



Banco andaluz de células madre



ugr

Universidad
de Granada

DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA Y EMBRIOLOGÍA HUMANA

TESIS DOCTORAL

**“CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS: ASPECTOS ÉTICO-LEGISLATIVOS Y
DESARROLLO DE UNA NUEVA METODOLOGÍA PARA LA DERIVACIÓN
DE LÍNEAS CELULARES EMBRIONARIAS (ESCs)”**

Memoria presentada por D. JOSÉ LUIS CORTÉS ROMERO para optar al
grado de Doctor Europeo

GRANADA, 2008

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: José Luis Cortés Romero
D.L.: GR. 2044-2009
ISBN: 978-84-692-2254-6

D. **PABLO MENÉNDEZ BUJÁN**, Doctor en Medicina, Director del Banco Andaluz de Células Madre, y Subdirector del Banco Nacional de Líneas Celulares.

HACE CONSTAR:

Que D. José Luis Cortés Romero ha realizado bajo mi dirección el trabajo de tesis doctoral: **”CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS: ASPECTOS ÉTICO-LEGISLATIVOS Y DESARROLLO DE UNA NUEVA METODOLOGÍA PARA LA DERIVACIÓN DE LÍNEAS CELULARES EMBRIONARIAS (ESCs)”** y corresponde fielmente a los resultados obtenidos.

Una vez redactada la presente memoria, ha sido revisada por mí y la encuentro conforme para ser presentada y aspirar al grado de Doctor Europeo ante el tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expido el presente en Granada a de de 2008.

Fdo. Pablo Menéndez Buján

Dña. **ANTONIA ARÁNEGA JIMÉNEZ**, Doctora en Medicina y Cirugía, Catedrática del Departamento de Anatomía y Embriología Humana de la Universidad de Granada.

HACE CONSTAR:

Que D. José Luis Cortés Romero ha realizado bajo mi co-dirección el trabajo de tesis doctoral: **”CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS: ASPECTOS ÉTICO-LEGISLATIVOS Y DESARROLLO DE UNA NUEVA METODOLOGÍA PARA LA DERIVACIÓN DE LÍNEAS CELULARES EMBRIONARIAS (ESCs)”** y corresponde fielmente a los resultados obtenidos.

Una vez redactada la presente memoria, ha sido revisada por mí y la encuentro conforme para ser presentada y aspirar al grado de Doctor Europeo ante el tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expido el presente en Granada a de de 2008.

Fdo. Antonia Aránega Jiménez

D. **JUAN ANTONIO MARCHAL CORRALES**, Doctor en Medicina y Cirugía,
Profesor Titular del Departamento de Anatomía y Embriología Humana de la
Universidad de Granada.

HACE CONSTAR:

Que D. José Luis Cortés Romero ha realizado bajo mi co-dirección el
trabajo de tesis doctoral: **”CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS: ASPECTOS
ÉTICO-LEGISLATIVOS Y DESARROLLO DE UNA NUEVA METODOLOGÍA
PARA LA DERIVACIÓN DE LÍNEAS CELULARES EMBRIONARIAS (ESCs)”**
y corresponde fielmente a los resultados obtenidos.

Una vez redactada la presente memoria, ha sido revisada por mí y la
encuentro conforme para ser presentada y aspirar al grado de Doctor Europeo
ante el tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes,
expido el presente en Granada a de de 2008.

Fdo. Juan Antonio Marchal Corrales

El trabajo de investigación que se expone en la siguiente tesis ha sido realizado por D. José Luis Cortés Romero bajo la dirección de:

D. PABLO MENÉNDEZ BUJÁN

Dña. ANTONIA ARÁNEGA JIMÉNEZ

D. JUAN ANTONIO MARCHAL CORRALES

Los resultados de esta tesis han sido publicados en las siguientes revistas:

1.- JL Cortes, F Cobo, AH Barnie, P Catalina, C Cabrera, A Nieto, R Montes, Á Concha. Role of the embryology laboratory in the human embryonic stem cell line derivation process. **Cytotechnology**. 2006, 52:1-11.

2.- JL Cortes, G Antiñolo, L Martínez, F Cobo, Á Barnie, A Zapata, P Menéndez. Spanish Stem Cell Bank interviews examine the interest of couples in donating surplus human IVF embryos for stem cell research. **Cell Stem Cell**. 2007, 1:17-20.

3.- JL Cortes, P Menéndez. Reproductive medicine embryologists meet hESC research: need to adjust the regulatory framework to actual expectations about hESC research and its potential detrimental consequences. **Fertility & Sterility**. (doi:10.1016/j.fertnstert.2008.05.041)

4.- JL Cortes, F Cobo, P Catalina, A Nieto, C Cabrera, R Montes, Á Concha, P Menéndez. Evaluation of the laser technique method to isolate the inner cell mass of murine blastocysts. **Biotechnology & Applied Biochemistry**. 2007, 46:205-209.

5.- JL Cortes, L Sánchez, P Catalina, F Cobo, C Bueno, Á Martínez-Ramírez, A Barroso, C Cabrera, G Ligeró, R Montes, R Rubio, A Nieto, P Menéndez. Whole-blastocyst culture followed by laser drilling technology enhances the

efficiency of ICM isolation and ESC derivation from good and poor-quality mouse embryos: new insights in the derivation of hESC lines. *Stem Cells and Development*. **Stem Cells and Development**. 2008, 17:255-268.

6.- JL Cortes, G Ligeró, L Sánchez, A Nieto, C Bueno, R Montes, P Menéndez. Criterios de Valoración Morfológicos de Oocitos, Preembriones tempranos y Blastocistos Humanos propuestos por ASEBIR: aplicabilidad en preembriones crioconservados donados para investigación con células madre (Morphological Assessment of Human Oocytes, early Embryos and Blastocysts proposed by ASEBIR: applicability in cryopreserved embryos donated to stem cell research). **Revista de la Asociación para el Estudio de la Biología de Reproducción (ASEBIR)**. Junio 2008. Vol. 14, nº 1, p 6-13.

7.- JL Cortes, L Sánchez, G Ligeró, I Gutierrez-Aranda, P Catalina, C Elosua, P Leone, R Montes, C Bueno, V Ramos-Mejía, I Maleno, JL García-Pérez, P Menéndez. Mesenchymal stem cells facilitate the derivation of human embryonic stem cells from cryopreserved poor-quality embryos. **Human Reproduction (Submitted)**

Los trabajos 4-7 van precedidos de la siguiente solicitud de patente:

Inventores: P Menéndez, **JL Cortés**, F Cobo

Título: Procedimiento para el aislamiento de la masa celular interna en blastocistos de mamíferos

Nº solicitud de patente de invención: P200701625

Fecha prioridad: 1/06/2007

Entidad u organismo titular: Fundación Progreso y Salud

AGRADECIMIENTOS

Si pudiera agradecer, uno por uno, a todas las personas que han hecho posible de alguna manera la realización de esta tesis doctoral, seguramente este apartado ocuparía más de lo estipulado. Por eso, permítanme que los siguientes agradecimientos sean en algunos casos generalizados, buscando que todo el mundo pueda darse por aludido.

Mi más sincero agradecimiento:

Al Dr. Pablo Menéndez, director de la presente tesis, por darme la oportunidad de cumplir este gran sueño.

A la Dra. Antonia Aránega, directora de la presente tesis, por su apoyo en todo momento, por su afecto hacia mí y por ofrecerme todo tipo de facilidades para la realización de esta tesis.

Al Dr. Juan Antonio Marchal, director de la presente tesis, por su continua disponibilidad, por sus sabios consejos y por su sensatez.

Al Dr. José Luis García, por su paciencia, comprensión, y grandísimos valores humanos.

A todos aquellos que me ayudaron a iniciarme en el mundo de la reproducción asistida, y en especial al Dr. Enrique Vázquez y al Dr. Manuel Martínez-Moya.

A toda la Unidad Clínica de Genética y Reproducción del Hospital Universitario Virgen del Rocío, en especial a Beatriz, M^a Luisa, Juan Luis, M^a Carmen y Juana Mari. Sabéis que parte de mi corazón aún está con vosotros. A ti, Raquel, muchas gracias por todo lo que has hecho por mí, tanto personal como profesionalmente.

A todos mis amigos de Sevilla, sobre todo a mi gran amigo Royo. No sé que sería de mí sin tu amistad.

Al Dr. Armando Blanco, al Dr. José Antonio Castilla y al Dr. Ángel Concha, muchísimas gracias por la confianza que siempre habéis puesto en mí.

Al Dr. Fernando Cobo, por sus enseñanzas al comienzo de mi labor investigadora y por su gran apoyo y amistad.

A todo el personal que está y que ha pasado por el Banco Andaluz de Células Madre, y en especial a Puri, Rosi, Ana, Manu, Susana, Christina, Alicia, Gema, Gus, Gertru, Laura, Iván, Santi y Clara, por su ayuda incondicional en todos los momentos donde la he necesitado.

A la Fundación Progreso y Salud, a la Consejería de Salud, al Instituto de Salud Carlos III y a ANACER, por haber financiado y apoyado la realización de esta tesis.

A mis padres, hermanos, demás familiares y amigos que me han apoyado durante todos estos años.

A Mariola y a mi hijo José Luis, porque todo este trabajo no tendría sentido sin vosotros a mi lado.

*Me verás,
Voy buscando un resquicio,
Una puerta sin cerrar,
Aprendí el oficio de ser libre,
Capeando el temporal.
Tú dirás,
Que si me quejo es por vicio,
Si te asomas me verás,
Entre fuegos de artificio,
Naufragando en la ciudad.....
.....Y con mi navaja de cachas nacaradas,
He afilado el último rayo de sol.
Sospechaba que el tren que yo esperaba,
Iba lleno de otros como yo.
J.I.L.*

Dedicado a toda mi familia

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

ASCs: siglas inglesas de *Adult Stem Cells*. Célula madre adulta.

ASEBIR: Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción.

BACM: Banco Andaluz de Células Madre.

bFGF: siglas inglesas de *Basic Fibroblast Growth Factor*. Factor de crecimiento fibroblástico.

BMP: siglas inglesas de Bone Morphogenic Protein. Proteína morfogénica de hueso.

CGH: siglas inglesas de *Comparative Genomic Hybridation*. Hibridación genómica comparada.

ECM: siglas inglesas de *External Cell Mass*. Masa celular externa.

EM: siglas inglesas de Extracellular Matrix. Matriz extracelular.

ESCs: siglas inglesas de *Embryonic Stem Cells*. Células madre embrionarias.

FISH: siglas inglesas de *Fluorescent in situ Hybridation*. Hibridación *in situ* de fluorescencia.

FIV: fecundación *in vitro*

GFP: siglas inglesas de *Green Fluorescent Protein*. Proteína verde fluorescente.

hECCs: siglas inglesas de *Human Embryonic Carcinoma Cells*. Células de carcinoma embrionario.

HF: siglas inglesas de *Human Fibroblasts*. Fibroblastos humanos.

hESCs: siglas inglesas de *Human Embryonic Stem Cells*. Células madre embrionarias humanas.

hMSCs: siglas inglesas de *Human Mesenchymal Stem Cells*. Células madre mesenquimales humanas.

ICM: siglas inglesas de *Inner Cell Mass*. Masa celular interna.

ICSI: siglas inglesas de *Intracytoplasmic Spermatozoa Injection*. Inyección intracitoplasmática de espermatozoide.

IGF: siglas inglesas de *Insulin-like Growth Factor*. Factor de crecimiento de la insulina-II.

iROCK: siglas inglesas de *Rho-associated kinase inhibitor*.

KGF: siglas inglesas de *Keratinocyte Growth Factor*. Factor de crecimiento de queratinocitos.

LIF: siglas inglesas de *Leukaemia Inhibitor Factor*. Factor inhibidor de la leucemia.

MEFs: siglas inglesas de *Mouse Embryonic Fybroblast*. Fibroblastos embrionarios de ratón.

PN: pronúcleo

ROCK: siglas inglesas de *Rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase*. Quinasas asociadas a Rho mediante serina/treonina.

SKY: siglas inglesas de *Spectral Karyotyping*. Cariotipado espectral.

SNP: siglas inglesas de *Single Nucleotide Polymorphism*. Polimorfismo de un solo nucleótido.

SR: siglas inglesas de *Knockout Serum Replacement*. Suero de reemplazo

TGF- β 1: siglas inglesas de *Transformant Growth Factor- β 1*. Factor de crecimiento transformante- β 1.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. CÉLULAS MADRE, TRONCALES O STEM CELLS.....	3
1.1 Características de las células madre, troncales o stem cells.....	3
1.2 Tipos de células madre.....	5
1.3 ¿Qué son las ESCs?.....	7
1.3.1 Primeros descubrimientos de las ESCs.....	7
1.3.2 Relevancia de las hESCs.....	7
1.4 Definición biológica de ESC.....	8
1.4.1 Características esenciales de las ESCs.....	8
1.5 Naturaleza de las ESCs.....	8
1.5.1 Fecundación del ovocito.....	8
1.5.2 Segmentación del embrión.....	9
1.5.3 Compactación del embrión.....	10
1.5.4 Formación del blastocisto.....	11
1.5.5 Origen de los embriones utilizados para la derivación de ESCs.....	11
1.5.5.1. Técnicas de reproducción asistida. Fecundación <i>in vitro</i> (FIV)..	12
1.5.6 Derivación de ESCs.....	15
1.5.7. Sistemas actuales de cultivo de hESCs.....	23
1.5.8. Factores extracelulares que regulan la capacidad de auto-renovación de las hESCs.....	25
1.5.9. Propiedades del Y-27632 (iROCK), un inhibidor específico de las quinasas asociadas a Rho.....	25
2. CARACTERIZACIÓN DE LAS ESCs.....	27
2.1 Criterios de caracterización de ESCs.....	27
2.1.1 Marcadores de indiferenciación.....	27
2.1.2 Diferencias entre las mESCs y las hESCs.....	29
2.1.3 Diferenciación espontánea <i>in vitro</i>	29
2.1.4 Diferenciación espontánea <i>in vivo</i>	30
2.1.5 Caracterización citogenética.....	31
2.1.6 Manipulación genética de las ESCs.....	32
2.1.7 Futuro potencial de la progenie derivada de hESCs en medicina regenerativa	33
2.1.8 hESCs: inmunogeneidad vs. inmunotolerancia.....	34

3. FUTURAS APLICACIONES EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA.....	36
3.1 Expectativas reales en la investigación con hESCs.....	36
3.2 Bancos de ESCs.....	37
4. MARCO LEGISLATIVO Y ASPECTOS ÉTICOS DE LA INVESTIGACIÓN CON hESCs.....	38
4.1 Controversia ética y social de la investigación con hESCs.....	38
4.2 Legislación actual en España.....	38
4.2.1 Ley 14/2007 de Investigación Biomédica.....	39
4.2.2 Permisividad actual de España en relación con la investigación con hESCs.....	40
4.3 La legislación actual en Europa.....	41
II. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS DEL ESTUDIO REALIZADO.....	45
III. OBJETIVOS DEL ESTUDIO REALIZADO.....	49
IV. MATERIAL, MÉTODOS Y RESULTADOS.....	53
IV.1.- Role of the embryology laboratory in the human embryonic stem cell line derivation process. JL Cortés, F Cobo, AH Barnie, P Catalina, C Cabrera, A Nieto, R Montes, Á Concha. Cytotechnology, 2006. 52:1-11.....	57
IV.2.- Spanish Stem Cell Bank interviews examine the interest of couples in donating surplus human IVF embryos for stem cell research. JL Cortés, G Antiñolo, L Martínez, F Cobo, Á Barnie, A Zapata, P Menéndez. Cell Stem Cell, 2007. 1:17-20.....	73
IV.3.- Reproductive medicine embryologists meets hESC research: need to adjust the regulatory framework to actual expectations about hESC research and its potential detrimental consequences. JL Cortés, P Menéndez. Fertility & Sterility. 2008 (In press).....	81
IV.4.- Evaluation of the laser technique method to isolate the inner cell mass of murine blastocysts. JL Cortés, F Cobo, P Catalina, A Nieto, C Cabrera, R Montes, Á Concha, P Menéndez. Biotechnology & Applied Biochemistry, 2007. 46:205-209.....	89
IV.5.- Whole-blastocyst culture followed by laser drilling technology enhances the efficiency of ICM isolation and ESC derivation from good and poor-quality mouse embryos: new insights in the derivation of hESC lines. JL Cortés, L Sánchez, P Catalina, F Cobo, C	

Bueno, Á Martínez-Ramírez, A Barroso, C Cabrera, G Ligeró, R Montes, R Rubio, A Nieto, P Menéndez. Stem Cells and Development , 2008. 17:255-267.....	99
IV. 6.- Criterios de Valoración Morfológicos de Oocitos, Embriones tempranos y Blastocistos Humanos propuestos por ASEBIR: aplicabilidad en embriones crioconservados donados para investigación con células madre. JL Cortés, G Ligeró, L Sánchez, A Nieto, C Bueno, R Montes, P Menéndez. Revista de la Asociación para el Estudio de la Biología de Reproducción (ASEBIR) . Junio 2008. Vol. 14, nº 1, p 6-13.....	117
IV. 7.- Mesenchymal stem cells facilitate the derivation of human embryonic stem cells from cryopreserved poor-quality embryos. JL Cortes, L Sánchez, G Ligeró, I Gutierrez-Aranda, P Catalina, C Elosua, P Leone, R Montes, C Bueno, V Ramos-Mejia, I Maleno, JL García-Pérez, P Menéndez. Human Reproduction (Submitted)	129
V. DISCUSIÓN	161
VI. CONCLUSIONES	179
VII. BIBLIOGRAFÍA	183

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1. CÉLULAS MADRE, TRONCALES O “STEM CELLS”

1.1 Características de las células madre, troncales o “stem cells”

A pesar de su diferente origen tisular y ontogénico, todas las células madre comparten dos características comunes, si bien pueden expresarlas en distintos grados (Liew *et al.*, 2005):

- **Capacidad de auto-renovación**: las células madre tienen capacidad para perpetuarse, mediante divisiones mitóticas simétricas que originan células hijas, de características similares a la célula progenitora. A través de este proceso, una célula madre puede proliferar para dar lugar a la expansión de un clon. Igualmente, un conjunto limitado de células madre, en el seno de un determinado tejido u órgano, puede mantener su número o incrementarlo ante necesidades homeostáticas cuando tales células estén participando en un proceso de regeneración tisular. Esta capacidad de auto-renovación es la que permite a las células madre mantener el clon indiferenciado durante largos periodos de tiempo, actuando de reservorio ante distintas necesidades fisiológicas/homeostáticas.

- **Pluripotencia**: las células madre son pluripotentes, es decir, capaces de diferenciarse a múltiples linajes celulares bajo diferentes estímulos. Abandonan su estado indiferenciado y mediante un proceso de diferenciación, estrictamente regulado, dan lugar a múltiples linajes somáticos: células nerviosas, cardíacas, sanguíneas, etc, adquiriendo las características morfológicas y funcionales propias de estos tipos celulares. Esta propiedad, junto con su capacidad de proliferación ilimitada (regulada por un proceso de división simétrica o auto-renovación), es lo que convierte a las células madre en una fuente importante para la obtención de distintos tipos celulares.

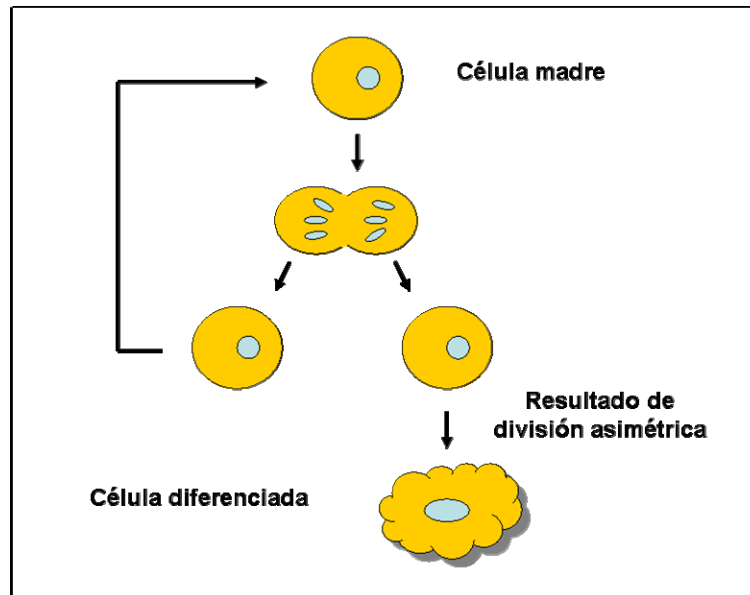


Figura 1: Comportamiento de una célula madre tras una división asimétrica (Imagen tomada del BACM).

La homeostasis de cualquier tejido adulto o embrionario se mantiene mediante un balance entre la proliferación y la diferenciación. Este balance está finamente controlado por una población celular (células madre) mínimamente representada. Las células madre se caracterizan por dos propiedades, como hemos indicado anteriormente (con independencia del tejido): pluripotencia y auto-renovación. Su capacidad de auto-renovarse les permite, a través de sucesivas mitosis simétricas, perpetuar el clon indiferenciado. Ante necesidades fisiológicas y/o patológicas, la célula madre desencadena un proceso de división asimétrica, por el que originan dos células hijas desiguales. Una célula hija es idéntica a la célula madre, mientras que la otra célula hija sufre el primer paso hacia la diferenciación (Figura 1). La diferenciación desde una célula madre hasta células maduras funcionales es un complejo proceso regulado a nivel molecular y condicionado por factores exógenos procedentes del ambiente celular. Mediante este proceso, las células madre van originando progenitores/precursores con distinto potencial en cuanto a su pluripotencia. Así, los progenitores van perdiendo su capacidad de auto-renovación y diferenciación con las sucesivas divisiones, convirtiéndose en células funcionales maduras (Sell, 2004; Menok y Sherley, 2001).

1.2 Tipos de células madre

A grandes rasgos y de manera relativa podemos definir cuatro tipos de células madre en base a su descendente capacidad jerárquica (Figura 2) (García-Castro *et al.*, 2007):

-Célula madre totipotente: aquella célula capaz de crecer y formar un organismo completo donde se incluyen los componentes embrionarios, como son las tres capas embrionarias (endodermo, ectodermo y mesodermo), el linaje germinal, los tejidos que darán el saco vitelino, y los componentes extraembrionarios, como la placenta. Aún así, muchos autores consideran que la única célula totipotente es el cigoto (Sell, 2004).

-Célula madre pluripotente: este tipo de célula no puede formar un organismo completo, pero puede formar cualquier tipo de célula proveniente de las tres capas embrionarias (Sell, 2004).

-Célula madre multipotente: es aquella célula que en principio sólo puede originar tipos celulares de su propia capa o linaje embrionario de origen, por ejemplo, una célula madre sanguínea será capaz de originar de manera exclusiva diferentes tipos celulares maduros y funcionales hematopoyéticos (Sell, 2004).

-Célula madre unipotente: célula capaz de dar lugar únicamente a un tipo de célula particular (Sell, 2004).

Desde un punto de vista ontogénico, las células madre se pueden clasificar como (García-Castro *et al.*, 2007) (Figura 2):

-Célula madre embrionaria: la célula madre embrionaria (ESC, siglas inglesas de *Embryonic Stem Cell*) por excelencia es el cigoto, formado por la fecundación del óvulo por un espermatozoide. El cigoto es totipotente, es decir puede dar lugar a todas las células del feto y a la placenta. Según se va desarrollando el embrión, sus células van perdiendo esta propiedad (totipotencia) de forma progresiva, llegando a la fase de blastocisto que contiene células pluripotentes en la masa celular interna (ICM, siglas inglesas de Inner Cell Mass) de las cuales se derivan las ESCs capaces de diferenciarse en cualquier tejido embrionario. Algún trabajo reciente sugiere la capacidad de las ESCs de generar tejidos extraembrionarios como el trofoblasto (Moore *et al.*, 2008). A medida que avanza el desarrollo embrionario

se forman diferentes poblaciones de células madre con una potencialidad de regenerar tejidos cada vez más restringida.

-Célula madre neonatal: son las células madre procedentes de cordón umbilical y/o placenta. Muchos estudios han evidenciado la existencia de distintos tipos de células madre en cordón umbilical, convirtiéndose en una de las fuentes más aceptadas para la obtención de células con capacidad regenerativa de múltiples tejidos. La existencia de células madre hematopoyéticas en la placenta está siendo explorada por múltiples laboratorios (Steigman, 2007; Crisan, 2008).

-Célula madre adulta: en un individuo adulto se conocen decenas de distintos tipos de células madre adultas (ASC, siglas inglesas de *Adult Stem Cell*) y progenitoras, que son las encargadas de regenerar tejidos en continuo desgaste como la piel, sangre, hígado, tejido nervioso, intestino, etc. Su capacidad para generar células especializadas suele estar limitada a unos pocos linajes (Sell, 2004).

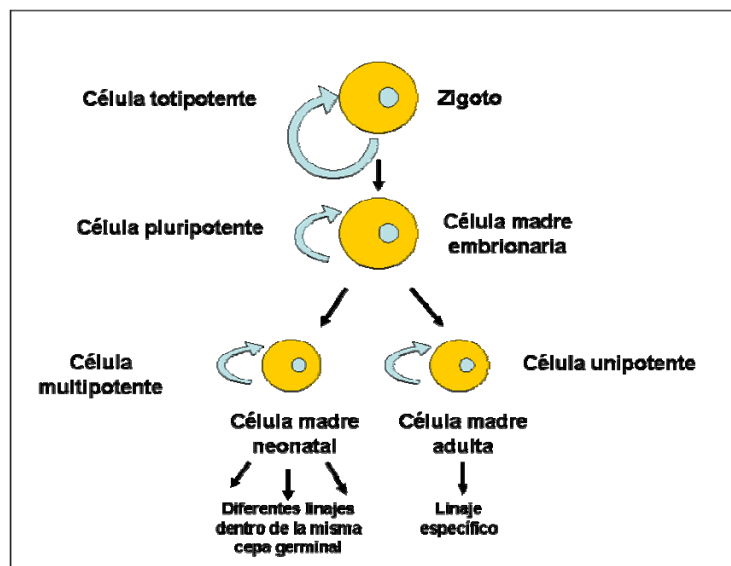


Figura 2: Niveles de potencialidad de las células madre basado en el estado jerárquico y ejemplos de cada tipo (Imagen tomada del BACM).

