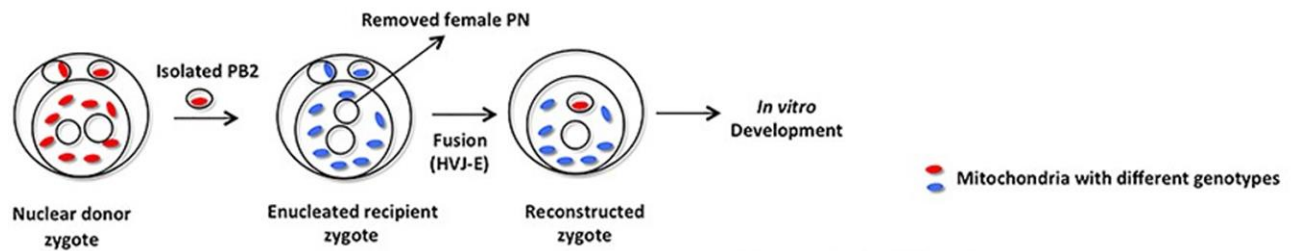


Figura 5. Transferência do genoma do corpo polar 2 método convencional. Adaptado de: Tang M, Guggilla RR, Gansemans Y, Van der Jeught M, Boel A, Popovic M, et al. Comparative analysis of different nuclear transfer techniques to prevent the transmission of mitochondrial DNA variants. Mol Hum Reprod 2019;25(12):797-810.

### Protocolo A

No protocolo A, o núcleo de um CP2 é colhido de um zigoto dador e é introduzido num ovócito em metáfase II anteriormente enucleado. Para isto ocorrer com sucesso, é necessário utilizar o envelope do HVJ, havendo posteriormente a formação de um fuso de novo. Após a fusão o ovócito reconstruído é submetido a ICSI e exposto à citocalasina D (Cyto D) por 4 h. No fim das 4h é cultivado *in vitro* até atingir a fase de blastocisto.<sup>20</sup> (Figura 6).

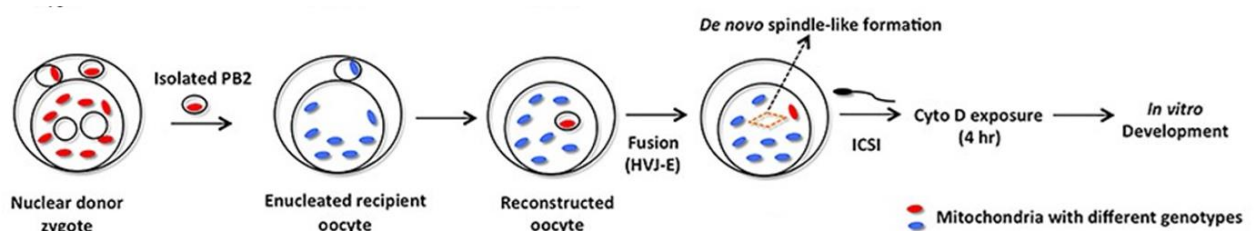


Figura 6. Transferência do genoma do corpo polar 2 protocolo A. Adaptado de: Tang M, Guggilla RR, Gansemans Y, Van der Jeught M, Boel A, Popovic M, et al. Comparative analysis of different nuclear transfer techniques to prevent the transmission of mitochondrial DNA variants. Mol Hum Reprod 2019;25(12):797-810.

### Protocolo B

Neste protocolo inicialmente faz-se a enucleação de um ovócito em metáfase II. De seguida injeta-se um espermatozoide dentro deste como num procedimento de ICSI; após a formação do pronúcleo masculino (que para os humanos demora cerca de 16

horas), o núcleo do corpo polar 2 colhido de um zigoto dador é transplantado para a célula que contém o pronúcleo masculino. Para se dar uma fusão com sucesso é também necessário utilizar o envelope do HVJ. Após isto procede-se ao desenvolvimento *in vitro* até se atingir o estágio de blastocisto.<sup>20</sup> (Figura 7).

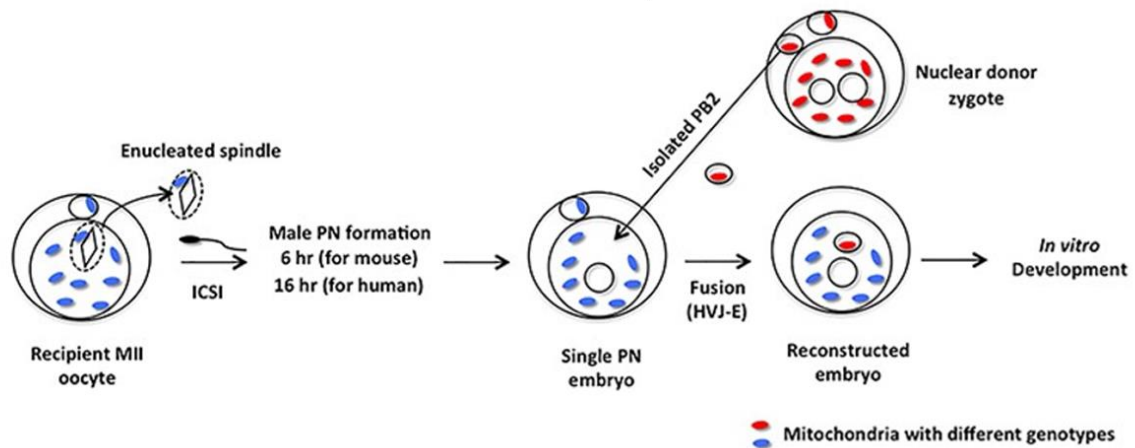


Figura 7. Transferência do genoma do corpo polar 2 protocolo B. Adaptado de: Tang M, Guggilla RR, Gansemans Y, Van der Jeught M, Boel A, Popovic M, et al. Comparative analysis of different nuclear transfer techniques to prevent the transmission of mitochondrial DNA variants. Mol Hum Reprod 2019;25(12):797-810.

## Vantagens

Como mencionado para a TGCP1, na TGCP2 também há menos risco de uma transferência acidental de mitocôndrias, uma vez que com a divisão desigual de citoplasma, estas células acabam por ser pobres em mitocôndrias.<sup>5,20</sup> O “*carry over*” em blastocistos resultantes de TGCP2b é tecnicamente indetetável ou inferior a 1%.<sup>20</sup> Deste modo não há comprometimento do desenvolvimento embrionário, apesar de ser ainda necessária mais pesquisa até se poder implementar na prática clínica.<sup>20</sup>

Relativamente à TGCP2b, há ainda a mencionar que este procedimento, de todos, acaba por ser o mais refinado, uma vez que a célula recetora do núcleo do CP2 apenas contém o pronúcleo masculino<sup>20</sup>, eliminando-se passos onde possa haver problemas/erros como no caso da técnica convencional, em que se tem de remover o pronúcleo adequado,<sup>28</sup> ou como na TGCP2 protocolo A em que é necessário haver a formação de um fuso de novo. Assim contornamos o problema de distinguir os pronúcleos femininos e masculino, uma vez que o ovócito em MII é enucleado, sendo depois fertilizado através de uma ICSI.<sup>20</sup>

É também de referir que dentro das técnicas que fazem uso do CP2, segundo testes realizados em murganhos, a TGCP2b teve taxas de formação de blastocistos maiores (86.5%) do que a transferência do genoma do corpo polar (TGCP) convencional (70.7%), podendo esta técnica vir a revelar-se dentro das TGCP2 como a mais vantajosa para a clínica, apesar de mais estudos serem necessários.<sup>20</sup>

Estudos feitos com corpos polares 2 humanos utilizando a técnica TGCP2b demonstraram que quer a taxa de blastocistos obtida quer a sua qualidade eram comparáveis às dos controlos.<sup>20</sup>

### **Limitações**

Uma vez que esta técnica exige fecundação de modo a obter-se CP2, o destino a dar-se ao zigoto pode suscitar problemas éticos.

Como mencionado na TGCP1, esta técnica também é muito dependente do operador.<sup>20</sup>

Uma outra limitação é que, quando comparada com técnicas como transferência do fuso meiótico ou transferência do pronúcleo, em que já houve bastantes estudos, esta técnica apresenta menos dados na literatura, no que toca à prevenção de doenças mitocondriais.<sup>20</sup>

### **Vantagens da transferência de corpos polares**

Como mencionado anteriormente, os corpos polares são pobres em mitocôndrias. Assim, o seu uso em técnicas de substituição mitocondrial diminui a probabilidade de uma transferência acidental de mitocôndrias afetadas, sendo que num estudo de Tang *et al* (2019)<sup>20</sup> chegou-se à conclusão que se verificavam níveis significativamente mais baixos de “*carry-over*” de mtDNA em blastocistos reconstituídos após TGCP1 (0,62%) e TGCP2b (0,91%) do que blastocistos resultantes de TFM (3,57%) e TPN (4,13%).<sup>20</sup>

Adicionalmente, em estudos feitos com murganhos em que se reproduziram, através de acasalamento natural, animais resultantes de TGCP (F0), análises genéticas confirmaram que a prole desses animais (F1) possuía níveis mínimos de “*carry-over*” de mtDNA (F1-TGCP1: 0%; F1-TGCP2: 1,7%), sendo estes níveis muito mais baixos do que quando os progenitores (F0) eram resultantes de TFM (F1-TFM: 5,5%) e TPN (F1-TPN: 23,7%).<sup>12</sup> O mesmo verificou-se na geração seguinte (F2) resultante também de acasalamento natural (F2-TGCP1: 0%, F2-TGCP2: 2,9%, F2-TFM: 7,1%, F2-TPN: 22,1%).<sup>12</sup>

É também de referir que aplicando a TGCP1 com a TFM ou a TGCP2b com a TPN de um ovócito/zigoto consegue-se obter dois genomas nucleares,<sup>12</sup> duplicando assim o número total de embriões reconstruídos disponíveis para a uso, e por consequência aumentando em teoria a eficiência do tratamento de substituição mitocondrial.<sup>7,20</sup>

#### 5) Transferência da vesícula germinativa (TVG)

A vesícula germinativa é o núcleo de um ovócito imaturo na prófase I da primeira meiose.<sup>28</sup> Nesta técnica transfere-se a vesícula germinativa para um ovócito cuja vesícula germinativa foi removida; esta nova célula é então maturada *in vitro* e depois é sujeita a FIV.<sup>28</sup> (Figura 8).

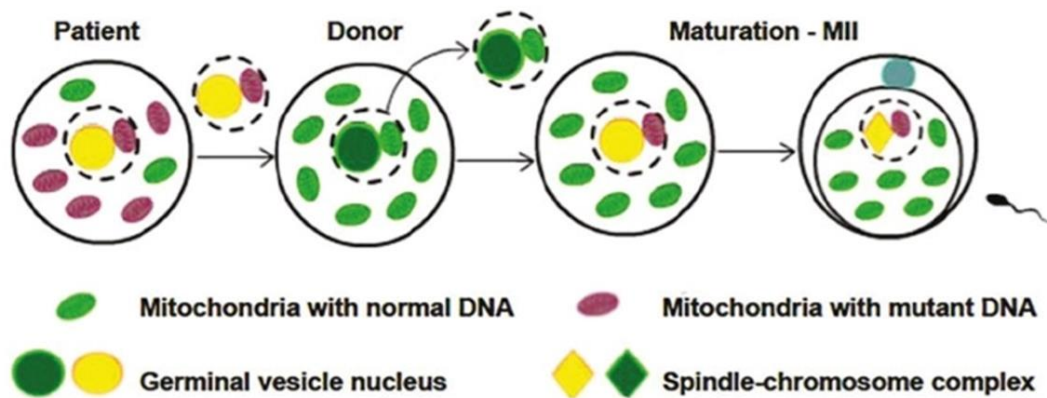


Figura 8. Transferência da vesícula germinativa. Adaptado de: Farnezi HCM, Goulart ACX, Santos AD, Ramos MG, Penna MLF. Three-parent babies: Mitochondrial replacement therapies. JBRA Assist Reprod 2020;24(2):189-196.

Esta técnica foi desenvolvida inicialmente para tratar a infertilidade em mulheres mais velhas,<sup>28</sup> uma vez que, em teoria, esta técnica permite evitar aneuploidias causadas pelo envelhecimento.<sup>29</sup> No entanto, também pode ser utilizada como uma TSM.