Otro tipo importante son las células madre fetales. Debido a la estricta regulación en nuestro país no prestamos mayor atención en este trabajo doctoral. Están presentes durante el desarrollo fetal (entre la semana 2-3 postfecundación hasta el nacimiento).

1.3 ¿Qué son las ESCs?

1.3.1 Primeros descubrimientos de las ESCs

Desde que se obtuvieron los primeros cultivos de ESCs de ratón (mESC, siglas inglesas de Mouse Embryonic Stem Cells) derivadas de blastocistos en 1981 (Evans y Kaufman, 1981; Martin, 1981), se sentaron las bases para el desarrollo de las metodologías necesarias que conducirían más tarde a generar ESCs humanas (hESCs, siglas inglesas de *human embryonic stem cells*) con características similares a las del ratón. Cuando en noviembre de 1998, el grupo estadounidense liderado por el Dr. James Thomson publicó los datos sobre la derivación de las primeras líneas de hESCs a partir de un blastocisto en fase de preimplantación, no sólo se abrió una puerta de esperanza para la curación de enfermedades hasta ahora incurables, sino también por el descubrimiento de una herramienta biológica sin precedentes para llevar a cabo investigación básica (Thomson *et al.*, 1998). Este grupo consiguió 5 líneas de hESCs a partir de 14 ICMs mediante la técnica de inmunocirugía (Solter y Knowles, 1975), y utilizando un cultivo sobre fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs, siglas inglesas de *Mouse Embryonic Fibroblast*). Todas las líneas de hESCs fueron caracterizadas mediante métodos fenotípicos y genotípicos en estudios funcionales *in vitro* e *in vivo*.

1.3.2 Relevancia de las hESCs

Las hESCs se postulan como una herramienta de enorme valor para la investigación básica dirigida hacia el *screening* de nuevos fármacos, así como un modelo para estudiar la etiología de las enfermedades que tienen su origen durante la etapa prenatal, o como fuente futura de células con potencial en terapia de reemplazo (Menendez *et al.*, 2006). Merece destacar que las hESCs son la única alternativa para estudiar los mecanismos celulares y moleculares que definen la especificación tisular durante el desarrollo embrionario humano. Los estudios sobre ESCs constituyen hoy en día uno de los temas más controvertidos en el campo de las ciencias biomédicas. Por una parte han logrado motivar a la comunidad científica, y además, han trascendido hasta el ámbito social, convirtiéndose en un objeto de atención generalizada.

1.4 Definición biológica de ESC

1.4.1 Características esenciales de las ESCs

Las características esenciales que permiten que una célula se defina como ESC se pueden reducir a las siguientes (Alonso-Bedate, 2003):

- 1) Se derivan de células pluripotentes de la ICM del blastocisto.
- 2) Son células diploides estables y poseen un cariotipo normal cuando se cultivan *in vitro*. Su variante transformada se conoce como células de carcinoma embrionario (hECCs, siglas inglesas de *human embryonic carcinoma cells*)
- 3) Se pueden propagar de forma indefinida en el estado embrionario indiferenciado y por tanto son capaces de experimentar un número teóricamente ilimitado de divisiones mitóticas simétricas sin diferenciarse.
- 4) Se pueden diferenciar de forma espontánea para dar lugar a múltiples células que representan las tres capas de células germinales embrionarias (endodermo, mesodermo y ectodermo).
- 5) Se pueden diferenciar tanto si son transplantadas a un embrión temprano como a uno tardío, es decir, capaces de integrarse en todos los tejidos fetales durante el desarrollo. Es decir, son capaces de generar quimeras, si bien dichas quimeras son sólo aprobadas éticamente con mESCs.
- 6) Se pueden diferenciar *in vitro* de forma dirigida en las condiciones apropiadas.

Aunque todos estos requisitos son necesarios para definir con precisión el carácter pluripotente de una ESC, los elementos esenciales se pueden reducir a dos: que las ESC se puedan cultivar *in vitro* y que se puedan expandir de forma indefinida *in vitro* manteniendo el carácter indiferenciado característico de las células de las que originalmente se derivaron.

1.5 Naturaleza y origen de las ESCs

1.5.1 Fecundación del ovocito

El desarrollo embrionario en un organismo animal comienza cuando una célula reproductora femenina es fecundada por una célula reproductora

masculina. El cigoto originado contiene la información genética necesaria para todo el proceso del desarrollo embrionario (Figura 3). En mamíferos, este proceso es bastante lento, cuando lo comparamos con la mosca *Drosophila melanogaster*, la cual, 24 horas tras la fecundación, forma una larva de vida libre con más de 60.000 células organizadas en diferentes tejidos. En ese tiempo, el embrión de un ratón está todavía en el estadio de dos células, siendo la división, mucho más lenta (López-Guerrero, 2003).

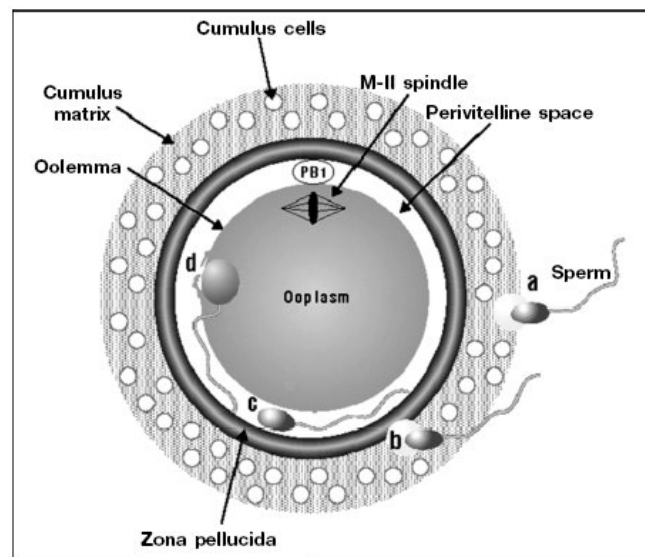


Figura 3: Proceso de fecundación de un ovocito por parte de un espermatozoide (Imagen tomada de www.academiavita.org) A) Llegada del espermatozoide a las células del cúmulo; B) Contacto del espermatozoide con la zona pelúcida; C) El espermatozoide atraviesa la zona pelúcida; D) La cabeza del espermatozoide anida dentro del ovocito.

1.5.2 Segmentación del embrión

Uno de los principales resultados de la fecundación es el inicio de la segmentación. Cuando el cigoto ha llegado al periodo bicelular, experimenta una serie de divisiones mitóticas que producen un incremento simétrico del número de células. Estas células, que se tornan más pequeñas con cada división de segmentación, se denominan blastómeras (Figura 4), y hasta la etapa de 8 células están agrupadas en forma poco compacta (Veeck, 1999; Sadler, 2004).

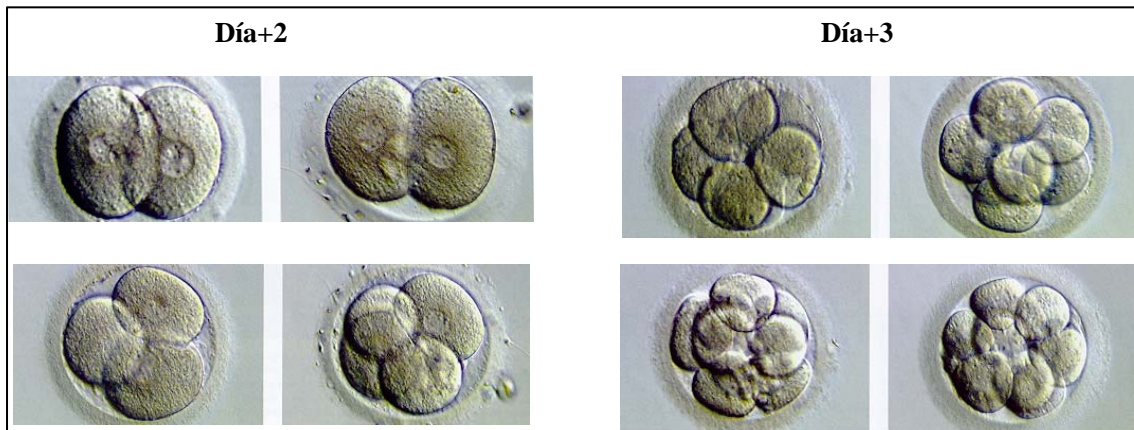


Figura 4: Ejemplos de embriones humanos en división (Imagen modificada de Veeck, 1999). Se muestran embriones en día +2 y día +3 postinseminación con distintos grados de división celular.

1.5.3 Compactación del embrión

Sin embargo, después de la tercera segmentación, el contacto de las blastómeras entre sí es máximo formando una estructura multicelular compacta donde las blastómeras se mantienen juntas por medio de uniones tipo gap. Estas uniones comunican dos células entre sí y permiten que iones y pequeñas moléculas difundan entre las células. Este proceso, denominado compactación, separa a las células internas, que se comunican ampliamente por medio de uniones en hendidura, de las células situadas en el exterior. Las células del embrión compactado vuelven a dividirse para formar una mórula de 16 células (Figura 5) (Veeck, 1999; Sadler, 2004).

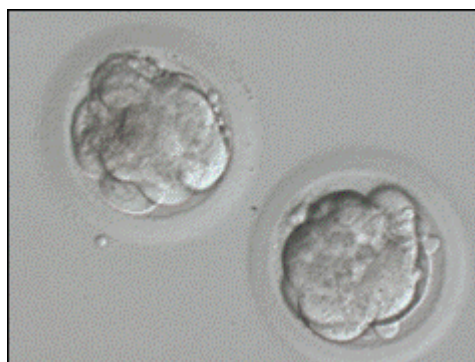


Figura 5: Ejemplos de embriones humanos en estado de compactación (Imagen tomada del BACM). Se puede apreciar como las estrechas uniones que se forman entre las células impiden apreciar células individuales, dando un aspecto compacto de contornos al embrión.

1.5.4 Formación del blastocisto

Las células centrales de la mórula constituyen la ICM, y la capa circundante de células forma la masa celular externa (ECM, siglas inglesas de *external cell mass*) La ICM origina los tejidos del embrión propiamente dicho y la ECM forma el trofoblasto, que más tarde contribuirá a formar la placenta. El trofoblasto juega un doble papel: por un lado da soporte estructural, y por otro ofrece los nutrientes necesarios para el desarrollo del embrión. Llegado un momento en el cual la mórula comienza a recibir líquido por la zona pelúcida hacia los espacios intercelulares de la ICM. Poco a poco los espacios intercelulares confluyen y, por último, se forma una cavidad única, denominada blastocele o cavidad del blastocisto. En esta etapa, el embrión recibe el nombre de blastocisto (Figura 6). Las células de la ICM, que en esta fase se denomina embrioblasto, están situadas en un polo, y las de la ECM, o trofoblasto, se aplanan y forman la pared epitelial del blastocisto (Sadler, 2004).

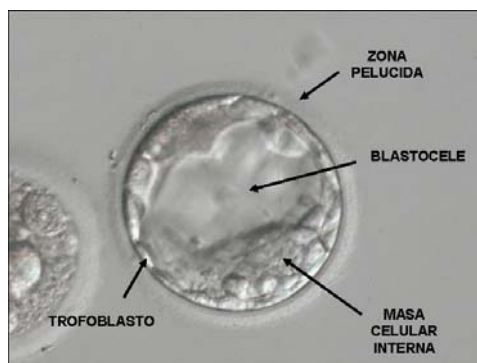


Figura 6: Ejemplo de blastocisto humano donde se detallan las diferentes partes del mismo (Imagen tomada del BACM).

1.5.5 Origen de los embriones utilizados para la derivación de ESCs

En el caso de un modelo animal, como por ejemplo el de ratón, los embriones son obtenidos mediante el lavado de los oviductos de hembras de 3 a 6 meses de edad (Evans y Kauffman, 1981; Martin, 1981).

En el caso de embriones humanos tenemos que recurrir a las técnicas de reproducción asistida (Steptoe y Edwards, 1978). Estas técnicas representan uno de los mayores avances experimentados en las últimas décadas por la medicina. Hoy en día se utilizan para el tratamiento de diferentes causas de esterilidad e infertilidad, tanto de origen femenino como

masculino. Conseguir un embarazo mediante estas técnicas precisa de una gran coordinación y esfuerzo entre los clínicos y el laboratorio de embriología.

La clave del éxito de un programa de FIV reside en administrar un adecuado tratamiento hormonal a cada paciente por parte de los ginecólogos, y en saber seleccionar acertadamente en el laboratorio los embriones más adecuados para la transferencia, que son aquellos en los que se sospecha un elevado poder de implantación. El problema es que para poder obtener unas tasas de éxito aceptables, y que no suelen superar el 50%, es necesario estimular hormonalmente a la mujer lo suficiente para obtener una amplia batería de embriones, donde poder elegir los de mejor calidad para la transferencia al útero. El destino de los embriones sobrantes, que son descartados para la transferencia, es principalmente la crioconservación en nitrógeno líquido para futuro uso de la pareja, donación a otras parejas, donación a la investigación, o destrucción. Dependiendo de la legislación del país, estos embriones podrían tener los mismos destinos sin necesidad de crioconservarlos (Bjuresten y Hovatta, 2007). Estos temas legislativos se explican en la última parte de esta introducción.

1.5.5.1. Técnicas de reproducción asistida. Fecundación *in vitro* (FIV).

Como paso previo a la selección embrionaria, el embriólogo debe obtener y seleccionar los gametos de mejor calidad (día 0):

- **Obtención del gameto femenino:** Se realiza mediante aspiración con aguja y soporte fijador a la sonda vaginal del ecógrafo. Los folículos ováricos se pinchan de manera que el líquido folicular resultante se va depositando en tubos especiales. Una vez llenos los tubos, éstos se transportan hasta el laboratorio para que el embriólogo localice los ovocitos recuperados con la ayuda de un estereomicroscopio. Los ovocitos se colocan en medio de cultivo y se mantienen en un incubador a 37° C y 5% CO₂ (Figura 7) (Mínguez *et al.*, 2000).

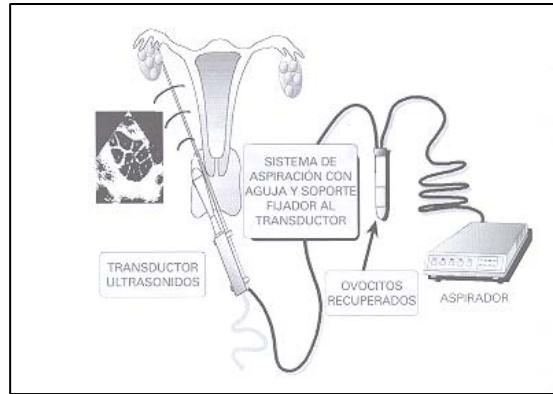


Figura 7: Esquema de la aspiración folicular efectuada en el quirófano de una clínica FIV (Imagen tomada de Mínguez *et al.*, 2000)

- **Obtención del gameto masculino:** La muestra de semen se recoge por masturbación en un frasco de plástico estéril, o también se pueden obtener los espermatozoides mediante biopsia testicular. Con ayuda de un microscopio óptico se visualiza la muestra y se evalúa concentración, movilidad y morfología espermática. Los espermatozoides de mejor calidad se recuperan mediante técnicas de capacitación espermática (Figura 8) (Mínguez *et al.*, 2000).



Figura 8: Espermatozoides humanos (Imagen obtenida de www.kalipedia.com)

- **Técnicas de FIV:**
 - FIV convencional:** se inseminan los ovocitos con un volumen de aproximadamente 100.000 espermatozoides capacitados (Figura 9).

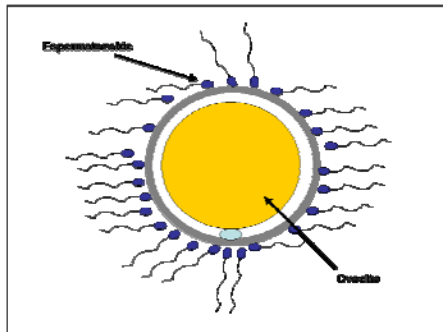


Figura 9: Imagen representativa de FIV convencional (Imagen tomada del BACM).

b.- Inyección intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI, siglas inglesas de *intracytoplasmic spermatozoa injection*): Cada ovocito es microinyectado introduciendo un único espermatozoide capacitado elegido por el embriólogo (Figura 10).

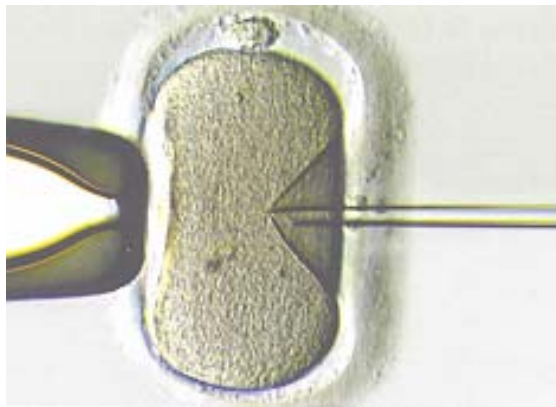


Figura 10: Ejemplo de un ovocito humano inseminado mediante la técnica de ICSI (Imagen tomada de Veeck, 1999)

Estas técnicas se realizan en un máximo de 4-5 horas después de la punción folicular.

A las 17-20 horas de la inseminación o microinyección, se procede a la valoración de la fecundación (día +1), que supone la fusión del espermatozoide y el ovocito para producir una nueva entidad genética conocida como cigoto. En la etapa final de la fecundación se forman los pronúcleos (PN) a partir de la cromatina del espermatozoide y del ovocito (PN femenino y PN masculino) (Veeck, 1999).

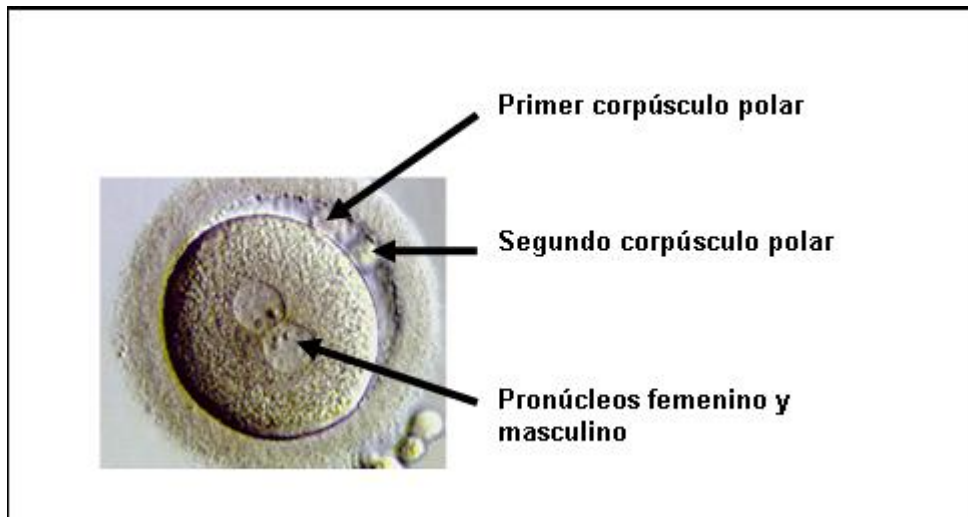


Figura 11: Zigoto humano con presencia de dos PN y dos corpúsculos polares (Imagen modificada de Veeck, 1999)

Los criterios prácticos para evaluar la fecundación son (Figura 11):

- La presencia de 2 PN entre 17-20 horas después de la inseminación.
- La visualización de 2 corpúsculos polares en el espacio perivitelino.

A partir de este momento comienza la etapa de división temprana o segmentación y evolución al estadio de blastocisto descrita en el apartado anterior.

1.5.6 Derivación de ESCs

En los programas de FIV, la calidad de los embriones y blastocistos es uno de los factores más importantes en la determinación de las tasas de implantación y de embarazo (Dokras *et al.*, 1993; Richter *et al.*, 2001; Moriwaki *et al.*, 2004; Kovacic B *et al.*, 2004). Debido a que las ESCs son derivadas principalmente de la ICM de blastocistos expandidos, una buena clasificación de estos es también importante para poder buscar una tasa de derivación aceptable. Además, la clasificación de calidad embrionaria es muy importante a la hora de decidir el método de aislamiento de la ICM más adecuado (Kim *et al.*, 2005). Existen bastantes criterios de clasificación tanto de embriones como de blastocistos, tanto a nivel internacional (Gardner *et al.*, 1998; Veeck *et al.*, 2003; Moriwaki *et al.*, 2004), como en España (ASEBIR, 2007). En estas clasificaciones se evalúa la correcta fertilización de los cigotos, el aspecto de los PN, el ritmo de división de los embriones, el aspecto de las blastómeras y

de la zona peluzida, el grado de fragmentación del embrión. Además, estas clasificaciones también se centran en la calidad de los blastocistos, teniendo en cuenta tanto el aspecto de las células del trofoectodermo, como el tamaño y aspecto de la ICM. Esta última característica es la que más se tendría en cuenta en el proceso de derivación de ESCs. La tasa de éxito en la derivación de hESCs sigue siendo extremadamente baja actualmente, necesitándose un gran número de embriones para poder derivar líneas de ESCs establecidas y caracterizadas, sobre todo cuando los embriones a los que se puede optar son los sobrantes de las técnicas de reproducción asistida, y que, por tanto, no fueron prioritarios a la hora de realizar la transferencia. Este hecho ha dado lugar a que muchos grupos de investigación inmersos en la derivación de hESCs utilizando tanto embriones frescos como congelados, comiencen a tener en cuenta la calidad embrionaria de estos preembriones (Zhang *et al.*, 2006; Lerou *et al.*, 2008).

Como hemos dicho anteriormente, para poder obtener ESCs tenemos que aislar las células de la ICM. Para realizar esta operación existen diferentes tipos de técnicas.

Por un lado está el cultivo directo del blastocisto sobre la superficie de cultivo elegida (Kim *et al.*, 2005). Se trata del método más empleado en la actualidad. Así, tanto las células del trofoectodermo, como las de la ICM se adhieren a dicha superficie (Figura 12). Pasados unos días, los dos tipos celulares sufren un sobrecrecimiento, y mecánica o enzimáticamente se aísla la ICM. Con este método se evita el uso de componentes de origen animal (xenobióticos). Además, se trata de una metodología eficaz cuando la ICM es claramente distinguible. Pero existe una desventaja debido al riesgo de perder la ICM en embriones de mala calidad debido al sobrecrecimiento de las células del trofoectodermo (Tabla 1).

Otro método de aislamiento de la ICM es la inmunocirugía (Solter y Knowles, 1975), muy empleado por los distintos grupos de investigación durante años debido a su alto nivel de eficacia, pero que está en desuso debido a que los medios utilizados contienen componentes xenobióticos, con el riesgo de contaminación cruzada (Tabla 1). Consiste en tratar los blastocistos con *Antihuman whole-serum antibody* (Sigma, St. Louis, MO). Se incuban durante 30 minutos a 37°C y 5% de CO₂. Se lavan y se tratan con *Guinea-pig* (Sigma)

durante otros 30 minutos, diluido con gelatina a 37° C y 5% de CO₂. De esta manera el trofoectodermo es lisado debido a la acción de los anticuerpos. La ICM es colocada sobre la superficie de crecimiento elegida (Figura 13).

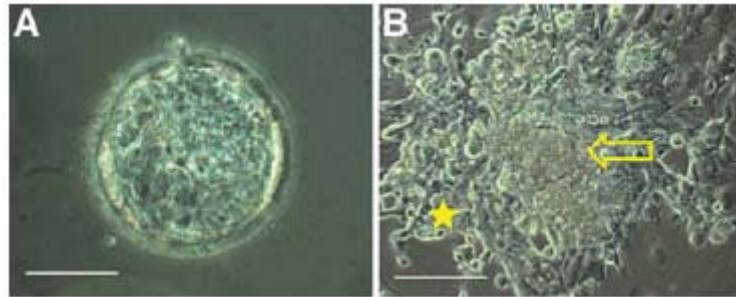


Figura 12: Aislamiento de la ICM utilizando un método de cultivo directo utilizando un blastocisto murino (Imagen tomada de Kim *et al.*, 2005). A) Un blastocisto humano de mala calidad ha sido tratado con pronasa para eliminar la zona pelucida y es transferido a una superficie de MEFs. B) Tras 7 días de cultivo, pudo diferenciarse una ICM redondeada de las células diferenciadas del trofoectodermo. La flecha gruesa indica la ICM tras 7 días de cultivo. La estrella indica la zona de trofoectodermo con células diferenciadas.

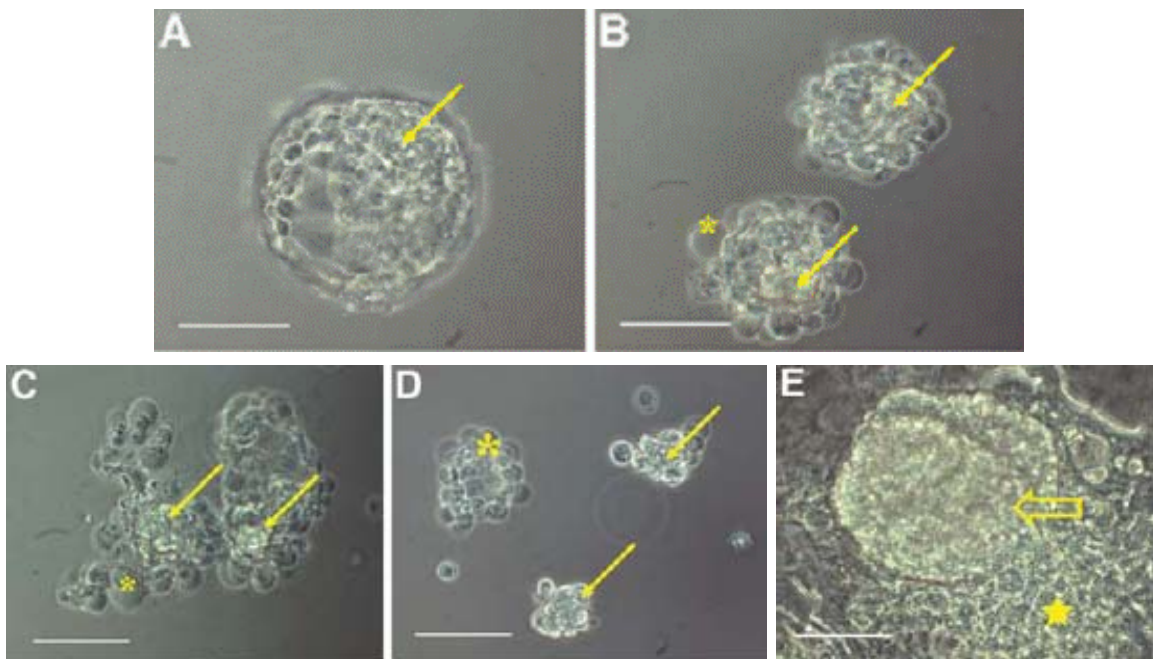


Figura 13: Aislamiento de la ICM utilizando el método químico de inmunocirugía (Imagen tomada de Kim *et al.*, 2006). A) Un blastocisto con buena calidad, donde se distingue la ICM fue tratado con pronasa para disolver la zona pelucida. Dicho blastocisto, ahora carente de zona pelucida fue trata con “anti-human whole antibody “ y con “guinea pig complement”. B) El trofoectodermo se lisó tras el tratamiento con estos anticuerpos. C) El trofoectodermo lisado fue cuidadosamente separado de la ICM mediante pipeteo. D) La ICM, completamente separada del

trofoectodermo, fue entonces transferida a una placa de cultivo con MEFs. E) Tras 7 días de cultivo, pudo diferenciarse una ICM redondeada de las células diferenciadas del trofoectodermo. La flecha amarilla delgada indica la localización de la ICM. Los asteriscos indican el trofoectodermo lisado. La flecha gruesa indica la ICM tras 7 días de cultivo. La estrella indica la zona de trofoectodermo con células diferenciadas.