#### Vantagens

Um grande número de aneuploidias deriva da não disjunção e desalinhamento cromossômico na metáfase I. Sabe-se também que há uma relação entre envelhecimento ovocitário (idade materna) e o risco de aneuploidias, devidas a erros na segregação que ocorrem por não disjunção dos cromossomas bivalentes durante a

metáfase I.<sup>29</sup> Assim, como esta técnica é realizada antes do início da metáfase I, pode vir a ser um tratamento promissor para evitar disjunções anormais quer na metáfase I quer na metáfase II.<sup>29</sup>

### **Limitações**

Na realidade, até ao momento, não há nenhum relato de que a maturação *in vitro* necessária tenha sido completada com sucesso<sup>29</sup>, sendo que um estudo comparativo feito em 2020 revelou que nenhum ovócito resultante de TVG atingiu a metáfase I, tendo o grupo controlo apresentado taxas de metáfase I de 50%.<sup>30</sup> Assim, para já esta técnica na prática ainda não é viável.

#### **6) Transferência de citoplasma**

Esta técnica consiste em transferir 5 a 15% do citoplasma de uma dadora saudável, contendo mitocôndrias, proteínas, e outros organelos, para o ovócito de uma doente.<sup>28</sup>

Dentro desta técnica há ainda vários subtipos como a transferência citoplasmática síncrona, transferência citoplasmática assíncrona com uso de um ovócito em metáfase II criopreservado e transferência citoplasmática assíncrona usando ovócitos em metáfase II descartados.<sup>30</sup>

Esta técnica é mais usada em contextos de infertilidade<sup>31</sup> para ovócitos referenciados como de baixa qualidade citoplasmática, segundo critérios que os autores não apresentam,<sup>28</sup> não sendo adequada para prevenção de patologia mitocondrial e motivo pelo qual não irá ser mais explorada neste trabalho.

### **Aplicações clínicas**

A disfunção mitocondrial está na origem de várias doenças<sup>5</sup> e contribui para a infertilidade relacionada com a idade materna. As terapias de substituição mitocondrial em ovócitos ou zigotos, como transferência do pronúcleo, transferência do fuso materno ou TGCP podem prevenir a transmissão dos defeitos de mtDNA às gerações futuras, bem como fornecer importantes alternativas no arsenal terapêutico contra a infertilidade relacionada com a idade materna avançada.<sup>7</sup> Assim, há a destacar algumas das aplicações clínicas que as TSM, tem ou poderão vir a ter no futuro.

## 1) Prevenção de doenças

Estima-se que um em cada 200 nascimentos apresente mutações de mtDNA. Atualmente estão descritas mais de 200 mutações de mtDNA que causam doenças mitocondriais humanas, tendo a primeira sido descrita em 1988.<sup>12</sup> A maior parte destas ocorrem num contexto heteroplasmático.<sup>12</sup> As doenças associadas a mutações do mtDNA afetam diversos órgãos e tecidos, têm uma apresentação extremamente variável, alta complexidade genética, bioquímica e clínica, o que dificulta a previsão da progressão da doença, bem como o desenvolvimento de estratégias terapêuticas,<sup>4,32</sup> sendo que são responsáveis ou contribuem para variadíssimas patologias.<sup>33</sup>

Como mencionado anteriormente as TSM tem a capacidade de diminuir significativamente<sup>23</sup>(eventualmente eliminar) a transmissão de mtDNA da doente para os seus descendentes sendo claro o grande potencial que estas técnicas apresentam para a prevenção da transmissão de doenças relacionadas ao mtDNA.<sup>28</sup>

## 2) Infertilidade

A idade materna avançada é considerada a principal causa de infertilidade nos países desenvolvidos, tendo-se vindo a verificar um aumento da idade materna ao nascimento do 1º filho. Com o aumento da idade materna ocorre também um declínio na produção de ovócitos e nas taxas de embriões euploides,<sup>5,27</sup> com o aumento do número de fetos aneuploides em abortos espontâneos de acordo com a idade feminina, chegando a mais de 90% em mulheres com mais de 40 anos.<sup>29</sup>

As aneuploidias embrionárias muitas vezes ocorrem por incapacidade de organizar os microtúbulos durante a montagem do fuso meiótico, uma vez que é necessário bastante ATP produzido pelas mitocôndrias nesta etapa.<sup>27,29</sup> Uma vez que se sabe que os níveis de ATP estão correlacionados com a melhoria dos resultados da fertilização *in vitro* em ovócitos humanos, tem-se atribuído o aumento da probabilidade de erro durante a segunda divisão meiótica a disfunções mitocondriais.<sup>27,28</sup>

Adicionalmente, sabe-se que nem todos os abortos são devido a anomalias cromossômicas. Estima-se que 40%-50% de todos os embriões de mães com idade avançada em que ocorreu um aborto são euploides, mas apresentam disfunção citoplasmática.<sup>29</sup> Para além disso, verificou-se que ovócitos de mulheres mais velhas têm menos cópias de mtDNA quando comparado ao número de cópias encontradas em mulheres mais jovens.<sup>28</sup>

Todos estes fatores diminuem a eficácia das técnicas de reprodução medicamente assistida, que depende muito da qualidade e do número de ovócitos disponíveis.<sup>28</sup>

Assim, as TSM apresentam um grande potencial de resolver algumas situações de infertilidade.

Em primeiro lugar, com TSM fornece-se ao núcleo mitocôndrias, RNA mensageiro, microRNA e fatores epigenéticos (como DNA metil transferase e histona desacetilase), sendo que, com esta suplementação, algumas aneuploidias causadas por não disjunção na meiose II, divisão prematura de cromossomas, disfunções mitocondriais, etc. podem ser corrigidas.<sup>29</sup>

De todas, a TFM pode ser a mais adequada, uma vez que permite atingir níveis muito baixos de “*carry over*” quando comparado com por exemplo TPN, para além de não exigir a destruição de pronúcleos humanos, o que permite contornar questões éticas que podem existir na TPN.<sup>29</sup> Assim, com recurso a TFM podemos ter uma ferramenta de resgate de ovócitos envelhecidos com um papel importante nas técnicas de reprodução medicamente assistida em situações de infertilidade feminina de causa ovocitária.

Apesar da TGCP não ser aplicável a mulheres que não produzem ovócitos maduros,<sup>28</sup> é também de referir que aplicando a TGCP1 ou a TGCP2b de um ovócito/zigoto consegue-se obter dois genomas nucleares,<sup>12</sup> duplicando assim o número total de embriões disponíveis para a uso, e por consequência, melhorando em teoria os resultados do tratamento de reprodução assistida e taxas de gravidez, especialmente para mulheres mais velhas com diminuição reserva ovocitária.<sup>26, 28</sup>

Para além disso, segundo um estudo feito em 2020 que reviu a literatura sobre novas abordagens a doentes com má resposta ovárica, as TSM eram as únicas de entre as novas abordagens disponíveis (como infusão intra ovárica de plasma rico em plaquetas e transplante autólogo ovárico de células estaminais) que permitiam restaurar a qualidade do ovócito, tendo a informação sido colhida de pequenos estudos observacionais.<sup>34</sup>

Por fim, é de mencionar que o uso de técnicas de doação mitocondrial (mas sem substituição) não é inaudito, havendo já um relato de 1997 em que se recorreu a transferência de citoplasma (ovoplasma) para restaurar a fertilidade de ovócitos de uma mulher mais velha (39 anos) com mitocôndrias doadas de uma mulher mais nova (27 anos), resultando em 6 ovócitos de 14 reconstruídos com um normal desenvolvimento após fertilização e no nascimento de uma menina.<sup>28</sup>

No entanto, apesar de todos os argumentos a favor, há ainda algumas objeções a serem ultrapassadas, nomeadamente o facto de o nDNA nos ovócitos de mulheres mais velhas já estar ele próprio afetado pelo longo período até à ovulação, e que não é possível restaurar o nDNA a um estado mais jovem mesmo com doação de citoplasma saudável com fatores benéficos na atividade epigenética.<sup>29, 35</sup> É necessária ainda mais pesquisa para se utilizar este tipo de técnicas de forma segura e de forma adequada às necessidades individuais de cada doente,<sup>34</sup> no tratamento da infertilidade.

### 3) Casais homossexuais femininos

Como as TSM permitem a existência de um mtDNA e de um nDNA que tem origem em duas mulheres diferentes, tem sido proposta como uma opção reprodutiva para casais de mulheres que desejam conceber uma criança portadora de material genético proveniente de ambas.<sup>36</sup> No entanto, esta vertente da sua aplicação está envolvida em várias questões do foro bioético/legislativo/filosófico, mais do que propriamente científico, com vários argumentos a favor e contra.<sup>36, 37, 38</sup>

A favor há, por exemplo, o argumento da liberdade reprodutiva.<sup>36</sup>

Nos argumentos contra, há o facto de que a descendência biológica não é um direito, e que estes pedidos não são uma necessidade, mas sim um desejo, por uma suposta filiação genética.<sup>37</sup> Todos estes problemas são ainda complicados pela dificuldade em definir a importância do contributo do mtDNA e que direitos e deveres tem a dadora.<sup>2</sup>

## **Vantagens**

### 1) Vantagens sobre DGPI

Os DGPI baseiam-se na análise genética de uma ou várias células obtidas na fase de clivagem e/ou na fase de blastocisto. Esta abordagem permite a seleção de embriões livres de mutação ou embriões com baixa carga de mutação<sup>17, 18</sup>, antes da transferência para o útero.<sup>12</sup> Já ocorreram vários nascimentos em que se utilizou esta técnica, em casos de patologia mitocondrial.

Contudo, a segregação do mtDNA é feita de modo estocástico não Mendeliano,<sup>12</sup> sendo radicalmente diferente do tipo de segregação observada para os genes nucleares.<sup>39</sup>

Apesar do teste genético pré-implantação ser útil para reduzir risco de patologia mitocondrial, este tem várias limitações. Por exemplo, não é útil para mulheres que



apresentem mutações no mtDNA em homoplastia<sup>12,17</sup> (todas as cópias do mtDNA são mutadas<sup>17</sup>), ou mulheres com cargas de mutação heteroplásmicas (em que existe uma mistura de mtDNA mutado e “wild-type”<sup>17</sup>) de mtDNA próximas ao limiar de doença.<sup>4,18</sup>  
<sup>40</sup> No caso de mulheres com mutações em heteroplasmia, estas vão produzir ovócitos com cargas de mutação amplamente variadas e, embora a patogenicidade geralmente seja proporcional à proporção de mtDNA mutado para “wild-type”, a gravidade da doença para uma determinada carga de mutação pode variar<sup>17</sup>, o que dificulta ainda mais um DGPI.

Adicionalmente, embora haja fortes correlações, nos seres humanos, entre a trofoectoderme e o blastocisto, relativamente aos níveis de heteroplasmia de mtDNA, a variação desses níveis entre os blastómeros de embriões em estágio de clivagem, nem sempre é pouca, sendo que a frequência varia de autor para autor.<sup>12,41,42</sup> Assim, ao assumir que o nível de heteroplasmia diagnosticado é representativo do embrião inteiro e que não mudará com o tempo, corre-se o risco de no futuro haver crianças com doença que apresentavam um DGPI compatível com uma transferência para o útero segura.<sup>4</sup>

Deste modo, um DGPI para prever o risco de doença relacionada com alterações do mtDNA torna-se bastante difícil.<sup>17,43</sup> Como tal, é evidente a necessidade de outras ferramentas para lidar com a patologia mitocondrial.

As TSM reduzem o risco de transmissão de doenças relacionadas com o mtDNA, ao separarem a transmissão de nDNA do mtDNA, com o objetivo de permitir que mulheres portadoras de mutações no mtDNA tenham filhos geneticamente relacionados, mas livres de doença.<sup>18</sup>

## 2) Vantagens das TSM

Hoje em dia sabe-se que o genoma materno é compatível com diferentes genótipos mitocondriais, e os genótipos mitocondriais são funcionalmente compatíveis com o nDNA da doente,<sup>44</sup> sendo que a herança vertical de mtDNA (ou seja, a presença exclusiva de mtDNA herdado da mesma mulher que fornece o nDNA do ovócito) não é necessária para assegurar uma função mitocondrial normal.<sup>12</sup> Apesar da mistura de mtDNA com nDNA de diferentes mulheres ter sido uma preocupação em tempos<sup>3,11</sup>,  
<sup>20</sup> por possíveis efeitos deletérios que daí pudessem advir, atualmente há poucas evidências de que as TSM possam ter interações mito-nucleares deletérias, uma vez que o procedimento em humanos leva à expressão genética normal em blastocistos.<sup>28</sup> Adicionalmente, na reprodução humana natural as mitocôndrias têm sempre contacto

com novo nDNA, uma vez que estas nunca interagiram com a metade do genoma nuclear que vem do pai, <sup>28</sup> o que não resulta em nenhum efeito nocivo que se tenha conhecimento.