Existen otros métodos mucho menos extendidos, como los mecánicos, bien por micromanipulación, (Bongso *et al.*, 1994) (Figura 14), o por empleo del disector láser (Figura 15). El método mecánico consiste en aislar mecánicamente la ICM mediante el uso de un sistema de micromanipulación utilizando una pipeta de micromanipulación fina y la ICM aislada es colocada sobre la superficie de crecimiento elegida. Este método tiene como ventajas que se evita el uso de componentes xenobióticos, siendo una metodología eficaz cuando la ICM es claramente distinguible. Sin embargo, esta técnica tiene como desventajas el excesivo tiempo y trabajo empleado, y que no es aplicable en blastocistos de mala calidad (Tabla 1).

El empleo del láser es un nuevo método de aislamiento mecánico de la ICM probado en modelo murino por varios grupos, dando buenas tasas de derivación de mESCs (Tanaka *et al.*, 2006), e incluso ya demostrado en humanos (Turetsky *et al.*, 2008). Consiste en ir aplicando disparos de láser a las células del trofoblasto destruyéndolas, siendo solamente las células de la ICM las que se adhieren a la superficie de cultivo elegida (Figura 15). Las ventajas de este método son la no utilización de componentes xenobióticos. Es una metodología eficaz cuando la ICM es claramente distinguible y se trata de una técnica de mayor facilidad frente a la pipeta de micromanipulación (Tabla 1).

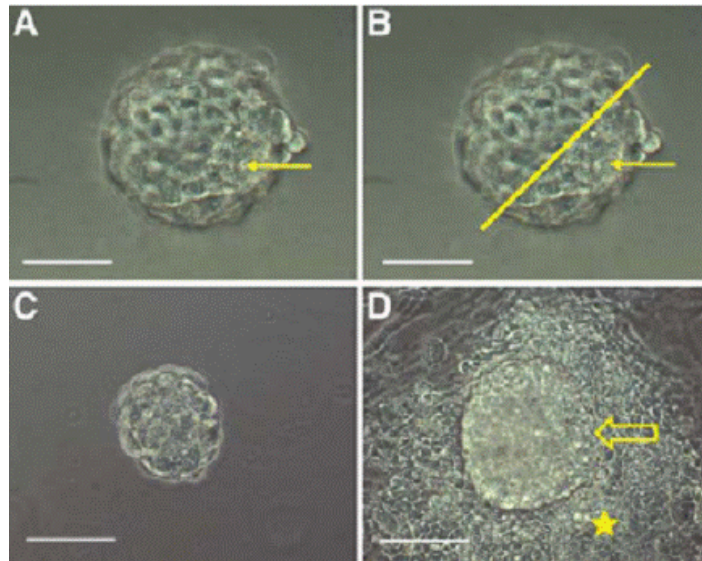


Figura 14: Aislamiento de la ICM utilizando un método mecánico (Imagen tomada de Kim *et al.*, 2006). A) El blastocisto ha sido tratado con pronasa para eliminar la zona pelucida. B) La región donde está localizada la ICM es aislada con la ayuda de una aguja de cristal a lo largo de la línea indicada. C) La porción donde se encontraba la ICM fue localizada y transferida a una placa de cultivo con MEFs. D) Tras 7 días de cultivo, pudo diferenciarse una ICM redondeada de las células diferenciadas del trofoectodermo. Las flechas delgadas indican la ICM. La flecha gruesa indica la ICM tras 7 días de cultivo. La estrella indica la zona de trofoectodermo con células diferenciadas.

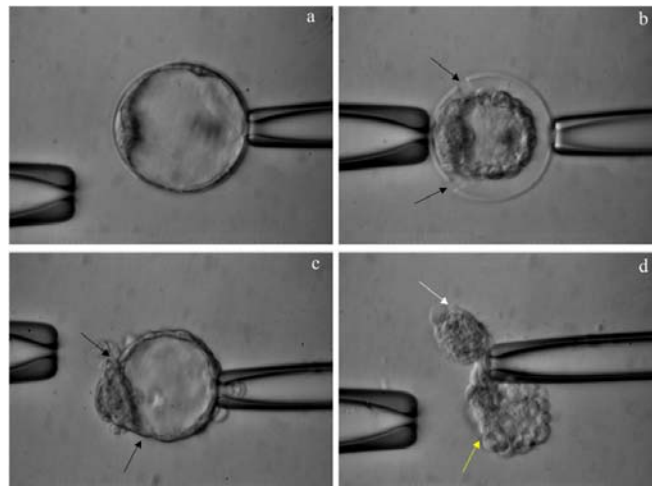


Figura 15: Aislamiento de la ICM utilizando un disector láser utilizando un blastocisto murino (Imagen tomada de Tanaka *et al.*, 2006). A) Blastocisto sujeto con dos pipetas de sujeción con la ICM posicionada a las 9 según un reloj. B) Blastocisto tras primeros disparos de láser aún manteniendo la zona pelucida. C) Blastocisto tras impacto de láser una vez liberado de la zona pelucida. D) Fragmentos de blastocisto resultantes. Las flechas negras de B y C indican el lugar de impacto del láser. La flecha blanca indica el fragmento de blastocisto que contiene la

ICM. La flecha amarilla indica el fragmento de blastocisto que contiene las células del trofoectodermo.

Debido a la controversia ético-social que envuelve a las hESCs respecto a la destrucción de embriones humanos en el proceso de derivación, y de la cual hablaremos más adelante, se ha desarrollado un nuevo método de derivación, donde se obtienen hESC a partir de una sola blastómera del embrión (Chung et al., 2006; Klimanskaya et al., 2006). Mediante esta técnica se realiza la biopsia de una sola blastómera de un embrión en estadio de células, sin que el embrión sea destruido (Figura 16). La blastómera es colocada directamente sobre la superficie de cultivo elegida (Tabla 1).

La morfología de las células y el aspecto y estructura de las colonias presenta ciertas características específicas en función del tipo de célula troncal de que se trate. Típicamente, las mESCs tienden a formar agregados redondeados, con varias capas de grosor (Figura 17), mientras las hESCs suelen formar colonias en monocapa (Figuras 18).

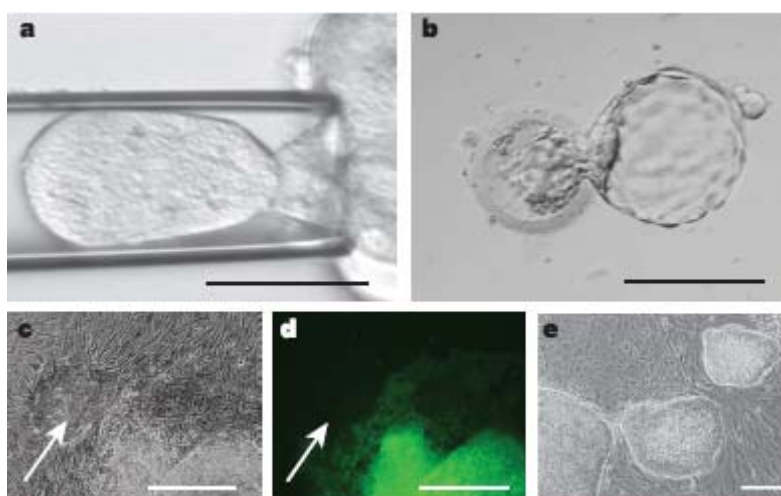


Figura 16: Derivación de hESC a partir de blastómeras aisladas (Imagen tomada de Klimanskaya *et al.*, 2006). A) Biopsia de una sola blastómera. B) Desarrollo de un embrión que ha sido biopsiado hasta el estadio de blastocisto liberado de la zona peluzida (*hatching*). C, D) Colonia primaria a partir de una sola blastómera y donde se demuestra la positividad para la proteína verde fluorescente (GFP, siglas inglesas de *Green Fluorescent Protein*). La flecha indica la colonia primaria. El mismo campo está mostrado tanto en contraste de fases (C) y fluorescencia (D). E) Morfología típica de colonias de hESC derivadas a partir de una sola blastómera.

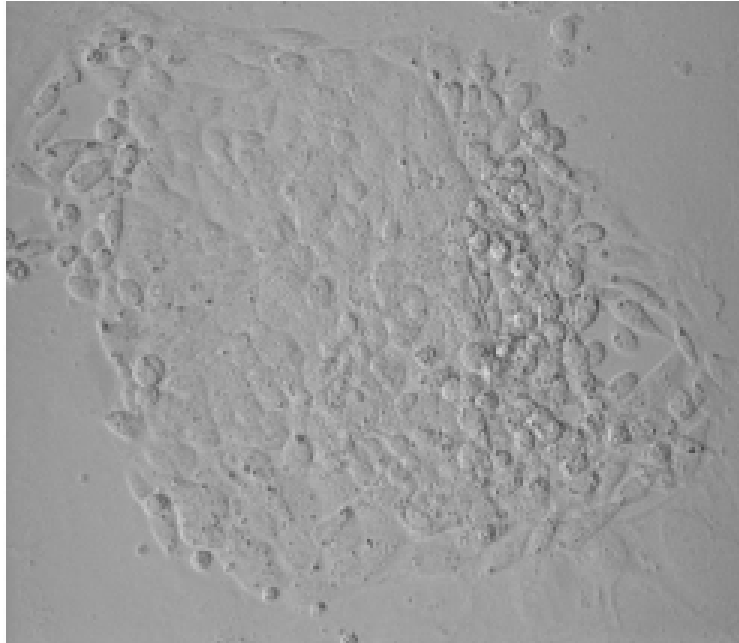


Figura 17: Ejemplo representativo de una colonia de mESCs (Imagen tomada de Tanaka et al., 2006).

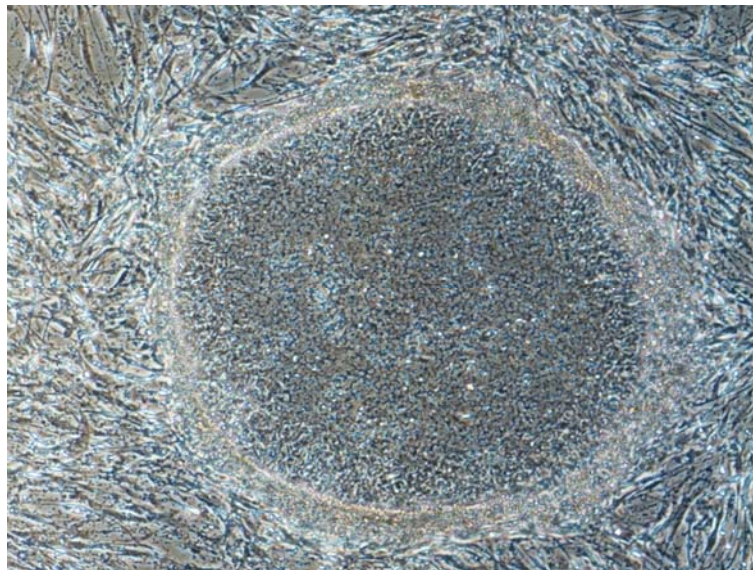


Figura 18: Ejemplo representativo de una colonia de hESCs (Imagen tomada del BACM).

Tabla 1: Esquema con las características principales, ventajas e inconvenientes de los métodos de derivación más frecuentemente usados.

MÉTODO DE DERIVACIÓN	METODOLOGÍA	VENTAJAS	INCONVENIENTES
QUÍMICO (INMUNOCIRUGÍA)	<ul style="list-style-type: none"> - Disolución de la zona pelúcida - Se tratan los blastocistos con Antihuman whole-serum antibody y Guinea-pig. De esta manera el trofoectodermo es lisado debido a la acción de los anticuerpos. - La ICM es colocada sobre la superficie de crecimiento elegida 	<ul style="list-style-type: none"> - Metodología eficaz 	<ul style="list-style-type: none"> - Uso de componentes de origen animal con alto riesgo de xenocontaminación cruzada.
CULTIVO DIRECTO BLASTOCISTO	<ul style="list-style-type: none"> - Disolución de la zona pelúcida -El blastocisto es colocado sobre la superficie de crecimiento elegida. 	<ul style="list-style-type: none"> - Se evita el uso de componentes xenobióticos. - Metodología eficaz cuando la ICM es claramente distinguible. 	<ul style="list-style-type: none"> - Riesgo de perder la ICM en embriones de mala calidad debido al sobrecrecimiento de las células del trofoectodermo.
CULTIVO DIRECTO DE UNA SOLA BLASTÓMERA	<ul style="list-style-type: none"> - Biopsia de una sola blastómera de un embrión en estadio de células. - La blastómera es colocada sobre la superficie de crecimiento elegida. 	<ul style="list-style-type: none"> - Se evita el uso de componentes xenobióticos. - Se evita la destrucción del embrión. 	<ul style="list-style-type: none"> - Metodología no eficaz - El embrión resultante conlleva connotaciones éticas discutibles
MECÁNICO (MICROMANIPULACIÓN)	<ul style="list-style-type: none"> - La ICM es aislada mecánicamente mediante el uso de un sistema de micromanipulación utilizando una pipeta de micromanipulación fina. - La ICM aislada es colocada sobre la superficie de crecimiento elegida. 	<ul style="list-style-type: none"> - Se evita el uso de componentes xenobióticos. - Metodología eficaz cuando la ICM es claramente distinguible. 	<ul style="list-style-type: none"> - Método de derivación que entraña bastante tiempo y trabajo. - No aplicable en blastocistos de mala calidad.
MECÁNICO (LÁSER)	<ul style="list-style-type: none"> - La ICM es aislada mecánicamente mediante el uso de un sistema de micromanipulación y un disector láser que destruye las células del trofoectodermo. - La ICM aislada es colocada sobre la superficie de crecimiento elegida. 	<ul style="list-style-type: none"> - Se evita el uso de componentes xenobióticos. - Metodología eficaz cuando la ICM es claramente distinguible. - Mayor facilidad frente a la pipeta de micromanipulación. 	<ul style="list-style-type: none"> - No aplicable en blastocistos de mala calidad.

1.5.7. Sistemas actuales de cultivo de hESCs

Originalmente, las hESCs fueron derivadas en un medio que contenía suero, utilizando además una monocapa de fibroblastos, tanto de origen animal (MEFs), que secretaba factores esenciales para el mantenimiento del estado de indiferenciación de las hESCs (Thomson *et al.*, 1998). Sin embargo, este suero es una mezcla compleja de proteínas de composición desconocida, donde el 99% es albúmina (Bendall *et al.*, 2007). Sería deseable solucionar ese problema mediante el uso de un sistema de cultivo sin células alimentadoras (*feeders*) y utilizando un medio de composición proteica conocida para minimizar la variabilidad en las condiciones de cultivo que afectan al crecimiento adecuado de las hESCs. Además, desde un posible punto de vista terapéutico futuro, es importante que las hESCs sean derivadas y mantenidas bajo condiciones libres de componentes xenobióticos (Rao y Zandstra, 2005).

El primer cultivo de hESCs libre de fibroblastos se realizó utilizando medio condicionado por los factores secretados por MEFs y creciendo sobre un soporte de MatrigelTM o placas con laminina (Xu *et al.*, 2001). MatrigelTM es una mezcla compleja con origen en sarcoma murino y que contiene proteínas de la matriz extracelular, mayoritariamente laminina, colágeno IV, proteoglicanos y entactina. El suero animal fue reemplazado por un nuevo medio más definido llamado Knockout Serum Replacement (SR) que contiene componentes tales como la insulina, transferrina y albúmina bovina rica en lípidos (Price *et al.*, 1998). Todos estos hallazgos buscaban un aspecto importante que hay que tener muy en cuenta durante el cultivo de hESCs. Se trataba de que las células que se utilizaban como soporte de hESCs podían producir factores que promueven o prolongan el mantenimiento de la hESC. Un ejemplo de este hecho fue el mantenimiento de hESCs utilizando una matriz de fibronectina y medio con SR pero no condicionado por MEFs o fibroblastos humanos (HFs, siglas inglesas de *human embryonic fibroblasts*), suplementado además con factor básico de crecimiento fibroblástico (bFGF, siglas inglesas de *Basic Fibroblast Growth Factor*) y el factor de crecimiento transformante- β 1 (TGF- β 1, siglas inglesas de *Transforming growth Factor*) (Amit *et al.* 2004). Actualmente, se considera indispensable el suplemento de cualquier medio de cultivo para hESCs con bFGF, (Bendall *et al.*, 2007). Este estudio ha demostrado que la molécula bFGF actúa sobre células accesorias (las que necesita la célula

madre para vivir). El bFGF actúa a su vez sobre la célula madre evitando que ésta se diferencie en alguno de los 200 tipos de células especializadas del organismo, lo que permite al investigador conservar en el laboratorio el material biológico en el estado adecuado y el tiempo necesario hasta destinarlo a aplicaciones futuras. Las hESCs han sido también mantenidas en estado indiferenciado en placas con Matrigel™ utilizando medio no condicionado suplementado con altas concentraciones de bFGF (Wang *et al.*, 2005), una combinación de *noggin*, un antagonista de la proteína morfogénica de hueso, (BMP, siglas inglesas de Bone Morphogenic Protein) y bFGF (Xu *et al.*, 2005), o mediante una combinación de factor de crecimiento de queratinocitos (KGF, siglas inglesas de *Keratinocyte Growth Factor*), nicotinamida y activina A (Beattie *et al.*, 2005). Sin embargo, con el uso de estos componentes no eliminamos el problema de utilizar componentes de origen no humano. La solución a este problema sería el uso de HFs junto con suero humano (Richards *et al.*, 2002). Estos HFs pueden proceder de distintas fuentes como músculo fetal, piel fetal (Richards *et al.* 2002), prepucio neonatal (Hovatta *et al.*, 2003), piel adulta y músculo adulto (Richards *et al.*, 2003), células estromales de la médula ósea (Cheng *et al.*, 2003), células uterinas endometriales adultas y fibroblastos embrionarios (Lee *et al.*, 2004), e incluso células antólogas procedentes de hESCs ya establecidas (Stojkovic *et al.*, 2005). Muy recientemente, las hESCs se han mantenido y diferenciado a células hematopoyéticas utilizando células del estroma derivadas a partir de nichos hematopoyéticos (Ledran *et al.*, 2008), lo que podría abrir unas buenas expectativas respecto a la derivación de hESCs utilizando como soporte distintos tipos de células mesenquimales (MSCs, siglas inglesas de *Mesenchymal Stem Cells*). Las MSCs son células de origen mesodérmico con morfología fibroblastoide. Durante el desarrollo embrionario estas células están muy ligadas al desarrollo de la hematopoyesis. Son células estromales, es decir, tienen un papel de soporte celular y apoyo nutricional a otras células de su entorno mediante la producción de distintos morfógenos y moléculas clave para que se produzca la proliferación y diferenciación de determinadas células (*homing*). Es el caso de Sonic hedgehog, distintos componentes de la vía de señalización de Wnt, Notch, BMP (Schaffler and Buchler, 2007; Ucelli *et al.*, 2008).

1.5.8. Factores extracelulares que regulan la capacidad de auto-renovación de las hESCs.

El estado indiferenciado de las hESCs puede ser mantenido por factores extracelulares proporcionados por las proteínas de la matriz extracelular (EM, siglas inglesas de Extracellular Matrix), tales como la laminina, así como factores añadidos de manera exógena que pertenecen a las familias de TGF- β 1 y bFGF, descritos anteriormente (Rao y Zandstra, 2005).

Además, se ha descubierto que las principales propiedades de las células madre, como son la auto-renovación y la pluripotencia no son autónomas de este tipo de células, sino que forman parte del control externo a partir del microambiente que define el nicho de células madre (Scadden, 2006). En cambio, parece ser que las ESCs pueden ser una excepción, ya que este tipo de células madre son separadas de su microambiente blastocitario y son cultivadas *in vitro* durante un tiempo prolongado. Recientemente se ha demostrado, usando experimentos proteómicos, que un soporte celular fibroblástico actúa como un nicho para promover la producción del factor de crecimiento de la insulina (IGF, siglas inglesas de *Insulin-like Growth Factor*), del cual el IGF-II fue el mejor representado (Bendall *et al.*, 2007). Este compuesto tiene un papel importante en la supervivencia y capacidad de auto-renovación de las hESCs, ya que tiene un papel regulador en el desarrollo preimplantacional y embrionario (Kauma, 2000).

1.5.9. Propiedades del Y-27632 (iROCK), un inhibidor específico de las quinasas asociadas a Rho.

Las funciones de la proteína Rho como un interruptor molecular de varios procesos celulares se llevan a cabo mediante un proceso de fosforilación-desfosforilación entre su forma inactiva (GDP-ligando) y la activa (GTP-ligando) (Ishizaki *et al.*, 2000). Los estudios realizados sobre este mecanismo han identificado varias acciones celulares de Rho. Estas acciones incluyen la regulación de los procesos de estímulo-inducción entre la células y el sustrato respecto a adhesión y movilidad, retracción celular, citocinesis, sensibilización al Ca^{2+} del músculo estriado en el proceso de contracción, así como también es rescatable su papel en la progresión de la fase G₁ a la S en el ciclo celular, la transformación celular y la transcripción celular (Narumiya, 1996).

Algunas proteínas han sido aisladas como supuestos efectores de Rho según su interacción selectiva con el GTP-ligando que forma Rho. Estas proteínas incluyen a las quinasas asociadas a Rho mediante serina/treonina (ROCK, siglas inglesas de *Rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase*) (Ishizaki *et al.*, 2000). Esta familia de quinasas está concretamente envuelta en la formación de fibras de actina y adhesiones focales (Leung *et al.*, 1996; Amano *et al.*, 1997; Ishizaki *et al.*, 1997), y en la regulación de la actividad fosfatasa de la miosina (Kimura *et al.*, 1996). Para poder inhibir a esta familia de quinasas de ROCK, se han elaborado sintéticamente nuevos compuestos, como el Y-27632 (Uehata *et al.*, 1997). Se vio como este compuesto inhibía la contracción inducida agonista tanto vascular como bronquial del músculo estriado a través de la inhibición de los mecanismos de sensibilización al Ca^{2+} durante la contracción del músculo estriado.

Actualmente, dentro de la investigación con hESCs, se ha observado una baja tasa de supervivencia tras los procesos de disociación celular, lo que supone un obstáculo a la investigación, sobre todo en los procesos de subclonaje. Esto es debido a problemas encontrados en las hESCs como su alta vulnerabilidad a entrar en apoptosis. En un esfuerzo por solucionar el problema de la apoptosis en cultivos celulares con hESCs, se han examinado los efectos de varios inhibidores de la caspasa, factores de crecimiento, factores tróficos e inhibidores de las quinasas. De todos los inhibidores testados, el Y-27632 fue el inhibidor más potente de la apoptosis (Watanabe *et al.*, 2007), aunque aún no está muy claro el papel que juega ROCK en la apoptosis (Riento y Ridley, 2003). Recientemente, se ha encontrado una nueva aplicación del iROCK en el campo de las hESCs. Se ha demostrado que el iROCK mejora la tasa de supervivencia de las hESCs en el proceso de congelación y descongelación, donde hasta la fecha se perdían o diferenciaban muchas células utilizando los procesos de congelación lenta, el uso de dimetilsulfoxido (DMSO), o la vitrificación (Martin-Ibañez *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2008, 2009).

2. CARACTERIZACIÓN DE LAS ESCs

2.1 Criterios de caracterización de ESCs

Los criterios tradicionalmente empleados para demostrar pluripotencialidad de las ESCs están basados en tres tipos de experimentos (Martin, 1981): i) la formación de quimeras donde las ESCs contribuyen a formar todos los tejidos del organismo, ii) la observación de que las ESCs se diferencian *in vitro* de forma espontánea y dirigida, y iii) la formación de teratomas tras la inyección de ESCs en animales adultos.

Además, existen multitud de marcadores moleculares, genéticos e inmunofenotípicos que distinguen a las ESCs.

2.1.1 Marcadores característicos de estado indiferenciado

Aunque no parece que exista duda de que las ESCs aisladas de blastocistos tengan capacidad pluripotente, la cuestión importante está en saber si también las líneas celulares que crecen permanentemente en cultivo retienen sus características iniciales. La presencia o ausencia de marcadores específicos indica si las ESCs en cultivo permanecen o no en el estado indiferenciado.

Un gran número de marcadores de superficie están siendo usados actualmente para caracterizar ESCs, incluyendo varios glucolípidos y glucoproteínas que fueron identificados originalmente en hECCs o en embriones en estadio preimplantacional (Hoffman y Carpenter, 2005). En el caso de las hESCs estos marcadores son el SSEA-3, el SSEA-4, el TRA-1-60, y el TRA-1-81 (Andrews *et al.*, 1984). Las hESCs también expresan antígenos de superficie tales como CD133, c-kit (CD117), flt3 (CD135) y CD9 (Kaufman *et al.*, 2001; Carpenter *et al.*, 2004). Los estudios de evaluación de la estabilidad de hESCs han indicado que la expresión de estos marcadores específicos de membrana se mantiene tras cultivo prolongado utilizando cualquier tipo de las superficies de crecimiento descritas anteriormente (Amit *et al.*, 2000; Richards *et al.*, 2002; Rosler *et al.*, 2004), utilizando medio de cultivo libre de suero conteniendo una combinación de factores de crecimiento, el TGF- β 1, el bFGF, y el factor inhibidor de la leucemia (LIF, siglas inglesas de *leukaemia inhibitor factor*) (Amit *et al.*, 2000). El LIF es un factor mitogénico esencial para que las

mESCs permanezcan en estado de indiferenciación progresiva *in vitro*, aunque no se ha visto efecto alguno cuando hablamos de hESCs (Conner, 2001; Menendez et al., 2005).

Un número amplio de factores de transcripción juegan un papel crucial en la auto-renovación de las ESCs, y el análisis de su expresión es usado también para caracterizar ESCs (Hoffman y Carpenter, 2005). El más importante es el factor de transcripción Oct-3/4 (Nichols *et al.*, 1998), Rex-1, Sox-2 y Nanog (International Stem Cell Initiative, 2007).

Desde que se derivó la primera hESC en 1998 (Thomson *et al.*, 1998) hasta la actualidad, se han derivado numerosas líneas embrionarias humanas en distintos laboratorios pertenecientes a distintos países. Las técnicas para la derivación y posterior mantenimiento del cultivo celular varían entre distintos laboratorios. Este hecho, junto con las variaciones genéticas que poseen los distintos embriones utilizados, añade fuentes adicionales de variación que podrían otorgar diferentes propiedades a las distintas hESCs. Para poder consensuar las características principales en todas las hESCs se estableció una iniciativa internacional (International Stem Cell Initiative, 2007), para llevar a cabo un estudio comparativo de un gran número de hESC derivadas en distintos laboratorios de distintos países. El objetivo fue evaluar las similitudes y diferencias en la expresión de diferentes marcadores, para identificar cuales son los más identificativos para establecer la identidad de una hESC. En este estudio han participado 17 laboratorios de 11 países para la expresión de 17 antígenos de superficie y 93 genes. Según esta iniciativa internacional las hESCs deben poseer una expresión similar de unos determinados marcadores, canon de su capacidad de auto-renovación y pluripotencia. Estos marcadores de superficie deben expresar los antígenos SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81, GCMT2 y GCT343. Además, deben expresar una serie de genes asociados al mantenimiento de la pluripotencia: NANOG, POU5F1 (OCT-3/4) y otros 14 genes cuya expresión está asociada a NANOG. Por último, esta iniciativa internacional propone que las hESCs sean capaces de dar lugar a la formación de teratomas cuando se inyectan en ratones inmunodeficientes para demostrar su capacidad en las tres líneas germinales *in vivo*, tal como se tratará más adelante.

2.1.2 Diferencias entre las mESCs y las hESCs

Existen diferencias importantes entre las mESCs y las hESCs. Como hemos indicado antes, las mESCs tienden a formar agregados redondeados, con varias capas de grosor (Figura 17), mientras las hESCs forman colonias planas y compactas (Figura 18). Otra diferencia importante entre mESCs y hESCs es la influencia del LIF. La influencia en hESCs es prácticamente nula, mientras que en mESCs esta es detectable en niveles altos (Ginis *et al.*, 2004). Estos resultados son consistentes con la capacidad de mantener las hESCs indiferenciadas sin necesidad de utilizar LIF, y con la señal de LIF encontrada en líneas humanas de teratocarcinoma (Schuringa *et al.*, 2002). Dentro del amplio abanico de marcadores que existen en la actualidad, también encontramos diferencias en su expresión entre las mESCs y hESCs. Las hESCs expresan los antígenos específicos de estado embrionario SSEA-3 y SSEA-4, que no expresan en mESCs, mientras que no expresan SSEA-1, que sí se expresa en mESCs (Krupnick *et al.*, 1994). En la Tabla 2 queremos enumerar las diferencias más importantes que existen entre las mESCs y las hESCs, tanto a nivel morfológico, como de expresión de distintos antígenos.

Todas estas diferencias indican claramente que, aunque las mESCs y las hESCs sean muy parecidas en cuanto a su potencial de diferenciación, no está claro todavía que los datos obtenidos sobre los mecanismos de diferenciación de las mESCs se puedan extrapolar a las hESCs.

2.1.3 Diferenciación espontánea *in vitro*

Quizás el método más común en la diferenciación de las ESCs es la creación de cuerpos embrioides (EBs, siglas inglesas de *embrioid bodies*). Los EBs están constituidos por agrupaciones de células madre cultivadas en flotación y que presentan una morfología similar al embrión en su etapa de gastrulación. Dentro de estos EBs existen múltiples movimientos celulares semejantes a los que ocurren *in vivo* que marcan la simetría embrionaria, la especificación hacia un linaje concreto, etc. En estos EBs se produciría una primera diferenciación hacia una capa germinal concreta que se completaría después, bien añadiendo factores de crecimiento específicos para un determinado linaje (Wang *et al.*, 2006), o bien mediante cocultivo con células adultas que actuarían como un nicho para el crecimiento y diferenciación de las

hESCs (neuronas dopaminérgicas diferenciadas a partir del cocultivo con células estromales PA6 (Zeng *et al.*, 2004), o incluso el uso de estructuras tridimensionales de polímeros sobre las que crecerían las células diferenciadas (Hyslop *et al.* 2005). En definitiva, la formación de EBs, además de ser un primer paso hacia la diferenciación específica de la línea, constituyen un hecho clave en la caracterización de las ESCs. De esta manera, se debe lograr una diferenciación espontánea a tejidos que representen a cada una de las tres capas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo).

Tabla 2: Diferencias más importantes entre las mESCs y las hESCs.

PROPIEDAD	mESCs	hESCs
Fosfatasa Alcalina	+	+
SSEA-1	+	-
SSEA-3	-	+
SSEA-4	-	+
TRA-1-60	-	+
TRA-1-81	-	+
OCT 3/4	+	+
SOX2	+	+
REX1	+	+
TERT	+	+
FGF4	+	+
FOXD3	+	-
BCRP-1	+	+
LIFR	+	-
gp 130	+	+
STAT3	+	+
Nanog	+	+
Sensible a LIF	+	-
Sensible a FGF	-	+
Morfología	Diversa	Redondeada y afilada
Formación de EB Clonales	+	-
Formación de Chimeras	+	N/D
Formación de Teratomas	+	+
Frecuencia	1 en 10 ³	1 en 10 ⁷

N/D: No determinado

2.1.4 Diferenciación espontánea *in vivo*

Por otro lado, las hESCs deben ser capaces de dar lugar a la formación de teratomas cuando se inyectan en un ratón inmunodeficiente. La necesidad de utilizar un ratón de estas características radica en que si no fuera así, el

ratón produciría rechazo hacia las células introducidas, con la consecuente respuesta inflamatoria (Li *et al.*, 2004). Con esta técnica se demuestra la capacidad de las células a diferenciarse en las tres líneas germinales embrionarias en un modelo *in vivo* (endodermo, mesodermo y ectodermo) (Reubinoff *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2004). Esta capacidad de las hESCs es una de las exigencias descritas en los criterios establecidos por la iniciativa internacional antes comentada (International Stem Cell Initiative, 2007), para aceptar que una línea de hESCs es pluripotente.

2.1.5 Caracterización citogenética

La ausencia de inestabilidad cariotípica es otro de los requisitos buscados en estas líneas si van a ser utilizadas tanto en medicina regenerativa como con fines de investigación básica. En algunas de las líneas con las que actualmente se trabaja a nivel mundial se han observado cambios cromosómicos, algunos de ellos relacionados con fenómenos de oncogénesis (Draper *et al.* 2004; Catalina *et al.* 2008). Estos cambios pueden asociarse al cultivo, o pueden constituir una propiedad intrínseca e inherente de los embriones a partir de los cuales se derivan las hESCs, con independencia del método de cultivo empleado. De hecho se sabe que un 50-60% de los blastocistos presentan anomalías cariotípicas. De esta manera, las observaciones de cambios cromosómicos solamente en hESCs no sólo sugieren precaución cuando se diseñan nuevas condiciones de cultivo, especialmente en las que están libres de células alimentadoras, sino que están incentivando a los investigadores a la realización de múltiples pruebas citogenéticas regularmente para verificar la integridad cromosómica de las hESCs conforme se van consiguiendo más pases en cultivo, así como en la búsqueda de una respuesta a la identificación de las razones de estas anomalías cromosómicas comparando los resultados entre distintos centros de investigación (Catalina *et al.*, 2008). Por esto, es importante controlar la estabilidad genética de las células no sólo mediante la realización de un cariotipo convencional que nos informaría de alteraciones genéticas grandes, como ganancia o pérdida de cromosomas, sino mediante técnicas mucho más precisas como el FISH (siglas inglesas de *Fluorescence in situ hybridation*), que nos informaría de alteraciones específicas, SKY (siglas inglesas de *Spectral*

Karyotyping), que se utiliza para la detección de translocaciones e identificación de cromosomas marcados, CGH (siglas inglesas de *Comparative Genomic Hybridization*), para la determinación de alteraciones numéricas, y SNPs (siglas inglesas de *Single Nucleotide Polymorphism*), para detectar polimorfismos de un solo nucleótido (Catalina *et al.*, 2007) (Figura 19).

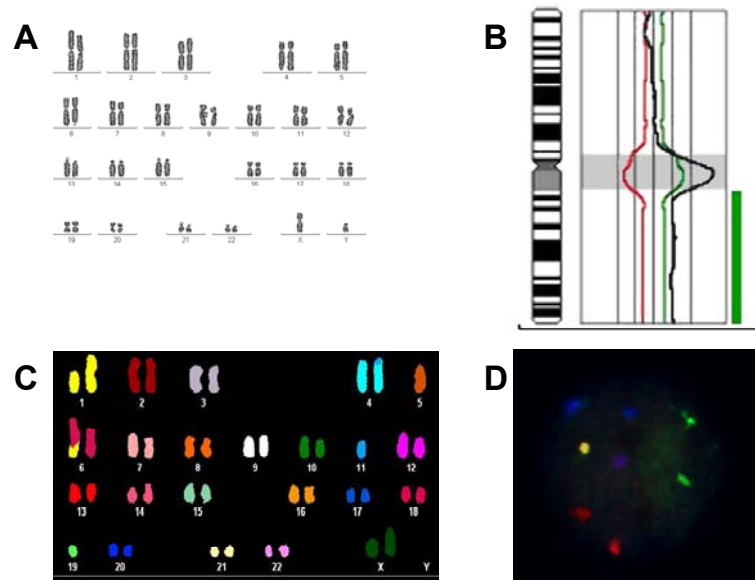


Figura 19: Distintas técnicas de caracterización citogenética (Imágenes tomadas del BACM). A) Imagen representativa de un cariotipo convencional. B) Imagen representativa de un análisis por CGH. C) Imagen representativa de un análisis mediante SKY. D) Imagen representativa de un análisis por FISH.

2.1.6 Manipulación genética de las ESCs

Otra manera de diferenciar las ESCs hacia un linaje específico es a través de la manipulación genética mediante la sobreexpresión o inhibición de determinados genes o factores de transcripción claves para la especificación a líneas específicas. Esta estrategia permitiría, no sólo la obtención de células diferenciadas, sino la creación de modelos de enfermedades con base genética que comienzan ya en estadios prenatales y para las que en la actualidad no existen modelos, como es el caso de determinadas leucemias infantiles. Paralelamente, hay que tener en cuenta que las hESCs con anomalías, aún siendo no viables para aplicaciones terapéuticas, tienen una utilidad como herramienta biológica para estudiar la transformación celular, la etiología y la patogénesis de tumores infantiles, biología del desarrollo, etc (Bueno *et al.*, 2008).

2.1.7 Futuro potencial de la progenie derivada de hESCs en medicina regenerativa

En la actualidad se debe tener claro que el estudio de las hESCs sigue estando en sus comienzos, siendo muy difícil prever estudios terapéuticos con células diferenciadas a partir de hESCs en las próximas 1-2 décadas.

Existen múltiples problemas conocidos que impiden prever qué enfermedades se beneficiarían de un posible uso de tejidos celulares derivados de las hESCs.

En primer lugar, las ESCs forman teratocarcinomas al ser implantadas en estado indiferenciado en animales de laboratorio. Este problema desaparece si se implantan después de su diferenciación total, por lo que cualquier protocolo de transferencia de ESCs deberá incluir una diferenciación en su totalidad hacia el linaje de interés. Es importante resaltar que la existencia de hESCs indiferenciadas promoverá la aparición de teratomas.

Un segundo problema para la aplicación terapéutica de las hESCs reside en la dificultad de obtener células diferenciadas a un linaje celular puro. Cuando se estimula su diferenciación, las hESCs son capaces de originar cualquier tipo celular, pero raramente lo hacen de manera homogénea y reproducible, sino que dan lugar a poblaciones de células en las que se mezclan distintos tipos especializados (Odorico *et al.*, 2001; Wobus *et al.*, 2001). Gracias a experimentos en células en cultivo y a modelos animales, hoy conocemos genes de diferenciación que controlan las vías de diferenciación, como hemos indicado en el apartado anterior. Por ejemplo, existen genes miogénicos que determinan la diferenciación hacia músculo (ej. Myo-D), neurogénicos que inducen la diferenciación hacia neuronas (ej. Sox-1), genes que determinan los distintos tipos celulares pancreáticos (ej. Pax4), etc. La activación controlada de genes de diferenciación en las hESCs podría producir el tipo celular deseado para cada aplicación (Wobus *et al.*, 2001).

El tercer problema sería que las células implantadas podrían sufrir el mismo tipo de rechazo aloinmune que se produce en el transplante de órganos, como se trata en el siguiente apartado (Figura 20).

Cuando este tipo de experimentos sea posible, será necesario comprobar que se trata de células funcionalmente activas, de manera que además de estudios de fenotipado y genotipado, será necesario realizar

estudios de funcionalidad de estas células ya que muchas de ellas pueden mantener cierto grado de inmadurez. Por otro lado, será necesario contar con la seguridad de que no quedan células indiferenciadas que, transferidas a un paciente, pudieran provocar teratomas (tumores germinales). Para esto ya se han realizado experimentos mediante la transfección de genes bajo el control de promotores específicos de hESCs y sensibles a antibióticos, de tal manera que, en presencia de estos, las hESCs desaparecen (Schuldiner *et al.*, 2003). También la separación celular se podría utilizar como una herramienta válida, aunque previamente sería necesario encontrar anticuerpos de membrana celular específicos para el tipo celular que queramos seleccionar.

2.1.8 hESCs: inmunogeneidad vs. inmunotolerancia

Por último, como hemos mencionado anteriormente, otro reto que se nos plantearía antes de la aplicación terapéutica de estas células es cómo evitar el rechazo post-transplante de derivados de hESCs. Aunque las hESCs presentan una baja expresión del complejo de histocompatibilidad clase I (CMH Clase I), éste sí se encuentra moderadamente incrementado en las células diferenciadas a partir de las hESCs, por lo que es posible una respuesta inmune por parte del receptor de las células (Figura 20) (Menendez *et al.* 2005).

Para crear inmunotolerancia, de nuevo se han propuesto varias estrategias. Una de ellas es la transferencia del núcleo de una célula somática del futuro receptor a un ovocito de una donante que tras una reprogramación, dará lugar a un blastocisto y a una nueva línea de hESCs (Stojkovic *et al.*, 2004). Los dos principales inconvenientes son su baja eficiencia: son necesarios muchos ovocitos no siempre fáciles de conseguir para obtener una línea y el genoma mitocondrial del ovocito donante que, aunque escasos, posee antígenos de histocompatibilidad que pueden dar lugar a rechazos. La figura 20 muestra esquemáticamente las posibilidades de alcanzar la inmunotolerancia y disminuir la inmunogeneidad asociada a transplante.

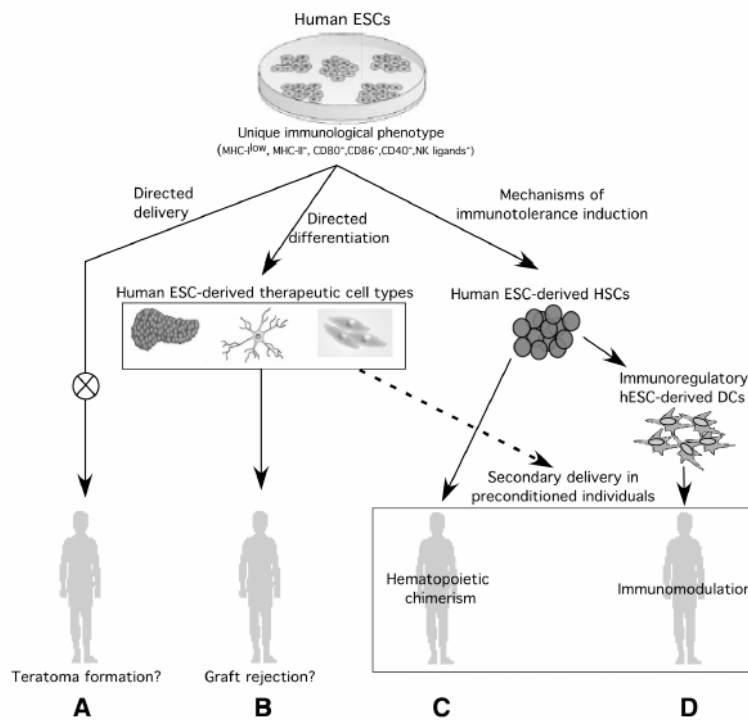


Figura 20: Diagrama esquemático donde se señalan las futuras aplicaciones de las hESCs y su implicación respecto a la inmunotolerancia (Imagen tomada de Menendez et al., 2005). Estudios *in vitro* e *in vivo* limitados a trasplante xenogénico indican que las hESCs poseen propiedades inmunológicas únicas. A) En el campo alogénico, el trasplante directo de hESCs indiferenciadas podría producir teratomas. B) Esto implica que las hESCs podrían ser diferenciadas a células específicas como por ejemplo neuronas dopaminérgicas o células β -pancreáticas con un enfoque terapéutico. Sin embargo, si este tipo de trasplante podría ser rechazado por el receptor es aún desconocido. Teniendo en cuenta el reconocimiento inmune por parte del receptor, la pregunta es si las hESCs y su progenie pueden ser usadas como vectores potenciales para la inducción de la tolerancia, lo cual necesita de una investigación muy activa. C) La inducción de la tolerancia inmune puede ser conseguida gracias al establecimiento de quimerismos hematopoyéticos D) También puede ser posible gracias a la modulación de la respuesta inmune del receptor. Combinando tanto la estrategia terapéutica como la moduladora.

3. FUTURAS APLICACIONES DE LAS hESCs EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

3.1 Expectativas reales en la investigación con hESCs

Mientras se debate social y gubernamentalmente sobre la pertinencia y las connotaciones ético-morales de la investigación con hESCs se están produciendo hechos paralelos. Los más importantes son los grandes avances conseguidos con otro tipo de células que, aunque nunca adquirirán la llamada plasticidad de las ESCs, son capaces, bajo ciertas condiciones específicas, de generar también tejidos de diferentes características. Nos referimos a las ASCs. Dentro de las ASCs, las MSCs, y las células madre hematopoyéticas (HSC, siglas inglesas de *hematopoietic stem cells*) son las que en la actualidad presentan aplicabilidad clínica. Este potencial se debe a tres propiedades clave: i) su capacidad para diferenciarse a distintos tipos celulares maduros y funcionales dentro de ese linaje celular; ii) sus propiedades inmunomoduladoras y; iii) su capacidad de secretar factores solubles los cuales regulan funciones biológicas cruciales tales como la proliferación y diferenciación sobre un amplio espectro de células diana (Siena et al. 2000; Menendez et al. 2002).

Sin embargo, con las hESCs, a pesar de los importantes avances realizados, todavía hacen falta muchos años de investigación para desvelar todos los interrogantes que tras estas células se esconden, antes de controlar todo el potencial científico-clínico existente. Entre otras cuestiones, hay que tener en cuenta que, por su capacidad de proliferación, tanto *in vivo* como *in vitro*, las ESCs se asemejan en muchos aspectos a células tumorales, lo que nos inclina a ser muy cautos con su utilización. También urge conocer el grado de adaptación al cultivo y consiguiente proceso de evolución clonal asociado a estas células.

Las hESCs constituyen, hoy en día, una herramienta de interés en la investigación biomédica actual. Han proporcionado a los investigadores un modelo especialmente interesante para estudiar como se desarrollan ciertos procesos biológicos básicos y les han dotado de una herramienta versátil, con la que abordar aspectos etiológicos y la patogénesis de origen prenatal.

3.2 Bancos de ESCs

La creación de bancos de ESCs está ayudando al desarrollo y estandarización de protocolos para el cultivo y caracterización de las células madre. Esta estandarización propuesta por la Comunidad Investigadora Internacional está permitiendo que los Bancos de ESCs distribuyan las células junto con los protocolos de actuación entre los distintos grupos de investigación, tanto para una futura aplicación clínica como para su uso en investigación básica. Además, estos centros están capacitados para la derivación, caracterización y posterior distribución de sus propias líneas. En estos bancos, las líneas se caracterizarían siguiendo los criterios de la iniciativa internacional anteriormente mencionada (Internacional Stem Cell Initiative, 2007), controlando la contaminación microbiana de células y medios y siguiendo unos estrictos criterios de calidad de acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio vigentes a nivel internacional (Nieto et al., 2006).

4. MARCO LEGISLATIVO Y ASPECTOS ÉTICOS DE LA INVESTIGACIÓN CON hESCs

4.1 Controversia ética y social de la investigación con hESCs

Mientras que las ASCs humanas no generan ningún tipo de problema ético-moral, son las hESCs las que llevan inherentes este tipo de controversias, ya que el aislamiento de la ICM de los blastocistos supone la destrucción de los mismos. Por todo ello, es necesario un gran control legislativo, tanto a nivel nacional como europeo, que regule la obtención de este tipo de células y su futura aplicación en salud.

4.2 Legislación actual en España

En España, actualmente, la Ley 14/2006, sobre técnicas de reproducción asistida, el Real Decreto 1301/2006, sobre células y tejidos humanos, y la Ley 14/2007, de investigación biomédica, constituyen la norma fundamental del ordenamiento jurídico en este ámbito de la asistencia y la investigación.

Del Instituto de Salud Carlos III depende la Comisión de Seguimiento y Control de donación y utilización de células y tejidos humanos. En particular, le corresponde la emisión del informe relativo a los proyectos de investigación relacionados con la obtención, desarrollo y utilización de hESCs.

Según estas leyes, se determina que el número de ovocitos a inseminar estará sometido a criterio clínico con la posibilidad de congelar los embriones sobrantes. Además se publican 4 posibilidades para la búsqueda de un destino final a los embriones crioconservados independientemente de los años de congelación.

- Crioconservación hasta su uso por parte de la pareja.
- Donación a otras parejas con fines reproductivos.
- Donación a la investigación, dentro de los límites establecidos.
- Descongelación sin ningún fin.

El artículo 15 de la Ley 14/2006, así como el artículo 32 de la Ley 14/2007, son los encargados de legislar la utilización de embriones con fines de investigación. Los requisitos son los siguientes:

- 1) Consentimiento informado escrito de la pareja o, en su caso, de la mujer. Donación anónima, confidencial, voluntaria, altruista y

revocable. Rechazan derecho económico, patrimonial o potestativo sobre los resultados obtenidos (Figuras 21, 22).

- 2) Embrión no desarrollado *in vitro* más allá de 14 días.
- 3) Investigación realizada en centros autorizados.
- 4) Que se realicen con base a un proyecto debidamente presentado y autorizado por las autoridades sanitarias competentes.
- 5) Especificar relaciones de interés entre centros.

Según esta Ley queda prohibida la utilización de embriones sobrantes frescos para poder utilizarlos en investigación.

A nivel autonómico, el Parlamento Andaluz aprobó la Ley 7/2003, del 20 de octubre, por la que se regula la investigación con embriones humanos no viables para la fecundación *in vitro*, y que aportaba propuestas de investigación que la reforma de la ley sobre técnicas de reproducción asistida iba a prohibir.

4.2.1 Ley 14/2007 de Investigación Biomédica

La investigación biomédica es un instrumento clave para mejorar la calidad y la expectativa de vida de los ciudadanos y sirve para aumentar su bienestar, que ha cambiado de manera sustancial, tanto metodológica como conceptualmente en los últimos años. La aparición de nuevas herramientas analíticas ha llevado a grandes descubrimientos que permiten albergar fundadas esperanzas sobre el tratamiento e incluso la curación en un futuro no muy lejano de patologías hasta ahora inabordables (Ley de Investigación Biomédica, 2007).

Los nuevos avances científicos cuestionaban la organización en la que hasta ahora se había basado la investigación biomédica, con lo que se hacía necesaria la publicación de esta nueva ley. La Ley se construye sobre los principios de la integridad de las personas y la protección de la dignidad del ser humano en cualquier investigación biomédica que implique intervenciones sobre seres humanos, así como en la realización de análisis genéticos, el tratamiento de datos genéticos de carácter personal y de las muestras biológicas y de las muestras biológicas de origen humano que se utilicen en investigación. Además, la Ley facilita la implantación de la investigación en los centros de salud como una práctica cotidiana, se incentiva la colaboración

entre los centros de investigación biomédica básica y los hospitales y demás centros públicos, y se estimulan los vínculos entre el sector público y el privado mediante la investigación en red y la movilidad de los investigadores y los facultativos.

En relación con el objeto y ámbito de la norma, se matiza que la investigación biomédica a la que se refiere esta Ley abarca la investigación básica y la clínica con exclusión de los ensayos clínicos con medicamentos y el implante de órganos, tejidos y células, que se rigen con otras normas específicas.

La Ley prohíbe explícitamente la constitución de embriones humanos exclusivamente con fines de experimentación, pero permite la utilización de cualquier técnica de obtención de hESCs con fines terapéuticos o de investigación que no comporte la creación de un nuevo ser humano.

De esta manera, la Ley de Investigación Biomédica tiene por objeto regular: i) las investigaciones relacionadas con la salud humana que impliquen procedimientos invasivos, ii) la donación y utilización de ovocitos, embriones, embriones y fetos humanos o de sus células, tejidos u órganos con fines de investigación biomédica y sus posibles aplicaciones clínicas, iii) el tratamiento de muestras biológicas con fines de diagnóstico médico o de investigación biomédica, iv) el almacenamiento y movimiento de muestras biológicas, v) los biobancos, vi) el Comité de Bioética de España y los demás órganos con competencias en materia de investigación biomédica y vii) los mecanismos de fomento y promoción, planificación, evaluación y coordinación de la investigación biomédica. La normativa además permite las técnicas de transferencia nuclear sólo con fines terapéuticos y prohíbe expresamente la creación de embriones destinados a la investigación.