Para além disso, sabe-se que as TSM não comprometem a função mitocondrial das células estaminais, nem o desenvolvimento pré-implantatário <sup>12</sup>, com todas as evidências a sugerirem que os níveis de “*carry-over*” de mtDNA da doente, na maior parte dos casos, se mantém baixos nas linhagens de células estaminais e células derivadas, com origem em células resultantes de TSM. <sup>44</sup>

Por fim, com a possibilidade de criopreservação <sup>44</sup>, já anteriormente abordada nas técnicas individuais, as TSM tornam-se uma alternativa com verdadeiro potencial para a prática clínica.

## **Problemas**

### 1) Desvantagens/ Limitações

Apesar da quantidade de “*carry-over*” de mtDNA em ovócitos humanos durante a transferência nuclear ser baixa (é habitual conseguir-se atingir níveis inferiores a 0,5%)<sup>12</sup>, a presença de heteroplasmia, por muito baixos que sejam os níveis de mtDNA continua a ser um motivo de preocupação no que toca à segurança das TSM,<sup>3, 44</sup> uma vez que podem por em causa a estabilidade do genótipo do mtDNA e comprometer a eficácia da substituição mitocondrial,<sup>12, 44</sup> com uma possível deriva genética seja esta estocástica ou direcional nas linhagens de células estaminais resultantes destas técnicas.<sup>12,45</sup>

Um estudo feito com células estaminais humanas revelou que apesar dos níveis baixos de heteroplasmia (introduzidos em ovócitos por “*carry-over*” mitocondrial durante a transferência nuclear) muitas vezes desaparecerem, por vezes ocorre deriva genotípica com reversão do mtDNA ao genótipo original.<sup>44</sup>

Assim, com uma carga de mutação que pode ser diferente de célula para célula e de tecido para tecido, os riscos de recorrência são difíceis de estimar, não sendo possível assegurar totalmente a prevenção da transmissão de patologia mitocondrial.<sup>28</sup>

Adicionalmente, se for tido em conta que pode haver uma incompatibilidade entre o mtDNA da dadora e da recetora (mtDNA-mtDNA), e/ou uma segregação replicativa de mtDNA,<sup>3</sup> ainda maior se torna o risco de que a presença de heteroplasmia, por menor que seja, juntamente com a possibilidade destas várias interações, possa levar à deriva

genética do mtDNA e à reversão ao genótipo mitocondrial original,<sup>3</sup> sendo que já foi relatada uma reversão total do mtDNA num pequeno grupo de células provenientes de linhagens de células estaminais embrionárias derivadas de TSM (TFM, TPN), com o aumento da quantidade de “*carry-over*” a cada replicação.<sup>20</sup>

Assim, mesmo com um “*carry-over*” mínimo, existe a preocupação de que os haplótipos mitocondriais possam levar à predominância de um haplótipo sobre outro, resultando na reversão do genótipo do mtDNA.<sup>12</sup>

Como tal, é clara a necessidade de mais estudos que clarifiquem o mecanismo por detrás da deriva genética,<sup>12,44</sup> bem como se torna fundamental minimizar ao máximo o “*carry over*” que ocorre aquando das TSM.<sup>20</sup>

Apesar de todo o potencial que as TSM apresentam, não é possível garantir a prevenção da transmissão de patologia do mtDNA em todos os casos. No entanto, mesmo que este objetivo não se venha a realizar, estas ainda têm um grande potencial de diminuir a carga de mtDNA mutado, o que pode diminuir significativamente a severidade das patologias associadas ao mtDNA e, juntamente com outras técnicas, quer de reprodução medicamente assistida quer *in vivo*, bem como outras terapias,<sup>4</sup> pode vir a constituir uma ferramenta no arsenal terapêutico.

## 2) Problemas legais

Tendo em conta o crescente número de reportagens de nascimentos resultantes desta técnica, tem-se verificado diversas reações da parte de vários países.

Por exemplo, nos Estados Unidos da América (EUA) a TFM foi proibida em 2017, sendo ilegal transferir embriões que sofreram alterações na linha germinativa, incluindo embriões resultantes de TSM.<sup>12</sup> O processo que deu origem ao primeiro nascimento de uma criança fruto de TFM foi realizado por uma clínica privada de procriação medicamente assistida de Nova York que realizou todos os procedimentos em Nova York, e depois de selecionado o embrião a implantar,<sup>23</sup> enviou-o para uma clínica pertencente à mesma empresa, mas localizada no México para se realizar a transferência para o útero da doente.<sup>12</sup>

Já no Reino Unido, em dezembro de 2016, a TSM foi aprovada para uso clínico, mas de forma restrita, devendo uma instituição governamental avaliar cada caso individualmente, sendo que apenas doenças hereditárias que se sabe serem causadas por mutações podem candidatar-se à técnica. No entanto, o uso de TSM para tratar a infertilidade é ilegal.<sup>12</sup>

Segundo um estudo de 2018 que abrangeu dezasseis países, constatou-se que a regulamentação do uso clínico de TSM pode ser dividida em três categorias: proibido (China, para além dos EUA já mencionados), não regulamentado (Norte de Chipre e Ucrânia) ou insuficientemente regulamentado (os 12 países restantes, incluindo o México).<sup>46</sup>

Assim, tendo em conta as diferenças tão marcadas entre regulamentações de diferentes países, é muito provável que venha a desenvolver-se turismo médico para as TSM.

### 3) Questões éticas

Apesar das preocupações éticas e controvérsias legais, sabe-se que estas técnicas funcionam quer como terapia de prevenção quer como terapia de fertilidade, tendo já resultado em alguns nascimentos humanos.<sup>12</sup>

Nos anos 2000 sabe-se que cerca de 30 crianças nasceram resultantes de uma forma primitiva de TSM (que não foi especificada) efetuada numa clínica privada de procriação medicamente assistida, antes da *Food and Drug Administration* (FDA) ter encerrado a operação.<sup>40</sup> Não há informação relativamente ao seguimento dessas crianças.

Em 2017, a *New York City Clinic* (EUA) relatou o primeiro nascimento humano após o uso de TFM com o objetivo de prevenir Síndrome de Leigh. Foi escolhido um blastocisto euploide masculino contendo 5,7% de mtDNA mutado. Posteriormente, o recém-nascido nasceu com uma carga de mutação do mtDNA entre 2,36% e 9,23%.<sup>12</sup> O bebé apresentava-se saudável aos 7 meses de idade.<sup>12, 23</sup>

Em 2017 também nasceu outro bebé na Ucrânia, resultante de TSM não especificada, que não foi usada no contexto de prevenção, mas sim de tratamento de infertilidade.<sup>12</sup>

Entretanto outros relatos têm vindo a surgir,<sup>47</sup> o que sugere que já existe alguma aplicação destas técnicas, se bem que muitas vezes pouco ou mal regulada.