4.2.2 Permisividad actual de España a la hora de investigar con hESCs

La prohibición de crear embriones destinados únicamente a investigación engloba a España en el grupo de países donde está permitido investigar con embriones sobrantes de ciclos de FIV para derivar hESC (Canadá, Holanda, Australia, Suecia), lejos del grupo de países donde está prohibido utilizar embriones para investigación con hESC (Irlanda, Austria, Noruega), aunque un peldaño por debajo del grupo de países donde se pueden

generar embriones con fines únicos de investigación (Reino Unido, Bélgica, Israel y Singapur). Estos embriones llevan en muchas ocasiones más de 5 años congelados sin que la pareja, o mujer en su caso, los hayan reclamado.

4.3 La legislación actual en Europa

A nivel Europeo, se ha publicado la Directiva 2004/23/CE, de 31 de marzo, relativa al establecimiento de normas de calidad y de seguridad para la donación, la obtención, la evaluación, el procesamiento, la preservación, el almacenamiento y la distribución de células y tejidos humanos. Esta Directiva se creó con la intención de unificar la diversidad de estándares presentes en los distintos países de la Unión Europea respecto a la importación/exportación de células y tejidos, la necesidad de incrementar la disponibilidad de células y tejidos donados y la efectividad de usarlos, así como eliminar los errores creados con unos sistemas de codificación y clasificación distintos entre centros y países europeos. En esta Directiva se engloban la mayoría de los tejidos y células humanas, las células reproductoras, tejidos fetales, así como las hASCs y hESCs. En los primeros borradores de la Directiva se proponían unos requisitos de calidad importantes, sobre todo con respecto a la calidad del aire tipo A de las salas donde se iban a manipular estos tejidos y células (salas GMP, siglas inglesas de *Good Manufacturing Practice*).

Debido a este punto, esta Directiva ha sido criticada por expertos en reproducción que declaran que las unidades de FIV no necesitan de tantas exigencias para poder realizar su trabajo, aunque de alguna manera no deja de ser una crítica pragmática, ya que parece encaminada a razones financieras y políticas (Mortimer, 2005). Si las clínicas de FIV tuvieran que ceñirse a tales exigencias, la inversión necesaria para adecuar los laboratorios a la nueva Directiva sería insostenible en la mayoría de los casos, llevando a la clínica al cese de sus actividades o encareciendo exhaustivamente los ciclos de FIV. Debido a estas críticas, la Unión Europea ha publicado la Directiva 2006/17/CE de la Comisión, de 8 de febrero de 2006, por la que se aplica la Directiva 2004/23/CE del Parlamento Europeo y del Consejo en lo relativo a determinados requisitos técnicos para la donación, la obtención y la evaluación de células y tejidos humanos. En esta Directiva se matiza sobre la distinción entre laboratorios de reproducción asistida y laboratorios donde se derivan

hESCs a partir de embriones humanos, siendo las propuestas menos exigentes con los primeros en lo referente a la calidad del aire.

Conjuntamente con la legislación europea, existen iniciativas europeas importantes, financiadas parcialmente por el 7º Programa MARCO de la Comisión Europea, donde se busca dar transparencia a las hESCs respecto a las condiciones de almacenamiento y caracterización (*hESC Registry, Internacional Stem Cell Initiative, Stem Cell Banking Initiative*).

ANEXO**CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA DONACIÓN DE PREEMBRIONES HUMANOS CRIOCONSERVADOS A PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN**

D. _____ con DNI/ NIF _____ de _____ años de edad
 y D^a. _____ con DNI/ NIF _____ de _____ años de
 edad, con domicilio en _____ Localidad _____
 Municipio _____ Provincia de _____

EN PRESENCIA DE

D/ D^a. _____ con DNI/ NIF _____ como facultativo responsable
 y en calidad de representante de la Unidad/ Centro de Reproducción Asistida _____
 _____ con CIF _____ y Número de Autorización/ Inscripción en el
 Registro Oficial _____ Provincia de _____

DECLARAN/ DECLARA

- 1º.- Con fecha _____ se realizó el tratamiento de fecundación in vitro, dando lugar a la crioconservación de _____ preembriones.
- 2º.- Con fecha _____ autorizamos/ autorizó la donación de dichos preembriones a otras parejas o mujer en su caso.
- 3º.- Que hemos sido informados/ he sido informada fehacientemente por el facultativo arriba indicado, de los objetivos que se persiguen con la investigación y de sus implicaciones, y específicamente sobre los aspectos que se relacionan a continuación:
- a) Que conforme a lo previsto en la Disposición final primera de la Ley 45/ 2003, de 21 de noviembre, podemos/ puedo ejercitar otras opciones.
- b) Que la donación es de carácter voluntaria, altruista y desinteresada y que la finalidad de la investigación será mejorar la salud y la calidad de vida de las personas.
- c) Que este consentimiento puede ser modificado y revocado en cualquier momento.

AUTORIZACIÓN, LUGAR, FECHA Y FIRMA

Los/ La abajo firmantes/ firmante:

- 1º.- Autorizamos/ autorizo la donación de dichos preembriones con fines de investigación, siempre que ésta se realice de acuerdo con la normativa.
- 2º.- Renunciamos/ renuncio a cualquier derecho de naturaleza económica, patrimonial o potestativa sobre los resultados que pudieran derivarse de manera directa o indirecta de las investigaciones que se lleven a cabo.

En _____ a _____ de _____ de _____

EL/ LA FACULTATIVO RESPONSABLE

LOS PROGENITORES/ LA PROGENITORA

Fdo.: _____

Fdo.: _____

Fdo.: _____

Figura 21: Modelo de Consentimiento Informado propuesto por la Junta de Andalucía.

Consentimiento de los Progenitores para la Utilización de Preembriones con Fines de Investigación

Los abajo firmantes progenitores de (1) preembriones conservados en (2) **MANIFESTAMOS** libremente nuestra opción por la iniciativa marcada X:

- 1. Mantener la criopreservación de los preembriones.
- 2. Donar los preembriones a otras parejas que lo soliciten sin ánimo de lucro y con fines de reproducción.
- 3. Ceder los preembriones para que las estructuras biológicas obtenidas en el momento de la descongelación puedan ser utilizadas en la investigación que abajo se indica (*) y bajo las condiciones que se reseña (**), sin que en ningún caso se proceda a la reanimación o a su descongelación sin otros fines.

(*) Investigación a realizar con los preembriones descongelados dentro del Proyecto de Investigación “.”

OPTIMIZACION DE CONDICIONES DE CULTIVO SIN “FEEDERS” PARA LINEAS DE CELULAS MADRE EMBRIONARIAS HUMANAS (CMEH) IMPORTADAS O DERIVADAS A PARTIR DE EMBRIONES DONADOS EN FASE DE PRE-IMPLANTACION: DIFERENCIACION DE CMEH HACIA LINEA HEMATOPOYETICA MEDIANTE LA EXPRESION DE HOXA9 Y/O COCULTIVO CON CELULAS MADRE MESENQUIMALES DE CORDON UMBILICAL.

(**) Con la firma de este compromiso se renuncia a cualquier derecho de naturaleza económica, patrimonial o potestativa sobre los resultados que pudieran derivarse de manera directa o indirecta de las investigaciones que se lleven a cabo.

En _____ a _____ de _____ de 200

Fdo.: Doña
DNI:

Fdo.: Don
DNI:

- (1) Indicar el número de embriones donados
- (2) Indicar la Institución donde están congelados los preembriones

Figura 22: Modelo de Consentimiento Informado propuesto por el Instituto de Salud Carlos III

CAPÍTULO II
JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS
DEL ESTUDIO REALIZADO

El descubrimiento de las hESCs ha abierto nuevas expectativas como herramienta para estudiar mecanismos celulares y moleculares que subyacen la biología del desarrollo humano. Además, las hESCs han abierto una puerta de esperanza para programas futuros de medicina regenerativa y terapia celular. A tal efecto, muchos centros de investigación han comenzado proyectos de derivación, caracterización y diferenciación de hESCs.

Para poder realizar este tipo de investigación es necesario ceñirse a la legislación vigente. En la mayoría de las guías publicadas por las principales Asociaciones Internacionales expertas en manipulación de embriones no están reflejadas las características que deben cumplir los laboratorios en cuanto a condiciones de calidad y bioseguridad para la manipulación de dichos embriones. Del mismo modo, se hace necesario analizar y aclarar los aspectos éticos y legislativos que pueden derivar de esta situación, en especial en procesos de captación de embriones humanos congelados para investigación.

La tasa de éxito en la derivación de hESCs es extremadamente baja, sobre todo cuando la fuente de material biológico son embriones sobrantes de ciclos de FIV congelados a -196° C. Este hecho, así como las restricciones legales que existen en muchos países, hacen que una optimización en los métodos de derivación de hESCs sea necesaria. La optimización de nuevas tecnologías debe ser trabajada antes en modelos animales que en humanos, debido a que existe el riesgo de perder tan preciado material biológico.

Por todo lo anterior en esta tesis planteamos las siguientes hipótesis de partida:

- 1) El prestigioso estudio realizado por SART-RAND en Estados Unidos ha mostrado que sólo un 2.8% de las parejas sometidas a un ciclo FIV y que acumulan embriones sobrantes congelados están dispuestos a donarlos, previo consentimiento informado y conocimiento del estudio biológico a realizar, para investigación. Sin embargo, en la actualidad, se desconoce la predisposición de las parejas de nuestro entorno a la donación de embriones sobrantes congelados para investigación/derivación de hESCs. Pensamos que la presencia de un embriólogo experto en medicina reproductiva puede jugar un papel clave en la captación ética de embriones, así como en la definición de

diferencias éticas y legislativas entre las propias clínicas FIV y los centros de investigación básica con embriones/hESCs.

- 2) La tecnología láser en combinación con el cultivo directo de blastocistos podría ser de gran utilidad para la derivación de ESCs, debido a su mejor facilidad de manejo respecto al uso de una pipeta de micromanipulación a la hora de aislar la ICM, además de evitarse el uso de componentes xenobióticos durante el proceso.
- 3) Las MSCs usadas como feeders podrían aumentar la eficacia de derivación de hESCs, a partir de embriones congelados de mala calidad, debido a su papel de soporte celular (parénquima) en múltiples tejidos adultos y embrionarios. En este apartado, también nos planteamos que al igual que el uso de iROCK facilita la supervivencia y la clonogeneidad de clones individuales de hESCs, quizás el uso de dicho iROCK aumentaría la supervivencia post-descongelación de embriones en estadio de 2 o más células.

CAPÍTULO III
OBJETIVOS DEL ESTUDIO
REALIZADO

OBJETIVO PRINCIPAL:

Analizar y profundizar en los aspectos éticos y legales que llevan inherentes las hESCs, valorando la predisposición de parejas que poseen embriones congelados sobrantes de ciclos de FIV a donarlos para investigación, y optimizar una nueva metodología para mejorar la eficiencia de derivación de hESCs utilizando la tecnología de disparo con láser, así como derivar y mantener hESCs sobre MSCs utilizando para el proceso de derivación un iROCK.

OBJETIVOS DETALLADOS:

1. Justificar la presencia de un laboratorio de embriología totalmente equipado y de un embriólogo con amplios conocimientos en procesos de FIV, manipulación de gametos y embriones congelados en clínicas de FIV, y con un amplio conocimiento de la legislación vigente en el organigrama de un banco de ESCs.
2. Analizar la predisposición de parejas andaluzas hacia la donación de sus embriones congelados en clínicas FIV, para investigación con células madre. Este estudio se realiza mediante un análisis pormenorizado de las entrevistas realizadas a las parejas pertenecientes a dos hospitales públicos de Andalucía, y la comparación con los resultados obtenidos en Estados Unidos.
3. Plantear las controversias legislativas encontradas en la barrera entre la medicina reproductiva y la investigación con hESCs. Además, plantear una regulación basada en el objetivo final del uso de material biológico de origen embrionario: investigación básica, investigación clínica en terapia celular o medicina reproductiva.
4. Optimizar una nueva estrategia de derivación de ESCs basada en la combinación de cultivo directo de los blastocistos sobre una superficie de crecimiento seguida de la destrucción del trofoectodermo mediante

tecnología láser utilizando la metodología previamente en un modelo murino, para posteriormente intentar aplicarla en embriones humanos.

5. Comparar las tasa de derivación de hESCs sobre HFs y MSCs utilizando embriones congelados de mala calidad, intentando mejorar además la tasa de evolución del embrión en fase de 2-8 células a blastocisto, mediante el empleo de un iROCK.

CAPÍTULO IV
MATERIAL, MÉTODOS Y
RESULTADOS

La descripción pormenorizada de los materiales y métodos empleados, así como los resultados obtenidos, se encuentran reflejadas en los artículos científicos originales publicados en revistas internacionales indexadas (*peer-review*) en relación con cada uno de los objetivos planteados y que han sido incluidos en esta sección. Cada una de estas publicaciones científicas va precedida por un breve resumen en castellano que pretende facilitar una revisión rápida de la información más relevante contenida en los mismos. Las publicaciones científicas fruto de este trabajo incluyen:

1.- Role of the embryology laboratory in the human embryonic stem cell line derivation process.

JL Cortes, F Cobo, AH Barnie, P Catalina, C Cabrera, A Nieto, R Montes, A Concha.

Cytotechnology, 2006. 52:1-11

2.- Spanish Stem Cell Bank interviews examine the interest of couples in donating surplus human IVF embryos for stem cell research.

JL Cortes, G Antiñolo, L Martínez, F Cobo, A Barnie, A Zapata, P Menendez.

Cell Stem Cell, 2007. 1:17-20

3.- Reproductive medicine embryologists meets hESC research: need to adjust the regulatory framework to actual expectations about hESC research and its potential detrimental consequences.

JL Cortes, P Menendez.

Fertility & Sterility. 2008 (doi:10.1016/j.fertnstert.2008.05.041)

4.- Evaluation of the laser technique method to isolate the inner cell mass of murine blastocysts.

JL Cortes, F Cobo, P Catalina, A Nieto, C Cabrera, R Montes, A Concha, P Menendez.

Biotechnology & Applied Biochemistry, 2007. 46:205-209

5.- Whole-blastocyst culture followed by laser drilling technology enhances the efficiency of ICM isolation and ESC derivation from good and poor-quality mouse embryos: new insights in the derivation of hESC lines.

JL Cortes, L Sanchez, P Catalina, F Cobo, C Bueno, A Martínez-Ramírez, A Barroso, C Cabrera, G Ligeró, R Montes, R Rubio, A Nieto, P Menéndez.

Stem Cells and Development, 2008. 17:255-267

6.- Criterios de Valoración Morfológicos de Oocitos, Embriones tempranos y Blastocistos Humanos propuestos por ASEBIR: aplicabilidad en embriones crioconservados donados para investigación con células madre.

JL Cortes, G Ligeró, L Sanchez, A Nieto, C Bueno, R Montes, P Menéndez.

Revista de la Asociación para el Estudio de la Biología de Reproducción (ASEBIR), Junio 2008. Vol. 14, nº 1, p 6-13

7.- Mesenchymal stem cells facilitate the derivation of human embryonic stem cells from cryopreserved poor-quality embryos.

JL Cortes, L Sánchez, G Ligeró, I Gutierrez-Aranda, P Catalina, C Elosua, P Leone, R Montes, C Bueno, V Ramos-Mejia, I Maleno, JL García-Pérez, P Menéndez.

Human Reproduction (Submitted)

IV.1.- Role of the embryology laboratory in the human embryonic stem cell line derivation process. JL Cortes, F Cobo, AH Barnie, P Catalina, C Cabrera, A Nieto, R Montes, A Concha. *Cytotechnology*, 2006. 52:1-11

INTRODUCCIÓN: Con el descubrimiento de las hESCs y su posible aplicación en programas de terapia celular e investigación básica, muchos centros de investigación han comenzado proyectos utilizando este tipo de células. Los bancos de células madre tienen entre sus funciones la derivación de hESCs. Además, la recuperación de embriones crioconservados, su cultivo y la subsiguiente derivación de hESCs requiere un adecuado laboratorio de embriología y personal cualificado para desarrollar esta labor. Muchas Asociaciones Internacionales han publicado guías dirigidas a laboratorios donde se manipulan embriones atendiendo al espacio físico, el personal y el equipamiento necesario en esta clase de laboratorios. Sin embargo, y tras un exhaustivo análisis de estas guías, hemos podido observar que no distinguen entre laboratorios donde se realizan técnicas de reproducción asistida y otros laboratorios que obtienen hESCs para investigación básica o terapia celular, siendo indispensable hacer una distinción, debido a que tanto las técnicas empleadas como los objetivos son diferentes. Además de estas guías hay que tener en cuenta la legislación vigente, centrándonos en las leyes que publica el Parlamento Europeo, concretamente con la Directiva 23/2004/CE.

OBJETIVO: En este trabajo hemos realizado un análisis comparativo de los aspectos comunes establecidos por las diferentes guías internacionales que hemos evaluado. Hemos examinado los aspectos que pueden ser aplicables a las áreas de embriología que están dentro de los bancos de células madre intentando que puedan servir como ejemplo de código de buenas prácticas para la comunidad científica que trabaja en la derivación de hESCs a partir de embriones sobrantes de ciclos de FIV.

MATERIAL Y MÉTODOS: Para llevar a cabo este estudio analizamos las guías propuestas por las siguientes Asociaciones Internacionales: ESHRE 2000; CAP 2002; FSA 2002; ACE 2003; ASRM 2004; NAMSÍ 2005; NAP 2005. La mayoría

de las guías estudiadas, excepto NAP 2005, pertenecen a Asociaciones dedicadas a reproducción asistida. Por otra parte, hemos evaluado la directiva Europea 23/2004/CE, de establecimiento de normas de calidad y de seguridad para la donación, la obtención, la evaluación, el procesamiento, la preservación, el almacenamiento y la distribución de células y tejidos humanos. Los aspectos analizados en cada guía han sido los siguientes: i) Organización del laboratorio y definición de servicios, ii) Cualificación del personal del laboratorio embriología, iii) Espacio físico del laboratorio de embriología y diseño, iv) Equipamiento y protocolos, v) Seguridad del laboratorio y control de infección, vi) Control de calidad, y vii) Legislación y aspectos éticos.

RESULTADOS: Tras evaluar todas las guías respecto a los puntos indicados anteriormente, se observa que varios de los aspectos analizados son comunes tanto para un laboratorio de embriología dedicado a FIV, como para el laboratorio de embriología dedicado a la derivación de hESCs. Sin embargo, hemos observado otros aspectos específicos de cada tipo de laboratorio.

Respecto a la organización del laboratorio y definición de servicios es importante que el laboratorio de embriología esté contemplado en los criterios de organización de un banco de células madre, así como su interacción con el resto de áreas, tales como cultivo celular, biología molecular, citometría de flujo, microbiología y control ambiental, citogenética y trazabilidad, entre otras.

El laboratorio de embriología debe estar formado por personal encargado de la trazabilidad y sistema de calidad, y un embriólogo que realiza la derivación de hESCs.

Respecto al espacio físico estamos de acuerdo en que el laboratorio de embriología debe ser un área restringida con catalogación de sala GMP únicamente si va a ser utilizada para posible terapia celular. Dado que el campo de las hESCs está en su infancia, las investigaciones básicas sobre desarrollo, mecanismos celulares y moleculares que regulan la pluripotencia, etc., pueden realizarse en una zona aséptica sin necesidad de salas GMP. Todo el equipamiento debe asegurar la reducción del riesgo de contaminación del material biológico, con sistema de alarma y monitorización de cada equipo, la existencia de un sistema de provisión de energía, así como la necesidad de tener protocolos actualizados de todas las técnicas. Debe existir seguridad en

el laboratorio y un estricto control de infecciones, que van desde la vacunación del personal contra la hepatitis B hasta las medidas de contención secundaria (ropa adecuada, guantes libres de polvo, mascarillas, etc). También es necesario que el laboratorio y resto del centro de investigación esté acreditado respecto a control de calidad interno y externo.

CONCLUSIONES: La figura de un embriólogo con conocimientos de reproducción asistida y manipulación de gametos y embriones humanos, así como de un laboratorio de embriología es aconsejable para derivar hESCs. El laboratorio de embriología tiene que estar en una estructura organizativa dinámica respecto a la aplicación de programas de calidad y bioseguridad para obtener hESCs que permitan una trazabilidad posterior de los embriones usados.

Role of the embryology laboratory in the human embryonic stem cell line derivation process

José Luis Cortés · Fernando Cobo · Angela Helen Barnie ·
Purificación Catalina · Carmen Cabrera · Ana Nieto · Rosa Montes ·
Ángel Concha

Received: 21 July 2006 / Accepted: 10 October 2006 / Published online: 25 November 2006
© Springer Science+Business Media B.V. 2006

Abstract With the introduction of regenerative medicine and cell therapy programmes by means of human embryonic stem cells (hESC), several research centres have begun projects of derivation of hESC lines. In some stem cell banks, such as the Andalusian Stem Cell Bank, the law also permits the creation of these cell lines. Therefore, the recovery of cryopreserved embryos, their culture and the subsequent derivation to hESC lines requires a suitable embryology laboratory and specialized and highly qualified staff. Moreover, new techniques, from therapeutic nuclear transfer, need this type of laboratory and staff, too. Several International Associations have drawn up some guidelines for laboratories where embryos are manipulated and they reflect the physical space, the staff and the equipment needed in these kinds of laboratories. Nevertheless, we can see that these guidelines do not distinguish between IVF laboratories and other laboratories that obtain hESC lines, so it would be convenient to make a distinction. Following these guidelines, we have tried to draw up

concurrent aspects applicable to areas of embryology within stem cell banks. So, the design and the specific implementation programmes for these areas and other research centres with this area but which do not use IVF techniques is vital to develop embryonic cell lines in optimum conditions for future therapeutic applications, although maybe it is rather premature to standardize this type of research.

Keywords Cleanrooms · Embryology laboratory · Embryonic stem cell lines · International guidelines · IVF · Stem cell bank

Introduction

The transplant of cells of human origin is a sector of medicine, which shows increasing opportunities for the treatment of diseases, some of which until now have been incurable. Thus, with the introduction of regenerative medicine and cell therapy programmes using human stem cells, a great number of research centres have attempted the derivation of cell lines through the use of human embryonic stem cells (hESCs) (Reubinoff et al. 2000). Stem cell banks are the establishments entrusted with assuring the quality, traceability and safety of stem cell lines. This should be achieved with close attention to the standardisation of processes and the implementation of quality control

J. L. Cortés (✉) · F. Cobo · A. H. Barnie ·
P. Catalina · C. Cabrera · A. Nieto · R. Montes ·
Á. Concha
Andalusian Stem Cell Bank (Spanish Central Node),
Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Avda
Fuerzas Armadas, 2, 18014 Granada, Spain
e-mail: josel.cortes.sspa@juntadeandalucia.es

programmes and methods, which reflect the best current practices. Furthermore, in some stem cell banks, such as ours, the law also permits the creation of these cell lines (Spanish Law 14/2006 2006). Therefore, the recovery of cryopreserved embryos, their culture and the subsequent derivation to hESC lines (Cowan et al. 2004), requires a suitable embryology laboratory or area, as well as specialized and highly qualified staff. Furthermore, the derivation of patient-specific hESC lines only for therapeutic clinics, using the nuclear transfer technique, should need this type of laboratory and a specifically dedicated team. In this context, the processes and procedures used to obtain hESC lines, must adhere to a series of safety rules and must follow strict work protocols (International Standard Organization 1999; Department of Health 2001; American Association of Tissue Banks 2002).

Several International Associations have drawn up some guidelines for laboratories where embryos are manipulated, reflecting the physical space, the staff and the equipment needed in these kinds of laboratories. Nevertheless, after the thorough analysis of these guidelines, we can observe that they do not distinguish between “in vitro” fertilization (IVF) laboratories and other embryology laboratories that obtain hESC lines using research proposals or cell therapy, so, it would be convenient to make a distinction, since some of the techniques used are different, as are the objectives. In this review, a comparative analysis of the common contents established by different guidelines has been carried out. Following these guidelines, we have tried to draw up both concurrent aspects which are applicable to areas of embryology within stem cell banks in the hope that it might serve as an example of good practice guidelines for the research community in these establishments in order to obtain cell lines using cryopreserved and cloned human embryos. There are some countries (United Kingdom, Singapore, etc.), where the use of fresh embryos in research is validated, entails embryos to be cultured to the blastocyst stage in a routine embryology laboratory and then handed over to the stem cell unit. Even, stem cell research centres of these countries would need an embry-

ology laboratory to derive cloned embryos, which will follow certain guidelines.

Guidelines and guidances used

To carry out this study we have analysed the guidelines suggested by the following International Associations (Table 1): ESHRE 2000; CAP 2002; FSA 2002; ACE 2003; ASRM 2004; NAMS I 2005; NAP 2005.

The majority of guidelines studied, except NAP, 2005, which assess all the aspects of the embryology laboratories, belong to associations dedicated to human assisted reproduction.

There are other guidelines related to hESCs, such as those of the National Institute of Health (NIH 2002), and the Indian Council of Medical Research (ICMR-DBT 2006), but they have been excluded from this assessment, because they do not include basic aspects that deal with embryology.

On the other hand, we have assessed the European Union Tissue and Cell Directive (2004/23/CE, 31st March) (European Union 2004), which establishes setting standards of quality and safety for the donation, procurement, testing, processing, preservation, storage, and distribution of human tissues and cells in the European Union countries.

Aspects assessed in the study and methodology

The majority of the guidelines studied (ESHRE 2000; CAP 2002; FSA 2002; ACE 2003; ASRM 2004; NAMS I 2005), except NAP 2005, show a similar approach in the treatment of the different sections analysed. For this study, the common and discordant aspects of the different guidelines have been assessed, but only concerning the aspects related to the area of embryology.

The aspects analysed, which we consider to be important, are the following (Table 2):

1. Organization of the laboratory and definition of services.
2. Laboratory staff of an area of embryology.
3. Laboratory space and design.
4. Equipment and procedure manuals.
5. Laboratory safety and infection control.

Table 1 Guidelines reviewed in this study

Research association	Abbreviation	Guideline	Web page
<i>Assisted reproduction techniques</i>			
European Society of Human Reproduction and Embryology	ESHRE	Guidelines for good practice in IVF laboratories, 2000	www.eshre.com
College of American Pathologist	CAP	Laboratory Improvement, 2002	www.cap.org
The Fertility Society of Australia	FSA	Reproductive Technology Accreditation Committee (RTAC). Code of practice for centres using assisted reproductive technology, 2002	www.fsa.au.com/rtac/
National Academy of Medical Sciences of India	NAMSI	National Guidelines for accreditation, supervision and regulation of ART clinics in India, 2005	www.icmr.nic.in
Association of Clinical Embryologists	ACE	Accreditation Standards and Guidelines for IVF Laboratories, 2003	http://ace.ivf.net/ace/
American Society for Reproductive Medicine	ASRM	Reviewed guidelines for human embryology and andrology laboratories, 2004	www.asrm.org
<i>Stem cell research</i>			
National Institute of Health	NIH	Guidance for investigators and institutional review boards regarding research involving human embryonic stem cells, germ cells, and stem cell-derived test articles, 2002	www.nap.edu/books
National Academies Press	NAP	Guidelines for Human Stem Cell Research, 2005	www.nap.edu/books
Indian Council of Medical Research	ICMR-DBT	Guidelines for Stem Cell Research and Therapy, 2006	www.icmr.nic.in

6. Quality control.

7. Legislative and ethical aspects.

It is obvious that some of the aspects analysed are common to both embryology laboratories dedicated to IVF, and those dedicated to deriving hESC lines. However, there are others, which are specific to each type of laboratory.

We have made a comparative assessment of the above mentioned aspects, showing similarities and differences, as others have done (Cohen et al. 2004). Also, we have made some recommendations for the embryology laboratories that derive hESC lines in each section.

Finally, we have assessed separately the new European Directive, analysing the impact of its application in a stem cell bank, which derives hESC lines.

Organization of the laboratory and definition of services

None of the guidelines reviewed make reference to the organization of these types of laboratories.

Perhaps, the ASRM 2004 is the most detailed as far as the organization of embryology laboratories is concerned, but it is focused exclusively on activities with reproductive ends (e.g. sperm preparation, insemination of oocytes, intracytoplasmic sperm injection [ICSI], embryo culture, embryo transfer, etc.).

In our opinion, the area of embryology in charge of deriving hESC lines from cryopreserved and cloned human embryos, must be included in the organization chart of stem cell banks or other research centres, in such a way that it interacts directly with the rest of the areas, such as those of cell culture, microbiology and environmental control, cytogenetics, traceability, etc.

Laboratory staff of an area of embryology

The different research associations recommend the basic assignation of staff in these laboratories, and the functions of each one of them in their guidelines. The staff planning for an IVF laboratory is determined depending on the work volume of each centre (ESHRE 2000; CAP 2002),

Table 2 Comparative analysis of guidelines about embryology laboratories focused to assisted reproduction techniques

	ESHRE 2000	CAP 2002	FSA 2002	ACE 2003	ASRM 2004	NAMSI 2005
Organization of the laboratory and definition of services					X	
Laboratory staff	X	X	X	X	X	X
Director	X	X	X	X	X	X
Laboratory supervisor	X	X	X	X	X	X
Embryologist	X	X	X	X	X	X
Technical staff					X	
Laboratory space and design	X	X	X	X	X	X
Restricted access			X		X	
Separated from other activities that could interfere	X	X	X	X	X	X
“Wet area”	X		X	X	X	X
Storage space and adequate changing areas for staff		X		X		X
Equipment and procedure manuals	X	X	X	X	X	X
Adequate environmental level air filter	X	X	X	X	X	X
CO ₂ incubators with alarm systems	X	X	X	X	X	X
Biological safety cabinet (BSC)	X					
Horizontal laminar flow cabinets						X
Mechanical pipetting devices	X	X	X			
Temperature and pH devices to CO ₂ incubators	X	X	X	X	X	X
Energy provision system	X	X		X		X
Microscopes and other types of instruments	X	X	X	X	X	X
Micromanipulation methods	X	X	X	X	X	X
Procedure manuals	X	X	X	X	X	X
Laboratory safety and infection control	X	X	X	X	X	X
Quality control	X	X	X	X	X	
Legislative and ethical aspects	X	X	X	X	X	X

although, we can establish basic figures within the laboratory organization chart:

- The Director is the person responsible for the embryology laboratory. In the different guidelines, there is discussion about the degree and experience in IVF laboratory management of the director. All societies agree that the director must dominate all the techniques that concern this type of laboratory. He/She must have proof of previous experience and provide the rest of the staff with adequate training in all aspects connected with assisted reproduction and embryonic manipulation. In stem cell banks and other research centres with an area of embryology in their organization chart, the figure of the director could be replaced by the managing director of the centre and he/she could assume the aforementioned cited functions, knowledge in stem cell culture and

tissue banking, and the coordination of the other areas. Furthermore, we think the director should have experience in business management.

- Laboratory supervisor: some societies (FSA 2002; ASRM 2004) have recommended this figure, whose main mission would be the coordination of all tasks carried out inside this area. He/She must also participate in the accreditation of training courses related with the speciality and he/she must possess demonstrated experience in embryonic manipulation techniques. In centres that obtain hESC lines like the Andalusian Stem Cell Bank, this figure is replaced, and his tasks shared, by the person responsible for traceability, the quality assurance manager, or by the embryologist himself, who finally will be responsible for planning the work in this area

- and the supervision of the laboratory technicians.
- Embryologist: All societies agree that this person would be responsible for doing all embryology laboratory planning. There is discussion about the graduate level of this figure, but we think that the embryologist must have a superior level degree in biomedical sciences and experience in mammalian embryology and “in vitro” culture techniques. Recently, two European Embryology Societies have suggested the recognition of the embryologist within the reproductive field (AGRBM 2005; Castilla et al 2006). These societies, one German and, the other Spanish, respectively, do not take into account that there could be embryologists who are not involved in reproduction. This person will be responsible for deriving cell lines using human cryopreserved or cloned embryos.
 - Technical staff: We consider that the presence of those who assist the embryologist is essential. The ASRM 2004 suggests this figure, but only for satellite facilities. His/Her work would be support for the embryologist, as well as the person who would control supplies and provisions, culture media, etc. In time, the laboratory technician could train or specialize in some of the techniques related to the derivation of cell lines, always under the supervision of the embryologist who is responsible for the laboratory.

Laboratory space and design

All guidelines studied, related to human reproduction (ESHRE 2000; CAP 2002; FSA 2002; NAMS 2005; ACE 2003; ASRM 2004) coincide in pointing out the importance that the laboratory should have restricted access and be situated in a place where people and materials do not often circulate and which is separated from other activities that could interfere. Furthermore, all guidelines assessed show the need for a separate office space provided for record keeping, data entry, and related administrative functions. Also, a general “wet area” (i.e., medium preparation,

equipment, sterilization, etc.) is necessary. It is also necessary to count on storage space and adequate changing areas for staff, too. All these places could be common for the rest of the research areas, not only specific for the area of embryology. In our opinion, the most important matter is the design of the rooms where the derivation of hESC lines is carried out. Each laboratory has an inherent special feature in the structure of the centre where it is located, therefore, we consider vital that the manipulation and derivation of hESC lines be carried out in cleanrooms. These installations possess some special characteristics which are ideal for this type of procedure; rooms with air filtration using high efficiency particulate air (HEPA) filters that provide a specific positive pressure within the rooms and, which with a management system monitor, the number of environment particulates, the pressure, the humidity and the light intensity, etc. The work in these types of installations will minimize, without doubt, the cell line contamination risks, so, we can obtain sterile cell products with sufficient quality for human transplants (Pharmaceutical Inspection Co-operation Scheme 2002).

Equipment and procedure manuals

According to the guidelines studied, the societies understand that the sterile conditions in the embryology laboratory are an essential measure to reduce the risk of contamination of biological material, either by the presence of infectious biological particles or volatile organic substances. Therefore, an adequate environmental level air filter and an optimal feature of all instruments within the rooms, was specifically considered at first in the EU regulations, but this request has been eliminated from the Directive Annexes (European Union 2004).

All guidelines consulted establish that the CO₂ incubators must possess alarm systems, as well as CO₂ and external air gauges to carry out an exhaustive follow up of these parameters in the incubator.

As regards the type of biological safety cabinet (BSC) recommended in these laboratories, only the ESHRE 2000 advises the use of BSC, whereas

other societies, like NAMSI 2005, advise the use of horizontal laminar flow cabinets with a thermostatically controlled heating plate.

The majority of guidelines recommend the use of mechanical pipetting devices, advising against mouth pipetting. The temperature control is a constant in the embryology laboratory, thus, all guidelines consulted recommend the use of devices to maintain the temperature and pH of the CO₂ incubators and control systems of the machines (microscopes, slide warmers, heating block, isolator, etc.).

The existence of an energy provision system, when there is an emergency or electric main fault, is a matter which societies like ESHRE 2000, CAP 2002, NAMSI 2005 and ACE 2003 recommend in their guidelines to minimize the energy fault risks.

The need for microscopes and other types of instruments in the embryology laboratory is understood by all research societies.

With respect to procedure manuals, all societies greatly emphasize this section, showing that all procedures should be reflected in written protocols. In this way, they advise the creation of a code of procedures and good practices.

In our centre, the embryology laboratory is where the derivation of hESC lines is carried out, using cryopreserved embryos as well as nuclear transfer techniques. It has, of course, modern technical equipment and, due to its special features, has to fulfil the essential requirements described below.

It is important to point out that the work in our embryology laboratory is carried out in extreme aseptic conditions. The environmental air is filtered with F, G and HEPA filters, which can trap dust particles and environmental contamination. The existence of positive pressure in cleanrooms contributes to reducing the risk of contamination of the manipulated embryos (Pharmaceutical Inspection Co-operation Scheme 2002). The human embryo handling must be done, from our point of view, in BSC, which contributes hugely to reducing the contamination possibilities. Also, the lighting conditions of the cleanrooms, when the embryos are outside the incubator, must be adequate (Noda et al. 1994).

Another measure to minimize the possibility of the embryonic contamination greatly would be the

use of disposable materials, although this depends on the economic possibilities of each laboratory. Furthermore, our Centre works according to the Guide to Good Manufacturing Practice (GMP), which provides supplementary guidance on the application of the principles and guidelines of GMP to sterile medicinal products (EC Guide to Good Manufacturing Practice 2003; Sharp 2005).

To carry out the derivation of hESC lines, a very specific technique and equipment infrastructure is necessary. The development of micromanipulation methods and their connection to coupling in inverted microscopes have been determinant to be able to derive hESC lines from embryos, above all in nuclear transfer techniques. Also, laser technology is used for assisted hatching. This technique consists of making the embryonic membrane weaker to make the exit of the future blastocyst easier and so favour the derivation (Antinori et al. 1996). Some groups suggest the use of laser as a new mechanical method of derivation of hESC lines, destroying the trophoblast and isolating the inner cell mass (ICM) (Tanaka et al. 2006).

Laboratory safety and infection control

All guidelines reviewed make reference to the need for exhaustive laboratory safety and infectious risk control in addition to the installations and the staff. The ESHRE 2000 points out that all techniques carried out in an embryology laboratory include the biological material handling, and this means a potential danger of transmission of illness to the laboratory staff. So, the vaccination of the staff against hepatitis B is suggested. On the other hand, a screening of the couples who donate embryos should be carried out to rule out the presence of transmissible infectious agents. Other kinds of protective measures may be necessary like some secondary contention elements (laboratory clothing, non-powdered gloves, masks, etc.) (ESHRE 2000).

The procedures and safety policy in the laboratory must include the whole staff and must be reviewed annually by the laboratory director. The protocols must include precautions with respect to fire and electric problems, for example internal and external disasters (FSA 2002; ASRM 2004).

With respect to this, it is important to create and develop a biosafety manual according to the Workplace Occupational Health, Safety and Environmental Guidelines (FSA 2002; Cobo et al. 2006a, b).

Our bank has drawn up general safety guidances in stem cell bank installations. In them, we have identified the main risks in these types of installations and we offer some indications and safety answers which should be applied in the area of embryology (Cobo et al. 2006a, b), for hESC lines derived for research purposes as well as those derived for possible future therapeutic applications.

On the other hand, the introduction of a microbiology and environmental control programme is necessary with both a section dedicated to overall quality control and also infectious risk and safety control measures (Cobo et al. 2005, 2006a, b).

Obviously, many human and animal pathogens, which can be isolated in cell cultures suppose a risk for the cell lines, staff, as well as the patients who receive the cells. Any microbiological contamination of the material donated (e.g., embryos, bone marrow) or introduced during the derivation process could have a multiplication potential and could be a serious danger for the recipients.

It is good practice to apply a routine particle monitoring using a continued monitoring system (e.g., Particle Measuring System) in this type of laboratory (Cobo et al. 2006a, b), in order to reduce risk of introduction of pathogen microorganisms into the cell cultures.

Quality control

Some guidelines (ESHRE 2000; CAP 2002; FSA 2002; ACE 2003; ASRM 2004) point out the need to devise a procedure manual, which has to be known by the whole staff and reviewed annually. It should deal with important aspects including the equipment calibration, corrective action documentation, infection and contamination control, adverse event register, safety copies of all computerized documents and an emergency monitoring such as alarm control of the machines (FSA 2002; ASRM 2004). ESHRE 2000 suggests quality control based on the assessment of the results.

The Andalusian Stem Cell Bank has implemented a Quality Management System to obtain the certification and later the accreditation according to ISO 9001:2000 and ISO 17025:2005. So, the Bank is working on its general and specific procedures and processes, standard operational procedures, forms and registers all included in a data base and to be followed in order to assure the quality of the product/service we intend to offer.

Legislative and ethical aspects

Since each guideline is produced in a different place of the world, not much reference is made to these legislative and ethical aspects because the legislation is different depending on the geographic location. However, all guidelines make reference to the necessary requirements to obtain the accreditation. The most significant of them is the need to draw up an informed consent of the donor couples whenever something about the donated biological material is to be decided. The majority of the guidelines also make reference to the creation of a committee which, recurrently, should treat possible improvements on a legislative and ethical level.

In Spain, currently, the Law 14/2006, May 26th, about Assisted Reproduction Techniques deals with the legal order on health care and research, above all in regenerative medicine (e.g., stem cell research, somatic cell nuclear transfer, etc).

Andalusia has been pioneer in this type of research regulation. The Andalusian Parliament passed the Law 7/2003, on October 20th 2003, with the regulation for research using human embryos, non-viable for IVF, which have been stored in liquid nitrogen for more than 5 years. Furthermore, a Spanish Royal Decree (2132/2004) with the establishment of the requirements and procedures to seek the development of research projects with stem cells obtained using spare embryos was published on October 29th 2004.

At a European level, a directive which establishes setting standards of quality and safety for the donation, procurement, testing, processing, preservation, storage, and distribution of human tissues and cells has recently been published. This is the previously aforementioned Directive 2004/23/CE, March 31st 2004 (European Union 2004),

and we comment its significance in the last point of this review.

NAP 2005, as previously indicated, is focused on the hESC research. Therefore, its legislative and ethical recommendations are more significant because they are focused on the procurement of gametes, blastocysts or cells for hESC generation, and derivation of hESC lines. Furthermore, it includes a section on the banking and distribution of these cell lines, the medical and pharmaceutical application, and the international collaboration that this type of research requires. Finally, they also make a proposal to establish the “Institutional Embryonic Stem Cell Research Oversight Committee”.

Assessment of the new European directive

On March 31st 2004, the European Parliament issued Directive 2004/23/EC, which was published in the Official Journal of the European Union on April 7th 2004 (European Union 2004). This Directive arose with the intention to unify the diversity of standards across European countries that regulate the extensive exportation/importation of certain tissues, the need to increase both availability of donated tissues and the effective use of those tissues available, and to avoid errors arising from the multiple coding and classification systems in use across Europe. It applies to all human tissues and cells, including adult and embryonic stem cells, but excludes blood and blood products as well as human organs. It is interesting that the European Directive is the most suitable for the needs of an embryology laboratory, which derives hESC lines. Furthermore, Mortimer (2005) has criticized the directive, because it tries to include in the same normative both embryology laboratories of reproduction centres and tissue banks and research centres which derive cell lines or research with them. In this sense, he suggests that stem cells need more care than reproductive cells, and also suggests that some aspects indicated in the directive are difficult to carry out in an embryology laboratory dedicated to reproduction, but which are not difficult to carry out in an embryology laboratory which derives hESC lines. Some of the

aspects which make these types of laboratories different would be the need for a cleanroom or not, the sample procurement methods, handling and processing of samples, packaging, labelling and storage, traceability, the different methods used in each laboratory, as well as the different factors, such as intrinsic and extrinsic factors which affect both types of laboratory (e.g., culture media, temperature, culture gas/atmosphere, air quality, embryonic stress during the culture, etc.). Therefore, from our centre we also consider that a distinction should be made between both.

Recently, the Official Journal of the European Union has published the Commission Directive 2006/17/EC, of February 8th 2006, implementing Directive 2004/23/EC of the European Parliament and of the Council as regards certain technical requirements for the donation, procurement and testing of human tissues and cells.

Therefore, the Directive considers the need to guarantee the safety of all types of handling and research. May 2007 is the final date for EU countries to draw up this Directive.

Conclusions

So far, the embryology laboratory has focused its activity on IVF techniques. Nevertheless, after the discovery of embryonic stem cells and their contribution to the damaged tissue regeneration, there are numerous research centres and tissue banks which have introduced hESC lines programmes using cryopreserved embryos, so, a new dimension and new perspectives are provided to the embryology laboratory. In some countries, like Spain, the legislation permits the creation of hESC lines using spare cryopreserved embryos from IVF cycles, or cloned embryos using the nuclear transfer technique, only for a therapeutic use. This work is preferentially being done in research laboratories, but also can be done in cell banks, like the Andalusian Stem Cell Bank. In other countries, like the United Kingdom, the legislation permits the use of fresh embryos. But in others, the legislation has banned the use of embryos to derive hESC lines (e.g., Italy).

The derivation of hESC lines and the viability maintenance requires meticulous techniques and

aseptic processes (Fig. 1). This is critical in the derivation of hESC lines due to the limited number of available embryos and the still low efficiency success rate observed to date (Hoffman et al. 2005).

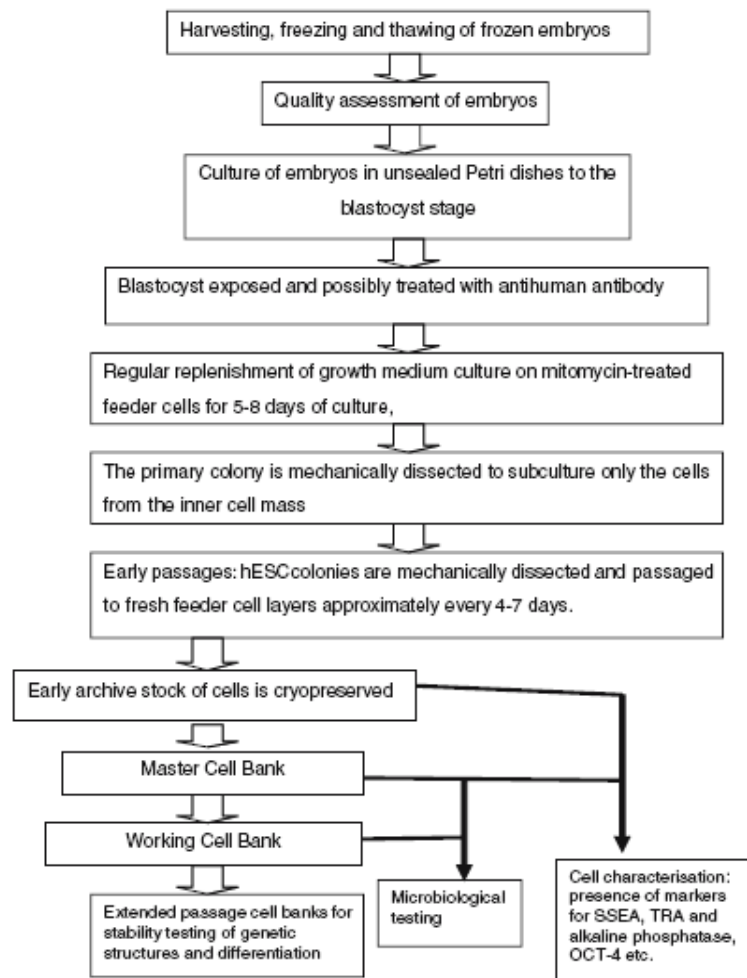
The hESC are obtained in the ICM of the blastocysts. This ICM is separated and isolated from the trophectoderm using immunosurgery (Solter et al. 1975), with mechanical processes (Bongso et al. 1994), with direct culture of the blastocysts (Kim et al. 2005) or with laser techniques (Tanaka et al. 2006). These cells are seeded on an inactive fibroblastic feeder layer (Richards et al. 2003), over an extracellular matrix (Matrigel™) (Xu et al. 2001) or over a matrix that includes protein components solely derived from recombinant sources or purified

from human material (Ludwig et al. 2006). In this process, the colonies, which are set up with undifferentiated morphology are selected and subcultured in order to obtain phenotypically and genotypically stable cell lines which are free of contamination.

In our opinion, the figure of the embryologist is necessary to derive hESC lines. Also, facilities or installations such as those described in this manuscript are required. The embryology laboratory must be in a dynamic organization structure based on the application of both quality and biosafety assurance programmes in order to obtain hESC lines for a future human transplantation.

This work should be carried out in a specific area by personnel qualified in thawing

Fig. 1 The derivation and banking of hESC lines (obtained from Cobo et al 2006b)



processes and embryo culture until blastocyst. This technique is very similar to an IVF laboratory technique, but there are differences as regards the final destination of the embryos. However, this manipulation should be done, in our opinion, in cleanrooms procuring aseptic manipulation techniques and working with a good environmental monitorization system to reduce the risk of contamination.

The fast development of regenerative medicine makes the interpretation and harmony of international guidelines necessary to assure that these new procedures and therapies are greatly accepted for clinical use in humans. This would also involve the procurement process of hESC lines which must be developed in a specific cell procurement programme from this origin; this, will be tough, dynamic and cost effective. The processing of hESC lines will be mainly developed based on the characteristics of each centre, but can take into account the general principles reviewed here. The design and the specific implementation programmes for the area of embryology within stem cell banks and other research centres with this area but which do not use IVF techniques is vital to develop embryonic cell lines in optimum conditions for future therapeutic applications.

Acknowledgement Ms. Angela Helen Barnie for the English correction of the manuscript.

References

- Association of Clinical Embryologists (ACE) (2003) Accreditation Standards and Guidelines for IVF Laboratories. <http://ace.ivf.net/ace/training.php>
- AGRBM (2005) Criteria for the recognition as an embryologist in human reproduction and continued professional education: the concept of the German Society for Human Reproductive Biology. *Alpha* 32:12–13
- American Association of Tissue Banks (2002) Standards for tissue banking, 10th edn. American Association of Tissue Banks, McLean, VA
- Andalucian Parliament Law 7/2003, October 20 (2003) about the regulation of the research with nonviable human embryos to “in vitro” fertilization. *BOJA* 210
- Antinori S, Selman HA, Caffa B et al (1996) Zona opening of human embryos using non-contact UV laser for assisted hatching in patients with poor prognosis of pregnancy. *Hum Reprod* 11:2488–2492
- American Society for Reproductive Medicine (ASRM) (2004) Reviewed guidelines for human embryology and andrology laboratories. www.asrm.org
- Bongso A, Fong CY, Ng SC, Ratnam S (1994) Isolation and culture of inner cell mass cells from human blastocysts. *Hum Reprod* 9:2110–2117
- College of American Pathologist (CAP) (2002) Laboratory Improvement. www.cap.org
- Castilla JA, Alcaide A, Bonada M, Expósito A, Luna C, Núñez R, de los Santos MJ (eds) (2006) I. Guidelines about Human and Physical Requirements in the Assisted Reproduction Laboratory. ASEBIR Clinical Embryology Notebooks, Madrid, Spain
- Cobo F, Stacey GN, Hunt C, Cabrera C, Nieto A, Montes R, Cortes JL, Catalina P, Barnie A, Concha A (2005) Microbiological control in stem cell banks: approaches to standardization. *Appl Microbiol Biotechnol* 68:456–466
- Cobo F, Cabrera C, Catalina P, Concha A (2006a) General safety guidances in stem cell bank installations. *Cytotherapy* 8:47–56
- Cobo F, Stacey GN, Cortes JL, Concha A (2006b) Environmental monitoring in stem cell banks. *Appl Microbiol Biotechnol* 70:651–662
- Cohen J, Gilligan A, Garrisi J (2004) Setting up an ART laboratory. In: Gardner DK, Weissman A, Howles CM et al (eds) Textbook of assisted reproduction techniques. Laboratory and clinical perspectives, 2nd edn. Taylor & Francis, London, UK, pp 17–24
- Commission Directive 2006/17/EC of 8 February (2006) implementing Directive 2004/23/EC of the European Parliament and of the Council as regards certain technical requirements for the donation, procurement and testing of human tissues and cells. *Official Journal of the European Union*, L 38/40
- Cowan CA, Klimanskaya I, McMahon J, Atienza J, Witmyer J, Zucker JP, Wang S, Morton CC, McMahon AP, Powers D, Melton DA (2004) Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts. *N Engl J Med* 350:1353–1356
- Department of Health (2001) A code of practice for tissue banks. Department of Health, London, UK
- EC Guide to good Manufacturing Practice (2003) Revision to Annex 1. Manufacture of Sterile Medicinal Products. European Commission. Enterprise Directorate-General
- European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) (2000) Guidelines for good practice in IVF laboratories. www.eshre.com
- European Union (2004) Directive 2004/23/EC of the European Parliament and of the Council of 31 March (2004) on setting standards of quality and safety for the donation, procurement, testing, processing, preservation, storage, and distribution of human tissues and cells. *Official Journal of the European Union*, L 102/48
- FSA. The Fertility Society of Australia Reproductive Technology Accreditation Committee (RTAC) (2002) Code of practice for centres using assisted reproductive technology. www.fsa.au.com/rtac/

- Hoffman LM, Carpenter MK (2005) Characterization and culture of human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 23:699–708
- ICMR-DBT. Indian Council of Medical Research (2006) Guidelines for stem cell research and therapy. www.icmr.nic.in
- ISO (1999) International Standard ISO 14644. Cleanrooms and associated controlled environments. Part 1: Classification of air cleanliness. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland
- ISO (2000) International Standard ISO 9001. Quality Management Systems-Requirements. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland
- ISO (2005) International Standard ISO 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland
- Kim HS, Oh SK, Park YB, Ahn HJ, Sung KC, Kang MJ, Lee LA, Suh CS, Kim SH, Kim DW, Moon SY (2005) Methods for derivation of human embryonic stem cells. *Stem Cells* 23:1228–1233
- Ludwig TE, Levenstein ME, Jones JM, Berggren WT, Mitchen ER, Frane JL, Crandall LJ, Daigh CA, Conard KR, Piekarczyk MS, Llanas RA, Thomson JA (2006) Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions. *Nat Biotechnol* 24:185–187
- Mortimer D (2005) A critical assessment of the impact of the European Union Tissues and Cells Directive (2004) on laboratory practices in assisted conception. *Reprod Biomed Online* 11:162–176
- National Academy of Medical Sciences of India (NAMSI) (2005) National Guidelines for accreditation, supervision and regulation of ART clinics in India. www.icmr.nic.in
- National Academies Press (NAP) (2005) Guidelines for Human Stem Cell Research. www.nap.edu/books
- National Institute of Health (NIH) (2002) Guidance for investigators and institutional review boards regarding research involving human embryonic stem cells, germ cells, and stem cell-derived test articles
- Noda Y, Goto Y, Umaoka Y et al (1994) Culture of human embryos in alpha modification of Eagle's medium under low oxygen tension and low illumination. *Fertil Steril* 62:1022–1027
- Pharmaceutical Inspection Co-operation Scheme (2002) Recommendation on sterility testing. Pharmaceutical Inspection Convention, PI 012-1, November 1, 2002
- Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A (2000) Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol* 18:399–404
- Richards M, Tan S, Fong CY, Biswas A, Chan WK, Bongso A (2003) Comparative evaluation of various human feeders for prolonged undifferentiated growth of human embryonic stem cells. *Stem Cells* 21:546–556
- Sharp J (2005) GMP and quality assurance in sterile products manufacture. In: J Sharp (ed) *Good pharmaceutical manufacturing practice*. CRC Press, Florida, USA, pp 371–404
- Solter D, Knowles BB (1975) Immunosurgery of mouse blastocysts. *Proc Natl Acad Sci USA* 72:5099–5102
- Spanish Law 14/2006, May 26th, about Assisted Reproduction Techniques 2006. BOE 126
- Spanish Royal Decree 2132/2004, about the requirements and procedures to request the development of research projects with human embryonic stem cells. 2004. BOE 262
- Tanaka N, Takeuchi T, Neri QV, Sills ES, Palermo GD (2006) Laser-assisted blastocyst dissection and subsequent cultivation of embryonic stem cells in a serum/cell free culture system: applications and preliminary results in a murine model. *J Transl Med* 8(4):20 DOI 10.1186/1479-5876-4-20
- Xu C, Inokuma MS, Denham J, Golds K, Kundu P, Gold JD, Carpenter MK (2001) Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 19:971–974

IV.2.- Spanish Stem Cell Bank interviews examine the interest of couples in donating surplus human IVF embryos for stem cell research. JL Cortes, G Antiñolo, L Martínez, F Cobo, A Barnie, A Zapata, P Menendez. Cell Stem Cell, 2007. 1:17-20

INTRODUCCIÓN: Las hESCs han abierto una vía de investigación en medicina regenerativa a través de la obtención de células maduras y funcionales derivadas de las hESCs. Estas hESCs son obtenidas a partir de la ICM de embriones humanos en estadio de blastocisto. En España, la estimación es que en 2003 había unos 100.000 embriones congelados en clínicas de reproducción nacionales. Buscando un destino final a estos embriones, la legislación española ha establecido cuatro posibilidades a decidir por la pareja progenitora tras consentimiento informado. Las cuatro posibilidades son: i) Crioconservación hasta su uso por parte de la pareja, ii) Donación a otras parejas con fines reproductivos, iii) Donación a la investigación dentro de un proyecto concreto aprobado por las autoridades competentes, iv) Descongelación sin ningún fin. Nuestro banco de células madre ha sido autorizado por el Instituto de Salud Carlos III para derivar nuevas hESCs a partir de embriones congelados.