No entanto, todos estes relatos bem como a técnica em si, que envolve manipulações invasivas, potenciais riscos para fetos e crianças resultantes, e envolvimento ocasional de dadores que não fazem parte do casal,<sup>46</sup> tem suscitado várias questões éticas.<sup>48,49,50</sup> Entre elas o papel, deveres e direitos da dadora do mtDNA;<sup>51</sup> quem deve, e quem não deve ter acesso a esta técnica, bem como até que ponto este tipo de técnicas deve ser usada/encorajada, quando há outras alternativas como seja a utilização de ovócitos doados.<sup>36, 37, 38, 46, 52, 53,54</sup>

Para além disso, pelo que se sabe atualmente, o mtDNA é herdado apenas por via materna. Assim, uma criança do sexo masculino resultante destas técnicas, apesar de poder eventualmente apresentar doença, não irá transmitir mtDNA mutado à sua descendência, enquanto que o mesmo não se verifica para crianças do sexo feminino.<sup>33</sup> Deste modo tem sido proposto que, por um motivo de precaução/segurança, se implantem apenas embriões masculinos,<sup>47</sup> o que coloca uma questão ética em termos de escolha do sexo, uma vez que a criança que vai nascer pode herdar mtDNA mutado da mãe independentemente do seu sexo, estando ambos sexos sujeitos de igual forma às múltiplas consequências que daí podem advir.<sup>33</sup> A acontecer, a seleção específica de embriões masculinos a pensar não na criança em si, mas nos seus possíveis futuros filhos, torna-se eticamente questionável.<sup>33</sup>

Assim, apesar de se terem cometidos vários erros a nível ético com o emprego destas técnicas, e de ainda estarem por resolver algumas questões, estas apresentam uma promissora solução para variados problemas que atualmente não tem soluções alternativas, constituindo-se como uma importante ferramenta na clínica, pelos vários argumentos que apresentei anteriormente.

### **O panorama português**

Em Portugal há a mencionar a lei nacional de PMA 32/2006, atualmente na sua 9ª versão, mas que desde o início permite a realização de PMA para prevenção da transmissão de doenças genéticas (artigo 4.2), tendo finalidades proibidas no artigo 7 como a aplicação das técnicas de diagnóstico genético pré-implantação em doenças multifatoriais com valor preditivo do teste muito baixo, ou para conseguir melhorar determinadas características não médicas do nascituro, designadamente a escolha do sexo, sem nenhuma especificação concreta para estas técnicas, sendo que as finalidades proibidas também não são o objetivo que se procura atingir com a TSM.

Em 2018 em Portugal não havia registos médicos nem ensaios clínicos, nem as TSM eram oferecidas em websites de clínicas, nem indicadas em nenhum tipo de situação, tendo apenas sido publicitadas num site de turismo médico, mas que se revelou não ser verdade.<sup>46</sup>

Em 2022, a situação, ao que tudo indica, mantém-se a mesma. Não se realizam TSM no único centro público que realiza DGPI em Portugal, nem há conhecimento de investigação nesta área em nenhum outro centro nacional.

## Perspetivas de futuro

Até ao momento ainda não há alternativas relevantes, mas no futuro as TSM poderão vir a conviver com outras terapias, com o potencial de serem aplicadas aos doentes em si e não como uma forma de prevenção. Um exemplo disto são os “*drug delivery systems*” para transplante mitocondrial *in vivo* (entre eles pode-se mencionar peptídeos de penetração celular que permitem a absorção celular de mitocôndrias saudáveis).<sup>55</sup>

Adicionalmente, com o progresso do conhecimento científico, situações anteriormente conhecidas vêm a revelar novas informações, como é o caso da descoberta rara, e ainda incerta de que em algumas pessoas existe um modelo biparental de herança do mtDNA, que a confirmar-se será certamente revolucionário, quer em termos de mecanismos de doença quer em possíveis novas terapias.<sup>56,57,58,59</sup>

Para além disso, na área da PMA tem-se vindo a explorar novas vias de TSM sem recurso a um 3º partido, como a transferência mitocondrial autóloga, se bem que a sua eficácia clínica é controversa.<sup>60,61,62</sup>

Por fim, não pode deixar de ser mencionado tecnologias inovadoras de edição de genes que têm vindo a demonstrar capacidade de reduzir o risco de doenças do mtDNA, como a *CRISPR/Cas9*, sendo, contudo, técnicas ainda muito controversas no que toca à sua possível aplicação a seres humanos.<sup>9,60</sup>

Importa dizer que o futuro depende fortemente também da posição das sociedades face a este tipo de técnicas, ou até outras ainda mais provocadoras a nível de debate, pois muitas vezes a ciência que se desenvolve e os temas em que se investe dependem fortemente das sociedades nas quais estão inseridos.

## Conclusão

Concluindo, as TSM representam um conjunto de técnicas com grande potencial de virem a revolucionar completamente a prática clínica dentro da área da ginecologia-obstetrícia, no âmbito do aconselhamento reprodutivo e com o apoio da procriação medicamente assistida. Estas apresentam um grande potencial para resolver situações de infertilidade, nomeadamente situações de infertilidade feminina de causa ovocitária, seja por patologia do mtDNA, seja por idade materna avançada, tendência que tem vindo a aumentar no mundo desenvolvido.

Para além disso, como se sabe, as mutações do mtDNA podem levar a muitas e diversas patologias de vários órgãos e sistemas, e afetam uma importante percentagem

da população sem que haja alternativas terapêuticas relevantes para os problemas apresentados.

As TSM, apesar de não curarem indivíduos já doentes, apresentam-se como uma possível solução para que mulheres afetadas tenham filhos geneticamente relacionados, prevenindo ou mitigando a transferência de mtDNA mutado e assim a transmissão da doença.

Deste modo, as TSM revelam-se promissoras na prevenção de doenças relacionadas com o mtDNA.

Importa, porém, dizer que as TSM ainda não podem garantir com total segurança uma prevenção absoluta da transmissão de mtDNA mutado, sendo ainda necessários mais estudos para garantir segurança no seu uso clínico disseminado como uma técnica de procriação medicamente assistida.

No entanto, há a mencionar que, após ter feito esta resenha e ter constatado o ponto atual em que as TSM se encontram, seria injusto ignorar que algumas destas técnicas já têm dado evidências de serem verdadeiramente úteis, sendo necessários estudos como ensaios clínicos rigorosos para se poder averiguar a sua real aplicabilidade clínica, sem negligenciar as responsabilidades éticas inerentes a este tipo de técnicas.

## Referências

1. Kumar A, Im K, Banjevic M, Ng PC, Tunstall T, Garcia G, et al. Whole-genome risk prediction of common diseases in human preimplantation embryos. *Nat Med.* 2022;28(3):513-6.
2. Harper JC, Aittomäki K, Borry P, Cornel MC, de Wert G, Dondorp W, et al. Recent developments in genetics and medically assisted reproduction: from research to clinical applications. *Eur J Hum Genet.* 2018;26(1):12-33.
3. Yamada M, Akashi K, Ooka R, Miyado K, Akutsu H. Mitochondrial Genetic Drift after Nuclear Transfer in Oocytes. *Int J Mol Sci.* 2020;21(16).
4. Bottani E, Lamperti C, Prigione A, Tiranti V, Persico N, Brunetti D. Therapeutic approaches to treat mitochondrial diseases: “One-size-fits-all” and “precision medicine” strategies. *Pharmaceutics.* 2020;12(11):1-63.
5. Sharma H, Singh D, Mahant A, Sohal SK, Kesavan AK, Samiksha. Development of mitochondrial replacement therapy: A review. *Heliyon.* 2020;6(9):e04643.
6. Aryamvally A, Myers MF, Huang T, Slone J, Pilipenko V, Hartmann JE. Mitochondrial replacement therapy: Genetic counselors' experiences, knowledge, and opinions. *J Genet Couns.* 2021;30(3):828-37.
7. Wolf DP, Mitalipov N, Mitalipov S. Mitochondrial replacement therapy in reproductive medicine. *Trends Mol Med.* 2015;21(2):68-76.
8. Duffy JMN, Adamson GD, Benson E, Bhattacharya S, Bofill M, Brian K, et al. Top 10 priorities for future infertility research: an international consensus development study. *Fertil Steril.* 2021;115(1):180-90.
9. Jiang Z, Shen H. Mitochondria: emerging therapeutic strategies for oocyte rescue. *Reproductive Sciences.* 2021.
10. Kristensen SG, Humaidan P, Coetzee K. Mitochondria and reproduction: possibilities for testing and treatment. *Panminerva Med.* 2019;61(1):82-96.
11. Dobler R, Dowling DK, Morrow EH, Reinhardt K. A systematic review and meta-analysis reveals pervasive effects of germline mitochondrial replacement on components of health. *Human Reproduction Update.* 2018;24(5):519-34.
12. Yamada M, Sato S, Ooka R, Akashi K, Nakamura A, Miyado K, et al. Mitochondrial replacement by genome transfer in human oocytes: Efficacy, concerns, and legality. *Reprod Med Biol.* 2021;20(1):53-61.
13. Greenfield A, Braude P, Flinter F, Lovell-Badge R, Ogilvie C, Perry ACF. Assisted reproductive technologies to prevent human mitochondrial disease transmission. *Nat Biotechnol.* 2017;35(11):1059-68.
14. Klopstock T, Priglinger C, Yilmaz A, Kornblum C, Distelmaier F, Prokisch H. Mitochondrial Disorders. *Dtsch Arztebl Int.* 2021;118(44):741-8.



15. Hirano M, Emmanuele V, Quinzii CM. Emerging therapies for mitochondrial diseases. *Essays Biochem.* 2018;62(3):467-81.
16. Saxena N, Taneja N, Shome P, Mani S. Mitochondrial Donation: A Boon or Curse for the Treatment of Incurable Mitochondrial Diseases. *J Hum Reprod Sci.* 2018;11(1):3-9.
17. Hyslop LA, Blakeley P, Craven L, Richardson J, Fogarty NM, Fragouli E, et al. Towards clinical application of pronuclear transfer to prevent mitochondrial DNA disease. *Nature.* 2016;534(7607):383-6.
18. Richardson J, Irving L, Hyslop LA, Choudhary M, Murdoch A, Turnbull DM, et al. Concise reviews: Assisted reproductive technologies to prevent transmission of mitochondrial DNA disease. *Stem Cells.* 2015;33(3):639-45.
19. Craven L, Tang MX, Gorman GS, De Sutter P, Heindryckx B. Novel reproductive technologies to prevent mitochondrial disease. *Human Reproduction Update.* 2017;23(5):501-19.
20. Tang M, Guggilla RR, Gansemans Y, Van der Jeught M, Boel A, Popovic M, et al. Comparative analysis of different nuclear transfer techniques to prevent the transmission of mitochondrial DNA variants. *Mol Hum Reprod.* 2019;25(12):797-810.
21. Tachibana M, Amato P, Sparman M, Woodward J, Sanchis DM, Ma H, et al. Towards germline gene therapy of inherited mitochondrial diseases. *Nature.* 2013;493(7434):627-31.
22. Tachibana M, Kuno T, Yaegashi N. Mitochondrial replacement therapy and assisted reproductive technology: A paradigm shift toward treatment of genetic diseases in gametes or in early embryos. *Reprod Med Biol.* 2018;17(4):421-33.
23. Zhang J, Liu H, Luo S, Lu Z, Chávez-Badiola A, Liu Z, et al. Live birth derived from oocyte spindle transfer to prevent mitochondrial disease. *Reproductive BioMedicine Online.* 2017;34(4):361-8.
24. Wolf DP, Hayama T, Mitalipov S. Mitochondrial genome inheritance and replacement in the human germline. *Embo Journal.* 2017;36(15):2177-81.
25. Kang E, Wu J, Gutierrez NM, Koski A, Tippner-Hedges R, Agaronyan K, et al. Mitochondrial replacement in human oocytes carrying pathogenic mitochondrial DNA mutations. *Nature.* 2016;540(7632):270-5.
26. Ma H, O'Neil RC, Marti Gutierrez N, Hariharan M, Zhang ZZ, He Y, et al. Functional Human Oocytes Generated by Transfer of Polar Body Genomes. *Cell Stem Cell.* 2017;20(1):112-9.
27. Labarta E, de Los Santos MJ, Escribá MJ, Pellicer A, Herraiz S. Mitochondria as a tool for oocyte rejuvenation. *Fertil Steril.* 2019;111(2):219-26.