OBJETIVO: El objetivo de este estudio fue investigar el interés de las parejas andaluzas respecto a la donación de sus embriones sobrantes a investigación.

MATERIAL Y MÉTODOS: Hemos llevado a cabo un análisis extensivo a través de esta entrevista personal a 97 parejas, las cuales fueron preguntadas acerca del destino final deseado para sus embriones sobrantes del ciclo de FIV al que fueron sometidas. Las entrevistas las realizaron un embriólogo y un asesor jurídico, y fueron supervisadas por el responsable de la Unidad de Reproducción. La entrevista incluyó un breve resumen del ciclo de FIV, explicación de las cuatro posibilidades, haciendo hincapié en la tercera opción, donde se explicó el proyecto de investigación concreto al que irían los embriones donados para tal fin, si este fuese el deseo de la pareja. Finalmente, la pareja firmó el consentimiento informado.

RESULTADOS: Nuestros resultados vienen expuestos en la **Tabla 3:**

Tabla 3: Resultados acerca de la decisión tomada por las parejas entrevistadas respecto a sus embriones crioconservados.

Nº de parejas entrevistadas Nº embriones disponibles	HOSPITAL 1 (n=22) (E=96)			
Destino de los embriones donados por la pareja	A	B	C	D
	(n=10) 45% (E=52) 54%	(n=1) 5% (E=2) 2%	(n=11) 50% (E=42) 44%	(n=0) 0% (E=0) 0%
Nº de parejas entrevistadas Nº embriones disponibles	HOSPITAL 2 (n=75) (E=332)			
Destino de los embriones donados por la pareja	A	B	C	D
	(n=32) 43% (E=140) 42%	(n=7) 9% (E=40) 12%	(n=35) 47% (E=150) 45%	(n=1) 1% (E=2) 1%

n.- Número de parejas

E.- Número de embriones

A.- Crioconservación hasta su uso por parte de la pareja

B.- Donación a otras parejas con fines reproductivos

C.- Donación a la investigación dentro de un proyecto concreto

D.- Descongelación sin ningún fin

Según los resultados podemos observar como en los dos hospitales la gran mayoría de las parejas optaron por las opciones de seguir manteniendo sus embriones congelados y la de donarlos a investigación (44% y 48%, respectivamente). Evaluando el porcentaje restante se observa como, sin embargo, el número de parejas que optaron por la donación a otras parejas con fines reproductivos y la descongelación sin ningún fin fueron un número muy reducido (7% y <1%, respectivamente).

Estos resultados contrastan con los obtenidos por una Asociación Americana (SART-RAND) donde solamente obtuvieron un 2,8% de parejas que se decidieron por donar sus embriones a investigación con hESCs.

CONCLUSIONES: Nosotros hemos encontrado que la realización de una entrevista personal realizada por un embriólogo y un asesor jurídico es productiva para promover la buena voluntad de las parejas a donar los embriones para la investigación con células madre. La entrevista personal

ayuda a las parejas a resolver las dudas legales y sirve para aliviar cualquier incertidumbre relacionada con este tipo de investigación.

Spanish Stem Cell Bank Interviews Examine the Interest of Couples in Donating Surplus Human IVF Embryos for Stem Cell Research

Jose Luis Cortes,^{1,*} Guillermo Antñolo,² Luis Martínez,³ Fernando Cobo,¹ Angela Barnie,¹ Agustín Zapata,⁴ and Pablo Menendez^{1,*}

¹ Spanish Stem Cell Bank (Andalusian Central Node), Centro de Investigaciones Biomédicas, Parque Tecnológico de las Ciencias de la Salud, Granada, Spain

² Unidad Clínica de Genética y Reproducción, Hospital de la Mujer, Hospitales Universitarios Virgen del Rocío, Sevilla, Spain

³ Unidad de Reproducción Asistida, Hospital Virgen de las Nieves, Granada, Spain

⁴ Spanish Stem Cell Bank, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

*Correspondence: pablo.menendez@juntadeandalucia.es (P.M.), jose.l.cortes.sspa@juntadeandalucia.es (J.L.C.)
DOI 10.1016/j.stem.2007.03.001

Human embryonic stem cells (hES cells) were first derived in 1998 and hold great promise for opening up new avenues in regenerative medicine through the generation of transplantable cells to be used in future cell replacement therapies (Menendez et al., 2006; Reubinoff et al., 2000; Thomson et al., 1998). However, there is extensive discussion about ethical aspects of the use of human embryos for stem cell research (Edwards, 2006; ESHRE Taskforce on Ethics and Law, 2001, 2002; McLaren, 2001). Part of this discussion relates to intense public debate about the ethics and implications of in vitro fertilization (IVF) and its associated procedures (Edwards and Beard, 1997). In IVF treatment cycles, the number of embryos generated usually exceeds the number that can be prudently transferred to the future mother, and these surplus embryos can potentially be used for stem cell research. The 2003 SART-RAND study estimated that at that time there were 400,000 stored embryos in 430 US IVF clinics (Hoffman et al., 2003; Kaiser Network, 2007). In Spain, the estimate is that in 2003 there were 100,000 stored embryos in 203 Spanish IVF clinics. In other countries, the specific legislative environment influences both the numbers of stored embryos and their potential availability for donation for stem cell research (see, for example, Koefler Puorger et al. [2006]).

Despite being a very Catholic country, Spain currently represents a fairly permissive legal and ethical environment for the use of excess embryos for hES cell research. Although IVF cycles must not be planned specifically

for the generation of human embryos to be used for stem cell research, cryopreserved embryos fewer than 14 days past fertilization may be used for hES cell line derivation regardless of the length of time that they have been kept frozen. Moreover, the Spanish government recently passed a bill to permit therapeutic cloning and cellular reprogramming. The only requirement for hES cell line derivation and use is that the procedures must be linked to a specific research project. Many countries, including Spain and the UK, have set up stem cell banks to provide researchers with hES cell lines and facilitate hES cell research. Although UK and Swedish legislation allow the use of fresh embryos, most countries only permit donation of spare cryopreserved embryos for biomedical research. Importantly, while embryos are becoming more accessible for physicians and embryologists who work within IVF units, access to embryos for basic researchers in stem cell centers and academic institutions not directly linked to an IVF clinic remains a major challenge.

Stem cell banks such as ours need to derive new hES cell lines for both international distribution and for our own hES cell research projects. To investigate the interest of Spanish couples in donating supernumerary cryopreserved embryos for hES cell research, we have conducted interviews with 97 couples covering two IVF units. We conducted an extensive analysis through personal interviews in which couples were asked to make a decision about the fate of embryos cryopreserved for more than 3 years in public

IVF units not linked to the stem cell bank. The interviews were carried out by a senior embryologist and a legal advisor and were supervised by the head of the IVF clinic. The law in many countries does not allow embryo donation for the treatment of other infertile couples (Bjoresten and Hovatta, 2003). Spanish law, however, like U.S. legislation, does permit this alternative (Hoffman et al., 2003). Thus, current Spanish law obliged us to offer the couples four options regarding the fate of the surplus cryopreserved embryos: (1) to keep the embryos cryopreserved for potential future reproductive purposes, (2) to donate embryos to other infertile couples for reproductive purposes, (3) to donate the embryos to biomedical research (including stem cell research), or (4) to discard the embryos. The four possible embryo fates were explained in detail to all the couples by the senior embryologist in an unbiased manner (Cortes et al., 2006). The interview included a brief summary of the couple's IVF cycle, covering the oocyte acquisition date, the number of embryos obtained, the number of embryos frozen, and the number of births. The legal situation and potential concerns of the couples about donation for biomedical research were addressed by the legal advisor and the senior embryologist. When the first option (to keep embryos cryopreserved for potential future reproductive purposes) was explained to the couples, it was made clear that the embryos could be frozen until the end of the fertility age of the woman, which would be assessed by a gynecologist. For the second option

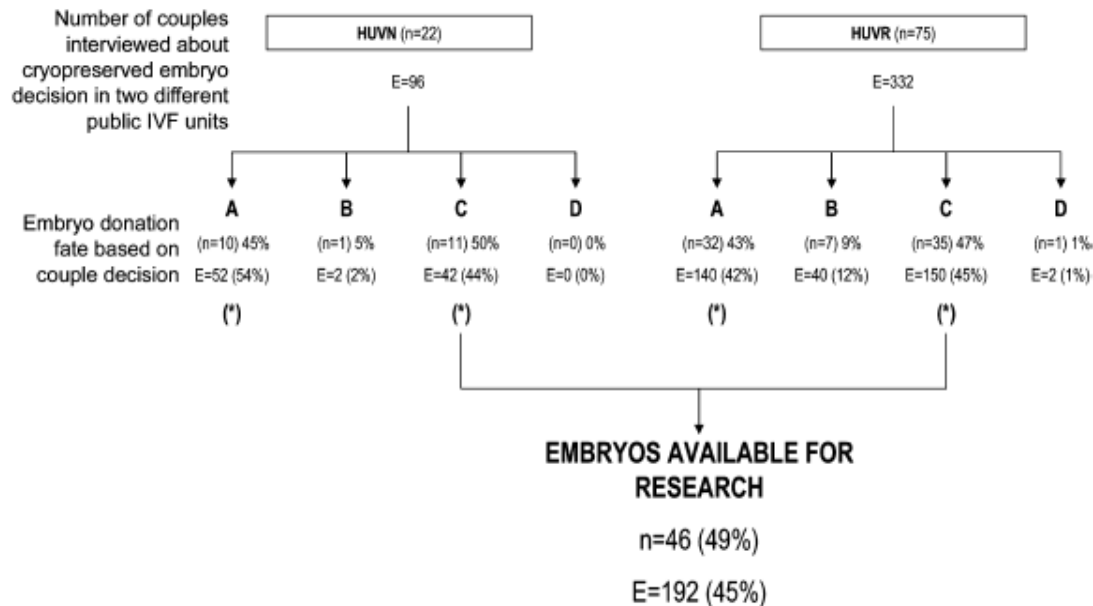


Figure 1. Summary of the Choices Made by Interviewed Couples about the Fate of Supernumerary Cryopreserved Human Embryos

Couples from two different Public IVF Public Units (HUVN and HUVR) were interviewed about the potential fate of their spare embryos that had been frozen for more than 3 years. In accordance with Spanish legislation, the couples were offered four options: (A) to keep the embryos cryopreserved for potential future reproductive purposes, (B) to donate embryos to other infertile couples for reproductive purposes, (C) to donate embryos to biomedical research (including stem cell research), or (D) to discard surplus embryos. The four possible embryo fates were explained in detail to all the couples by the senior embryologist and a legal advisor in an unbiased manner. HUVN, Virgen de las Nieves Hospital, Granada, Spain; HUVR, Virgen del Rocío Hospital, Seville, Spain; n, number of couples with embryos cryopreserved for more than 4 years. (E) Number of cryopreserved human embryos. *P value, (A) versus (B), $p < 0.00001$; (B) versus (C), $p < 0.00001$.

(donation of embryos to other infertile couples), it was made clear that this donation would be for reproductive ends and require renunciation of any resulting pregnancy. With respect to the third option (donation of embryos to research), the couples received up-to-date information about research projects being carried out in the field of stem cell research, including the derivation of hES cell lines and their possible future application in regenerative medicine and cell therapy, developmental biology, drug screening, disease modeling, and other areas. One stem cell research project was also explained in detail to accommodate the Spanish legal requirement that the donation of embryos must be related to a specific research project. Following the interview, couples were then asked to read, understand, and sign an informed consent form that, according to the Spanish law, was anonymous, confidential, voluntary, altruistic, and revocable. The legal advisor was present at all times to ensure that the inter-

view was unbiased and allowed the couples to go through the decision-making process independently.

We found that 49% of the interviewed couples chose to donate their embryos for stem cell research, and 44% decided to keep them cryopreserved. Only 7% chose to donate them to other infertile couples, and less than 1% made the decision to discard them (Figure 1). Importantly, similar results were obtained from couples who underwent IVF cycles in IVF units in two cities with different social and economic profiles (Figure 1). These results differ from a recent report from a clinic in the U.S., which indicated that 54% of treated couples asked to have their embryos destroyed, 43% decided to donate them to biomedical research unrelated to stem cells (although donation for stem cell research was not discussed), and 3% offered them to other infertile couples (Kaiser Network, 2007). Furthermore, the more extensive SART-RAND study carried out in the U.S. in 2003 (Hoffman et al.,

2003) found that only 2.8% of cryopreserved embryos were designated for stem cell research, which obviously limits possible conversion into hES cell lines (Hoffman et al., 2003).

It is worth emphasizing that, in our study, half of the interviewed couples opted to donate their surplus stored embryos for stem cell research. Although it should be stressed that the aims and execution of the two studies were clearly very different, our findings do contrast sharply with those described in the SART-RAND study published in 2003. In our view, there are a number of potential reasons for the differences, and we have outlined our perspective on the most significant of these in a summary table (Table 1). We consider the differences are likely due to the following. (1) the SART-RAND study's major aim being to determine, using a questionnaire, the number of embryos stored in IVF clinics and the number of embryos targeted for stem cell research. By contrast, we already knew in advance the

Table 1. Potential Reasons for the Differences in the Outcome of Embryo Donation for Stem Cell Research between Our Study and the Previously Published SART-RAND Study

Possible Reasons for the Differences between Studies	Hoffman et al. (2003)	Present Study
Percent of embryos donated to stem cell research	2.8%	45%
Aims of the study	(1) To determine the number of embryos stored in US IVF clinics (2) To determine prospectively the percentage of couples willing to donate their embryos for stem cell research	(1) To determine the percentage of couples willing to donate their embryos for stem cell research based on a cohort of patients with embryos frozen for more than 3 years and knowing in advance the pregnancy success rate
Type of communication between the IVF clinic and queried couples	Questionnaire sent to the couples	Personal interview
Strategy to reduce confusion about ethical and research issues	Not evaluated	Presence during the interview process of a senior embryologist and head of the IVF clinic
Time of contact with the couples	Before or shortly after the IVF cycles	3–4 years after embryo cryopreservation with known pregnancy success rates approaching 40%

number of embryos frozen for more than 3 years and the pregnancy success rate, facilitating the interview process. (2) The SART-RAND study was conducted by sending a questionnaire to clinics but did not involve an interview. We instead undertook a time-consuming process in which we conducted formal interviews with all the couples as described above. We found that the interview process allowed us to address the couples' concerns about ethical and scientific questions. The interviews were conducted in an unbiased manner, but this level of personal attention could be a persuasive factor in terms of donation to research. (3) The SART-RAND survey included couples at many different stages of the IVF process, including before or just after the cycle, so it is likely that, in this scenario, most couples of reproductive age would choose to keep their embryos cryopreserved for potential future use. In our study, however, 97 couples with embryos frozen for more than 3 years were interviewed. At this stage, slightly more than 35% of couples had babies, and in fact nearly 30% of them had twins, while only a few had triplets. Clearly, such cir-

cumstances make the decision to donate surplus embryos for research more appealing. In fact, we suspect that if a similar survey using an interview process were carried out at this time with U.S. couples who have embryos preserved for 3 years or more, the outcome would be closer to our results than the earlier SART-RAND findings. The likelihood of such an outcome would be even greater if hES cell derivation was supported by U.S. government funding. Furthermore, although donation of fresh embryos is prohibited in many countries, a study carried out in a Sweden, where this process is permitted, found that a very high proportion (92%) of queried couples chose to donate embryos that were not of sufficient quality for implantation or cryopreservation for research purposes, including stem cell research, rather than to have them destroyed (Bjurstén and Hovatta, 2003). Thus, if the legislative conditions change, it is possible that discarded fresh embryos could also be a significant source of material for research.

To conclude, we have found that a personal interview with a senior embryologist and a legal advisor is pro-

ductive in ascertaining the willingness of couples to donate embryos for stem cell research. The interview process helps couples navigate the confusing legal situation and can be used to alleviate any concerns they have about donation for research purposes. We hope that our findings will promote new initiatives among other stem cell researchers and experts in ethics and stem cell counseling to facilitate progress in hES cell research.

ACKNOWLEDGMENTS

This work has been funded by the Fundación Progreso y Salud (grants 0029/2006 and 0030/2006 to P.M.); Consejería de Salud; Junta de Andalucía, Spain; and the International Foundation Jose Carreras (FIJC-05/EDThomas 2006 to P.M.). We are also grateful to the Servicio Andaluz de Salud and the Instituto de Salud Carlos III for their full support throughout the development of this study.

REFERENCES

- Bjurstén, K., and Hovatta, O. (2003). Hum. Reprod. 18, 1353–1355.
- Cortes, J.L., Cobo, F., Barnie, A.H., Catalina, P., Cabrea, C., Nieto, A., Montes, R., and Concha, A. (2006). Cytotechnology 52, 1–11.
- Edwards, R.G. (2005). Reprod. Biomed. Online 10, 1–8.

- Edwards, R.G., and Beard, H.K. (1997). *Hum. Reprod.* **12**, 3–5.
- ESHRE Taskforce on Ethics and Law (2001). *Hum. Reprod.* **16**, 1446–1448.
- ESHRE Taskforce on Ethics and Law (2002). *Hum. Reprod.* **17**, 1409–1410.
- Hoffman, D.I., Zellman, G.L., Fair, C., Mayer, J.F., Zeitz, J.G., Gibbons, W.E., and Turner, T.G. (2003). *Fertil. Steril.* **79**, 1063–1069.
- Kaiser Network (2007). http://www.kaiser-network.org/daily_reports/rep_index.cfm?DR_ID=42571.
- Koefler Puotger, U.P., Buergin, M., Wunder, D., Crazzolara, S., and Birkhauser, M.H. (2006). *Reprod. Biomed. Online* **13**, 772–777.
- McLaren, A. (2001). *Nature* **414**, 129–131.
- Menendez, P., Bueno, C., and Wang, L. (2006). *Cytotherapy* **8**, 530–541.
- Reubinoff, B.E., Pera, M.F., Fong, C.Y., Trounson, A., and Bongso, A. (2000). *Nat. Biotechnol.* **18**, 399–404.
- Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., and Jones, J.M. (1998). *Science* **282**, 1145–1147.

IV.3.- Reproductive medicine embryologists meets hESC research: need to adjust the regulatory framework to actual expectations about hESC research and its potential detrimental consequences. JL Cortes, P Menendez. *Fertility & Sterility*. 2008 (doi:10.1016/j.fertnstert.2008.05.041)

INTRODUCCIÓN: El campo de la medicina reproductiva ha estado durante largo tiempo con unos requisitos éticos mínimos, debido a que la transferencia del material embrionario es generalmente autóloga. Desde la primera derivación de hESC en 1998, este campo emergente de la medicina regenerativa/terapia celular ha dependido principalmente de la medicina reproductiva para su éxito. Existen numerosas parejas, o mujeres en su caso, sometidas a ciclos de FIV que mantienen sus embriones crioconservados en centros de reproducción y que desean donarlos a la investigación con células madre.

En marzo del 2004, el Parlamento Europeo promulgó la Directiva 2004/23/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 31 de marzo de 2004 relativa al establecimiento de normas de calidad y de seguridad para la donación, la obtención, la evaluación, el procesamiento, la conservación, el almacenamiento y la distribución de células y tejidos humanos. Desde el primer momento no ha habido consenso sobre la conveniencia o no de construir salas GMP en todos los laboratorios donde se distribuyan y manipulen células y tejidos humanos, debido a que dentro de esta Directiva estarían incluidos las clínicas de reproducción, los biobancos, y finalmente los centros de investigación básica. Numerosos expertos en reproducción han expresado sus quejas respecto a la necesidad de establecer criterios estrictos de calidad del aire en los centros de reproducción. Estas quejas han dado lugar a que en la Directiva 2006/17/CE de la Comisión, de 8 de febrero de 2006, por la que se aplica la Directiva 2004/23/CE del Parlamento Europeo y del Consejo en lo relativo a determinados requisitos técnicos para la donación, la obtención y la evaluación de células y tejidos humanos, no se contemple nada acerca de los criterios de calidad del aire.

Algunos países como el Reino Unido y España disponen de bancos de células madre para derivar, almacenar, caracterizar y distribuir hESCs dentro de condiciones GMP para futuras aplicaciones clínicas. Estos bancos y

laboratorios donde se derivan hESCs están contratando embriólogos con amplia experiencia en reproducción asistida. Mientras que el embriólogo asistencial satisface sus expectativas de maniobrabilidad cumpliendo todos los puntos de esta Directiva, al embriólogo investigador, perteneciente a un centro encargado de la derivación de hESCs, la Directiva le crea un grado de confusión, después de la gran inversión que hay que realizar en la puesta a punto de salas GMP en las instalaciones. En nuestra experiencia, los embriólogos asistenciales con amplia experiencia en reproducción asistida y que se están iniciando en la investigación con hESC han necesitado un periodo de adaptación en el aspecto legislativo, con riesgo incluso de perder su motivación científica al enfrentarse a grandes restricciones legales al dedicarse a su nuevo trabajo.

OBJETIVO: Desde el Banco Andaluz de Células Madre quisimos establecer unas propuestas que nos permitan distinguir entre la medicina reproductiva, la investigación básica en hESC, y la investigación con hESC orientada al futuro uso terapéutico. Estas propuestas han sido aceptadas por la Asociación Americana de Medicina Reproductiva (ASRM).

RESULTADOS:

Tabla 4: Propuestas sobre un marco regulador que diferencie entre la medicina reproductiva, la investigación básica con hESCs, y la investigación con hESCs para aplicación terapéutica.

DISCIPLINA	OBJETIVO DE LA INVESTIGACIÓN	CENTROS DONDE SE REALIZA	OBJETIVO FINAL	NIVEL DE REGULACIÓN LEGAL
Medicina reproductiva	FIV	Clínicas de FIV públicas y privadas	Transferencia autóloga	Como está regulado actualmente
Investigación básica con hESC	Adquisición de conocimiento básico	Laboratorio académico	Investigación básica. Sin aplicación en humanos	Apenas regulado
Investigación con hESC para futuro uso terapéutico	Optimización de futuras terapias celulares	Hospital/ Universidad/ Compañía biotecnológica privada	Transplante alogénico	Regulación muy estricta

CONCLUSIONES: En nuestra opinión, debe existir un periodo de adaptación en aquellos embriólogos expertos en reproducción que ahora están envueltos en investigación con hESCs. En esta adaptación, estos embriólogos deben comportarse como auténticos manipuladores de tejido destinado a ser transplantado, y este hecho es el que conlleva que operen según unas reglas legales más estrictas. Sin embargo, aunque deben existir unas mínimas reglas para la investigación básica con hESCs, no deben ser tan estrictas en este campo, ya que harían el proceso más lento y dificultoso, además de provocar que muchos laboratorios no puedan realizar este tipo de estudios, al no poder hacerse cargo de la inversión que exige la Directiva.