28. Farnezi HCM, Goulart ACX, Santos AD, Ramos MG, Penna MLF. Three-parent babies: Mitochondrial replacement therapies. *JBRA Assist Reprod.* 2020;24(2):189-96.
29. Tanaka A, Watanabe S. Can cytoplasmic donation rescue aged oocytes? *Reprod Med Biol.* 2019;18(2):128-39.
30. Darbandi S, Darbandi M, Agarwal A, Khorshid HRK, Sadeghi MR, Esteves SC, et al. Comparing four laboratory three-parent techniques to construct human aged non-surrounded nucleolus germinal vesicle oocytes: A case-control study. *Int J Reprod Biomed.* 2020;18(6):425-38.
31. Sobek A, Tkadlec E, Klaskova E, Prochazka M. Cytoplasmic Transfer Improves Human Egg Fertilization and Embryo Quality: an Evaluation of Sibling Oocytes in Women with Low Oocyte Quality. *Reproductive Sciences.* 2020.
32. Tinker RJ, Lim AZ, Stefanetti RJ, McFarland R. Current and Emerging Clinical Treatment in Mitochondrial Disease. *Molecular Diagnosis and Therapy.* 2021.
33. Pompei M, Pompei F. Overcoming bioethical, legal, and hereditary barriers to mitochondrial replacement therapy in the USA. *J Assist Reprod Genet.* 2019;36(3):383-93.
34. Giannelou P, Simopoulou M, Grigoriadis S, Makrakis E, Kontogeorgi A, Pantou A, et al. The Conundrum of Poor Ovarian Response: From Diagnosis to Treatment. *Diagnostics (Basel).* 2020;10(9).
35. Connor S. When replacement becomes reversion. *Nature Biotechnology.* 2017;35(11):1012-5.
36. Cavaliere G, Palacios-González C. Lesbian motherhood and mitochondrial replacement techniques: reproductive freedom and genetic kinship. *Journal of medical ethics.* 2018;44(12):835-42.
37. Baylis F. 'No' to lesbian motherhood using human nuclear genome transfer. *J Med Ethics.* 2018;44(12):865-7.
38. Palacios-González C, Cavaliere G. 'Yes' to mitochondrial replacement techniques and lesbian motherhood: a reply to Françoise Baylis. *Journal of medical ethics.* 2019;45(4):280-1.
39. Friedman JR, Nunnari J. Mitochondrial form and function. *Nature.* 2014;505(7483):335-43.
40. Humans 2.0. *Nature Biotechnology.* 2017;35(11):993.
41. Monnot S, Gigarel N, Samuels DC, Burlet P, Hesters L, Frydman N, et al. Segregation of mtDNA throughout human embryofetal development: m.3243A>G as a model system. *Hum Mutat.* 2011;32(1):116-25.

42. Sallevelt SC, Dreesen JC, Drüsedau M, Spierts S, Coonen E, van Tienen FH, et al. Preimplantation genetic diagnosis in mitochondrial DNA disorders: challenge and success. *J Med Genet.* 2013;50(2):125-32.
43. Adashi EY, Cohen IG. Preventing Mitochondrial Diseases: Embryo-Sparing Donor-Independent Options. *Trends Mol Med.* 2018;24(5):449-57.
44. Yamada M, Emmanuele V, Sanchez-Quintero MJ, Sun B, Lалlos G, Paull D, et al. Genetic Drift Can Compromise Mitochondrial Replacement by Nuclear Transfer in Human Oocytes. *Cell Stem Cell.* 2016;18(6):749-54.
45. Otten ABC, Sallevelt S, Carling PJ, Dreesen J, Drüsedau M, Spierts S, et al. Mutation-specific effects in germline transmission of pathogenic mtDNA variants. *Hum Reprod.* 2018;33(7):1331-41.
46. Ishii T, Hibino Y. Mitochondrial manipulation in fertility clinics: Regulation and responsibility. *Reprod Biomed Soc Online.* 2018;5:93-109.
47. Reardon S. Reports of 'three-parent babies' multiply. *Nature.* 2016.
48. Liao SM. Do Mitochondrial Replacement Techniques Affect Qualitative or Numerical Identity? *Bioethics.* 2017;31(1):20-6.
49. Liao SM. Designing humans: A human rights approach. *Bioethics.* 2019;33(1):98-104.
50. Newson AJ, Wrigley A. Is Mitochondrial Donation Germ-Line Gene Therapy? Classifications and Ethical Implications. *Bioethics.* 2017;31(1):55-67.
51. Palacios-González C. Does egg donation for mitochondrial replacement techniques generate parental responsibilities? *J Med Ethics.* 2018;44(12):817-22.
52. Bredenoord AL, Appleby JB. Mitochondrial Replacement Techniques: Remaining Ethical Challenges. *Cell Stem Cell.* 2017;21(3):301-4.
53. Gómez-Tatay L, Hernández-Andreu JM, Aznar J. Mitochondrial modification techniques and ethical issues. *Journal of Clinical Medicine.* 2017;6(3).
54. Palacios-González C. Resource Allocation, Treatment, Disclosure, and Mitochondrial Replacement Techniques. *Camb Q Healthc Ethics.* 2017;26(2):278-87.
55. Yamada Y, Ito M, Arai M, Hibino M, Tsujioka T, Harashima H. Challenges in Promoting Mitochondrial Transplantation Therapy. *Int J Mol Sci.* 2020;21(17).
56. Luo S, Valencia CA, Zhang J, Lee NC, Slone J, Gui B, et al. Biparental Inheritance of Mitochondrial DNA in Humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018;115(51):13039-44.
57. Vissing J. Paternal comeback in mitochondrial DNA inheritance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;116(5):1475-6.
58. Lutz-Bonengel S, Parson W. No further evidence for paternal leakage of mitochondrial DNA in humans yet. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1162019. p. 1821-2.

59. Ma H, Van Dyken C, Darby H, Mikhalchenko A, Marti-Gutierrez N, Koski A, et al. Germline transmission of donor, maternal and paternal mtDNA in primates. *Human Reproduction*. 2021;36(2):493-505.
60. Kristensen SG, Pors SE, Andersen CY. Improving oocyte quality by transfer of autologous mitochondria from fully grown oocytes. *Hum Reprod*. 2017;32(4):725-32.
61. Ou XH, Sun QY. Mitochondrial replacement techniques or therapies (MRTs) to improve embryo development and to prevent mitochondrial disease transmission. *Journal of Genetics and Genomics*. 2017;44(8):371-4.
62. Zhang C, Tao L, Yue Y, Ren L, Zhang Z, Wang X, et al. Mitochondrial transfer from iPS cells rescues developmental potential of in vitro fertilized embryos from aging females†. *Biol Reprod*. 2021.