Reproductive medicine meets human embryonic stem cell (hESC) research: the need to adjust the regulatory framework to actual expectations and potential detrimental consequences of hESC research

Human embryonic stem cell (hESC)-based cell therapy depends on access to surplus embryos from IVF cycles and collaborative interactions between biomedical researchers and reproductive medicine professionals. It is becoming instrumental to achieve an international consensus about the standards that should regulate the manipulation of human embryonic tissue in two distinct settings: reproductive medicine and embryonic stem cell research. Within hESC research, the regulatory framework needs to be adjusted according to the actual expectations and potential detrimental consequences of hESC research. (Fertil Steril® 2008; ■:■-■. ©2008 by American Society for Reproductive Medicine.)

Human embryonic stem cells (hESCs) are derived from the inner cell mass of surplus human embryos from IVF cycles (1). They are characterized by a unique potential to differentiate into any human tissue and an unlimited proliferative capacity, holding the promise to become an unprecedented future cell replacement strategy for degenerative disorders (1).

Reproductive medicine has long had the reputation of being an “ethics-free zone” because the transfer of embryonic tissue is generally autologous. Since the first derivation of hESC lines in 1998 (1), the emerging field of cell therapy relies on the field of reproductive medicine to evolve. Numerous couples (2) who maintain their cryopreserved embryos in IVF centers are willing to donate these spare embryos to biomedical research (2, 3). Moreover, IVF clinics are willing to give away these thousands of frozen spare embryos to save time, space, and resources (2). Accordingly, the use of spare cryopreserved embryos from IVF cycles for hESC line derivation, research, and potential cell therapies is becoming a hot area in biomedical research.

From a regulatory framework standpoint, it is instrumental to implement international consensus standards to regulate the manipulation of human embryonic tissue in the context of [1] reproductive medicine and [2] therapeutic vs. basic hESC research (4).

In 2004 the European Parliament issued Directive 2004/23/EC (5). The purpose of the European Union (EU) Directive was twofold: to protect patients from receiving tissues for transplantation and to harmonize standards throughout the EU. This EU Directive was necessary owing to the variety of standards across Europe, the extensive export/import of certain tissues, and the need to increase the availability of donated tissues and avoid mistakes arising from different sample-coding systems across Europe. The Directive applies to most human tissues and cells, including reproductive cells, fetal tissues, and ESCs (5, 6). The quality standards in this EU Directive were relatively high, with grade A air quality being required in the IVF units and tissue banks. There is a view that IVF is practiced under suboptimal conditions, suggesting the necessity of enhancing quality regarding embryo manipulation by setting up good laboratory practices and quality air systems, such as good manufacturing practice (GMP) facilities, to reduce potential tissue contamination and improve pregnancy success rates. We believe that this is a bit visionary because contamination of human embryos in the IVF laboratory is basically negligible.

This EU Directive covers not only IVF clinics but also stem cell banks. In fact, the United Kingdom, Sweden, Spain, and the United States have recently set up stem cell banks to characterize, store, distribute, and derive hESC lines in GMP facilities for future clinical applications (2, 3, 7). The recovery of cryopreserved embryos, culture up to the blastocyst stage, and derivation to hESC lines is not trivial and requires the presence of a fully equipped embryology laboratory and a staff that is well trained in basic and applied embryology (7). Thus, worldwide stem cell banks and laboratories involved in hESC derivation and embryo manipulation are recruiting embryologists with expertise in IVF clinics to undertake such labor (2, 7).

Received February 26, 2008; revised May 9, 2008; accepted May 15, 2008.

J.L.C. has nothing to disclose. P.M. has nothing to disclose. Supported by the Consejería de Salud, Junta de Andalucía (grants reference 0029/2006 and 0030/2006), The International Jose Carreras Foundation Against Leukemia Award (EDThomas-05 to P.M.), and the Spanish Ministry of Health (FIS-PI070026 to P.M.).

Reprint requests: Pablo Menendez Ph.D., Parque Tecnológico de las Ciencias de la Salud, Centro de Investigación Biomédica, Andalusian Stem Cell Bank, Avenida del Conocimientos/n, 18100 Granada, Spain (FAX: 34-958-894-652; E-mail: pablo.menendez@juntadeandalucia.es).

In our experience, IVF embryologists with extensive experience in assisted reproduction who are switching their career focus to hESC research go through a legislative adaptation period. Unfortunately, IVF embryologists who are accustomed to working under a clinical environment lose their scientific motivation regarding hESC biology and cell therapy and are concerned about what they claim to be an extremely strict legislative framework to operate and carry out their work. Briefly, the clinical embryologists claim that they have been performing assisted reproduction without GMP facilities and with less-demanding regulations, while still being successful in the IVF procedure and the birth of healthy newborns. They consider that because of ethical gaps and regulatory inconsistencies, regulation of hESC research is often much more strict than for clinical reproductive medicine, possibly owing to political pressure.

The EU Directive 2004/23/EC has also been assessed by professionals involved in assisted reproduction owing to its highly demanding proposals and standards and because of several aspects related to the feasibility, effectiveness, and probable adverse impact of applying all the suggested laboratory practices in assisted reproductive units (6). Although IVF clinics may have practiced assisted reproduction under suboptimal conditions without apparent detriment, the use of embryonic tissue material in IVF clinics is usually autologous, and tissue transfers are often considered medical procedures. Because the recipient is receiving autologous material, the risk, if any, is being limited to that individual, unless sperm, oocytes, or embryos are donated to other infertile couples (Table 1) (8). These criticisms are in part pragmatic from a financial and political point of view. If these regulations were applied consistently many IVF units would cease to practice, being unable to meet all the strict requirements because the IVF cycles would be far more expensive. This scenario implies that many couples could not afford the treatment and would

choose to undergo IVF processes in public hospitals in countries with a free public health system, substantially increasing the waiting lists.

On the basis of the previous criticisms by IVF professionals (6), the EU amended the EU 2004/23/EC Directive by publishing the Commission Directive 2006/17/CE (9). In the Commission Directive 2006/17/CE the requirements and standards proposed are less stringent; there is, for instance, no longer a need to work under GMP conditions.

Our personal perspective, as stem cell researchers and clinicians, is that regardless of reproductive medicine, a different position should be adopted when dealing with stem cells derived from surplus human embryos (Table 1). Human ESCs are becoming a key biologic tool for potential cell replacement therapies but also for basic research, such as in human embryology, disease modeling, drug screening, and cancer research (1, 10). The European Directive does not cover biomedical research with human tissues and cells when used for applications that differ from potential clinical use in humans, such as basic research aimed at understanding mechanisms underlying stem cell pluripotency, stem cell-based drug screening studies, and the development of disease models. There is therefore an urgent need to establish oversight committees that should actively participate in developing responsive policies. Regardless of the standards regulating IVF procedures, a regulatory oversight scheme and international consensus standards should be set up for the emerging hESC field according to the endpoint use of the human embryonic tissue (Table 1). The lessons of amending/updating the EU Directive on the basis of criticisms from reproductive medicine and biomedical research professionals should be harnessed worldwide by policy makers (e.g., in the United States and Asia) to avoid policy inconsistencies and ethical gaps, which eventually lead to confusion and scientific delays.

TABLE 1

Proposal of a potential regulatory framework that distinguishes among reproductive medicine, basic hESC research, and clinically oriented hESC research.

Discipline	Research aim	Premises/centers	Endpoint use	Expected policy
Reproductive medicine	IVF	Public and private IVF clinics	Autologous transfer	As it is
hESC research	Gain basic knowledge	Academic laboratory	Basic research. No use in humans	Barely regulated
hESC research	Optimizing cell therapies	Hospital/university/private biotechnology company	Allogeneic transplant	Very strict regulation

Cortes. Reproductive medicine meets hESC research. Fertil Steril 2008.

For hESC research performed under the consideration of potential allogeneic clinical cell replacement therapies (clinical trials using hESC derivatives are being announced by biotechnology companies), the risk is for thousands of individuals who may be harnessing the potential clinical use of the hESC derivatives (8), indicating that safety and quality must be ensured before this treatment can truly benefit patients (Table 1). In fact, there are some issues (donor screening or assurance that basic research and clinical treatment never share the same premises) that should be prospectively analyzed before confirming whether the regulations can be applied to reproductive medicine, hESC research, or both. Although the number of hESCs has increased considerably in the past years, few have been fully characterized, and many hurdles still need to be overcome to ensure safety and efficacy (8, 10, 11); this will require further substantial investment and research. Stem cells have not yet been grown in the conditions that would be expected for any pharmaceutical product destined for use in humans. Even the embryos from which hESCs could be derived are still maintained *in vitro* in suboptimal culture conditions. The premature use of cell therapy could put many patients at risk of viral or prion diseases unless systems are in place for the appropriate selection and screening of donors and for quality assurance (12, 13). The premature application of gene therapy, the devastation caused by HIV transmission to hemophiliacs, the clinical and legal problems resulting from hepatitis C infection through blood transfusion, and the crisis caused by bovine spongiform encephalopathy should all be learning opportunities (8). Thus, it becomes very important to make the IVF embryologist involved in hESC research realize that they are acting as transplantation tissue donors and that they naturally need to operate under very different rules than they previously did in the IVF clinic.

In contrast, although some degree of oversight and regulation is still needed, such stringent rules do not need to be implemented when hESCs are to be used for hESC-based approved basic research projects (Table 1), otherwise they will [1] discourage scientists by making research difficult, [2] prevent the scientific community from speeding up understanding and knowledge, and [3] make hESC research unaffordable for many basic laboratories.

Acknowledgments: The authors thank Ms. Christina Pantoll for assisting with the English language and manuscript editing.

Jose Luis Cortes

Pablo Menendez, Ph.D.

Centro de Investigación Biomédica, Andalusian Stem Cell Bank/University of Granada, Granada, Spain

REFERENCES

1. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998;282:1145–7.
2. Cortes JL, Antinolo G, Martínez L, Cobo F, Zapata A, Menendez P. Spanish Stem Cell Bank interviews examine the interest of couples in donating surplus human IVF embryos for stem cell research. *Cell Stem Cell* 2007;1:17–20.
3. Jones DG, Towns CR. Navigating the quagmire: the regulation of human embryonic stem cell research. *Hum Reprod* 2006;21:1113–6.
4. Stephenson EL, Braude P, Mason C. International community consensus standard for reporting derivation of human embryonic stem cell lines. *Regen Med* 2007;2:349–62.
5. European Union. Directive 2004/23/EC of European Parliament and of the Council of 31 March 2004. On setting standards of quality and safety for the donation, procurement, testing, processing, preservation, storage, and distribution of human tissues and cells. *Official J Eur Union* 2004;L102:48–58.
6. Mortimer D. A critical assessment of the impact of the European Union Tissues and Cells Directive (2004) on laboratory practices in assisted conception. *Reprod Biomed Online* 2005;11:162–76.
7. Cortes JL, Cobo F, Bamie AH, Catalina P, Cabrera C, Nieto A, et al. Role of the embryology laboratory in the human embryonic stem cell line derivation process. *Cytotechnology* 2006;52:1–11.
8. Braude P, Minger S, Warwick R. Stem cell therapy: hope or hype? *BMJ* 2005;331:1159–60.
9. European Union. European Union Directive 2006/17/CE, implementing Directive 2004/23/EC of the European Parliament and the Council as regards technical requirements for the donation, testing and procurement of human tissues and cells. *Official J Eur Union* 2006;L38:40–52.
10. Bueno C, Montes R, García-Castro J, Greaves M, Menendez P. Human embryonic stem cells: a potential system for modelling infant leukaemia harbouring the MLL-AP4 fusion gene. *Drug Discovery Today: Disease Models* 2008;4:53–60.
11. Cortes JL, Sanchez L, Catalina P, Cobo F, Bueno C, Martínez A, et al. Whole blastocyst culture followed by laser drilling technology enhances the efficiency of ICM isolation and ESC derivation from good and poor-quality mouse embryos: new insights for derivation of new hESC lines. *Stem Cells Dev* 2008;17:255–68.
12. Cobo F, Stacey GN, Hunt C, Cabrera C, Nieto A, Montes R, et al. Microbiological control in stem cell banks: approaches to standardisation. *Appl Microbiol Biotechnol* 2005;68:456–66.
13. Cobo F, Navarro J, Herrera N, Vivo A, Porcel D, Jurado M, et al. Electron microscopy reveals the presence of viruses in mouse embryonic fibroblasts but neither in human embryonic fibroblasts nor in human mesenchymal cells used for hESC maintenance: toward an implementation of microbiological quality assurance program in stem cell banks. *Cloning Stem Cells* 2008;10:65–74.

IV.4.- Evaluation of the laser technique method to isolate the inner cell mass of murine blastocysts. JL Cortes, F Cobo, P Catalina, A Nieto, C Cabrera, R Montes, A Concha, P Menéndez. **Biotechnology & Applied Biochemistry**, 2007. 46:205-209

INTRODUCCIÓN: Los estudios básicos del desarrollo embrionario, modelos de enfermedad y generación de animales transgénicos, se basan en el uso de ESCs. La derivación de estas ESCs puede realizarse mediante distintos métodos, no estando totalmente claro aún cual es la metodología más eficaz y “limpia”. Una de las etapas más críticas en este proceso es el aislamiento de la ICM de los blastocistos, donde se encuentran las células troncales que darán lugar a la futura línea celular.

En el presente estudio pretendimos optimizar la derivación de ESCs mediante una técnica basada en el disparo con láser, utilizando un modelo animal de ratón, como antesala a la derivación de hESCs. La baja disponibilidad de embriones humanos sobrantes de ciclos de FIV hace que estos embriones humanos tengan un gran valor científico limitando la optimización inicial de nuevas técnicas. Por ello, antes de ensayar la metodología basada en la destrucción del trofoectodermo con técnicas de disparo con láser en embriones humanos, apostamos por optimizar esta metodología con embriones de ratón.

OBJETIVO: En este estudio hemos comparado dos métodos de aislamiento de la ICM en blastocistos murinos (Cultivo directo del blastocisto vs. Disparo con láser), dependiendo de la calidad de los mismos, cultivadas además en dos superficies de crecimiento diferentes (MEFs vs. Gelatina).

MATERIAL Y MÉTODOS: Se han incluido 31 embriones murinos, tanto en estadio celular como en estadio de mórula. En todos los casos, estos embriones se dejaron evolucionar hasta el estadio de blastocisto expandido. Los blastocistos expandidos son generalmente divididos dentro de tres categorías, atendiendo al aspecto morfológico del trofoectodermo y de la ICM:

- i) Blastocistos de buena calidad con una ICM bastante distinguible y con

tamaño adecuado, ii) Blastocistos con una pequeña pero distinguible ICM, y iii) Blastocistos de mala calidad con una ICM poco definida. Una vez evaluada la calidad blastocitaria, todos los blastocistos fueron tratados con Ácido Tyrode, durante un minuto, para conseguir la completa disolución de la zona pelúcida. Se utilizaron dos métodos de aislamiento de la ICM: a) El método de cultivo directo del blastocisto se utilizó cuando la ICM era pequeña o poco visible, de tal manera que tanto las células del trofoectodermo como las de la ICM tienden a adherirse al soporte utilizado. Utilizando este método y transcurridos varios días, la ICM es localizada y aislada de las células trofoblásticas; b) Para blastocistos de buena calidad con una ICM bastante distinguible y con un tamaño adecuado, se utilizó un nuevo método de derivación y aislamiento de la ICM. Éste, consiste en el empleo de un disector láser (OCTAX Eyeware™) que va cuidadosamente destruyendo las células del trofoectodermo, de tal forma que sólo se adhieren al soporte utilizado las células de la ICM ya aislada. Para realizar el estudio se han utilizado en igual proporción dos soportes celulares diferentes; una monocapa de MEFs y una capa de gelatina de piel porcina Tipo A.

RESULTADOS: De los 31 blastocistos obtenidos, diez tuvieron una ICM poco o nada visible, por lo que se intentó el aislamiento de la ICM mediante el método de cultivo directo. De estos 10, seis se cultivaron sobre una monocapa de MEFs y cuatro sobre gelatina. Por otro lado, en 21 blastocistos con buena calidad se intentó la derivación de la ICM utilizando el método de disección láser. Diez blastocistos se cultivaron sobre monocapa de MEFs y 11 se cultivaron sobre gelatina.

Los resultados de este estudio están representados en la Tabla 5:

Tabla 5: Resultados del estudio donde se comparan los métodos de aislamiento de la ICM respecto a la adhesión de la ICM y el posterior establecimiento de mESCs utilizando dos superficies de crecimiento diferentes.

Método aislamiento ICM	MEFs		Gelatina	
	Adhesión/aislamiento ICM	Establecimiento mESC	Adhesión/aislamiento ICM	Establecimiento mESC
Cultivo directo (blastocistos mala calidad)	4/6 (66.7%)	2/6 (33.3%)	3/4 (75.0%)	0/4 (0%)
Láser (blastocistos buena calidad)	8/10 (80.0%)	1/10 (10.0%)	3/11 (27.3%)	1/11 (9.1%)

CONCLUSIONES: En base a los resultados obtenidos observamos que el método de cultivo directo del blastocisto es globalmente más efectivo respecto al aislamiento de la ICM que el empleo del disector láser (70% vs. 52%; $p < 0.05$), independientemente de la superficie de crecimiento utilizada. Teniendo en cuenta que hemos utilizado el láser para los blastocistos de buena calidad, y que la única desventaja del cultivo directo de blastocistos es que las células del trofoectodermo escondan las de la ICM, debemos de seguir perfeccionando la técnica de empleo de láser, donde las células del trofoectodermo son destruidas para que no interfieran en la adhesión de la ICM a la superficie de crecimiento utilizada.

Por otra parte, con independencia del método de aislamiento de la ICM utilizado, obtenemos mejores tasas de adhesión, por parte de los blastocistos, empleando como soporte la monocapa de MEFs frente a la utilización de una capa de gelatina (40% vs. 30% en cultivo directo; 38% vs. 14% con láser). Si nuestro propósito es no tener que depender del cultivo e inactivación de MEFs para realizar nuestros cultivos de células troncales, es necesario investigar más en profundidad el uso de matrices extracelulares como soporte. Además, este estudio debe completarse evaluando los datos de seguimiento de dichas colonias primarias, así como el posterior establecimiento de líneas de mESCs.

Evaluation of a laser technique to isolate the inner cell mass of murine blastocysts

José Luis Cortés^{*1}, Fernando Cobo^{*}, Purificación Catalina^{*}, Ana Nieto^{*}, Carmen Cabrera^{*}, Rosa Montes^{*}, Ángel Concha[†] and Pablo Menendez^{*1}

^{*}Andalusian Stem Cell Bank (Spanish Central Node), Centro de Investigaciones Biomédicas, Parque Tecnológico de las Ciencias de la Salud, Avenida del Conocimiento s/n, Granada, Spain, and [†]Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Universitario Virgen de la Nieves, Avda Fuerzas Armadas 2, Granada, Spain

hESCs (human embryonic stem cells) are pluripotent cells derived from the ICM (inner cell mass) of blastocysts that can be used to derive several kinds of cells of the human body for the treatment of some previously untreated diseases. In considering the future use of hESCs in regenerative medicine and cell-therapy programmes, several research centres have begun projects involving the derivation of hESC lines using spare human embryos from IVF (*in vitro* fertilization) cycles. In some stem-cell banks, such as ours, the law also permits us to obtain these cell lines. The low availability of spare IVF human embryos, and the low rate of success in the derivation of hESC lines, give these embryos a great research value that limits experiments with new techniques. The use of murine embryos would be a good model with which to do research to discover the best methodologies to use in order to derive new hESC lines. The aim of the present study was to evaluate a new method of isolation of the ICM and derivation of ESC lines in a murine blastocyst model using laser drilling to eliminate the trophectoderm cells and compare it with the usual control method consisting of culturing the whole murine blastocyst. We also tested the adhesion and growth of primary colonies of mESCs (murine ESCs) over two different growth surfaces, namely an MEF (inactive murine fibroblastic feeder layer) or gelatin-coated dishes, in order to achieve the best culture conditions for future derivation of human stem-cell lines for application in human transplantation.

Introduction

Transplantation of cells of human origin is a sector of medicine which shows increasing opportunities for the treatment of diseases, some of which, until now, have been incurable. Thus, with the introduction of regenerative medicine and cell therapy programmes using human stem cells, a great number of research centres have attempted to derive cell lines using hESCs (human embryonic stem cells) [1]. Moreover, in some

stem-cell banks, such as ours (the Andalusian Stem Cell Bank – Spanish Central Node), the law also permits us to obtain these cell lines [2]. As these cells may be able to provide an unlimited cell source for transplantation therapies, it is necessary to establish reliable methods for their handling and manipulation. One of the most critical stages in this process is the isolation of the ICM (inner cell mass) of the blastocysts, where these pluripotent cells can be found.

The low availability of spare IVF (*in vitro* fertilization) human embryos, and the low rate of success in the derivation of hESC lines, give these embryos a great research value and limit the experiments with new techniques. Thus the use of murine models [3,4] in our centre permits us to do research about the best methodologies to use, although there is a need to establish the differences between both the human and the murine blastocysts.

The ICM could usually be separated and isolated from the trophectoderm using immunosurgery [5], with mechanical processes [6], with whole-embryo culture of the blastocysts and partial-embryo culture methods [7] or single blastomeres [8].

Laser technology is commonly used for assisted hatching with some applications. One of them consists of making the embryonic membrane weaker to make the exit of the future blastocyst easier and so favour the derivation [9]. Another consists of blastomere biopsy for preimplantational diagnosis [10].

Until now, this new laser-drilling method has been suggested to derive stem-cell lines by one group, although without presenting any conclusive results [11]. A recent paper [12] reported preliminary results for a murine model using this method; subsequent culture of ESCs in a serum/cell-free culture system was achieved.

Key words: embryonic stem cell (ESC), inner cell mass (ICM), *in vitro* fertilization (IVF), laser drill, murine blastocyst, whole-embryo culture. **Abbreviations used:** hESC, human embryonic stem cell; ICM, inner cell mass; IVF, *in vitro* fertilization; MEF, inactive murine fibroblastic feeder layer; mESC, murine ESC.

¹ To whom correspondence should be addressed (email josel.cortes.sspa@juntadeandalucia.es or pablo.menendez@juntadeandalucia.es).

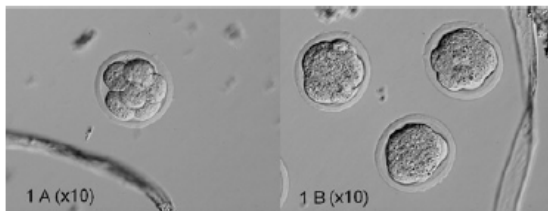


Figure 1 Examples of murine embryos obtained in the present study

The Figure shows murine embryos at the cell (A) and compacting (B) stages.

In our opinion, some notion of which of these methods are the most efficient for the isolation of ICM is very important for future research in this field. Accordingly we have compared the ICM isolation method using laser drilling in a murine blastocyst model with one of the most commonly used methods (until now, the whole-embryo culture [7]), and we have carried out the culture on two different growth surfaces, namely MEF (inactive murine fibroblastic feeder layer) [13] and gelatin-coated dishes [14].

Materials and methods

Female 3–6-month-old mice (C57BL/CBA) were killed by cervical dislocation on day 4.5 of pregnancy (midday of the day that the copulation plug is found was deemed to be day 0.5). The oviducts were dissected and placed in warm (37 °C) PBS (Gibco–Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.). Then the oviducts were manipulated in a plastic Petri dish with warm Mops-buffered medium (G-MOPS™; Vitrolife Sweden AB, Kungsbacka, Sweden) the oviduct being removed by first cutting through the top of the uterus, leaving a small portion of it attached to the oviduct, and then dissecting the oviduct away from the ovary. This must be done very carefully to ensure that the opening of the oviduct remains intact, since it is extremely difficult to insert a needle once it has been damaged. This is done with the use of a binocular dissecting microscope (SZ-61; Olympus Spain, Barcelona, Spain) and an inverted microscope with Hoffman optics (X1-71; Olympus

Spain) to determine the embryo stage and the quality. The embryos found were placed in warm G-MOPS™ until the culture in sequential medium G-2 V.III (Vitrolife) to achieve the blastocyst stage. These embryos were cultured in an incubator at 37 °C and under a CO₂/air (6:94) atmosphere.

Quality of murine blastocysts

We included 31 murine embryos, both in the cell stage (days 2–3 after fertilization) (Figure 1A), as well as in the compacting stage (day 4 after fertilization) (Figure 1B). In all the cases these embryos were cultured until the development of expanded blastocysts (day 5–6 after fertilization) (Figure 2). In IVF programmes, blastocyst quality is one of the most important factors in the determination of both implantation and pregnancy. However, experiments that assess the developmental potential of embryos that are days behind normal development and which have very few ICM cells, are not feasible, and so these embryos are discarded. Mitalipova et al. [15] reported the establishment of four hESC lines from 19 such embryos. However, we have considered the blastocyst quality for this study in order to select the most effective derivation method. Both human and murine blastocysts are morphologically very similar, except in size, so, we adopted the human blastocysts grading system developed by the Cornell University (Ithaca, NY, U.S.A.) programme [16]. The expanded murine blastocysts have been classified into three categories according to the morphological aspect of the ICM, such as expanded human blastocysts (Figures 2A, 2B and 2C):

- Good quality blastocysts with large and distinct ICM
- Blastocysts with distinct but smaller ICM
- Bad-quality blastocysts with indistinguishable ICM

After the assessment of the blastocyst quality, all the murine blastocysts were treated with acid Tyrode's solution (Irvine Scientific, Santa Ana, CA, U.S.A.) for no more than 1 min to assure the complete dissolution of zona pellucida (Figure 3A).

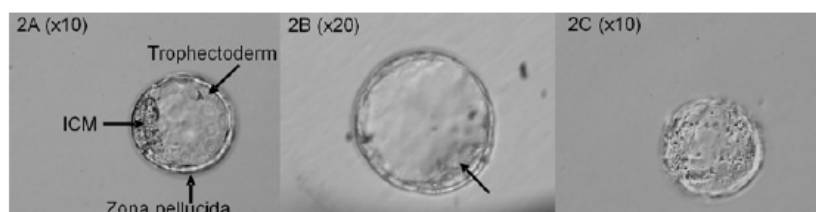


Figure 2 Classification of expanded murine blastocysts

(A) Good quality murine blastocyst with large and distinct ICM; (B) murine blastocyst with distinct, but smaller, ICM. The arrow indicates the ICM region; (C) bad-quality murine blastocyst with indistinguishable ICM.

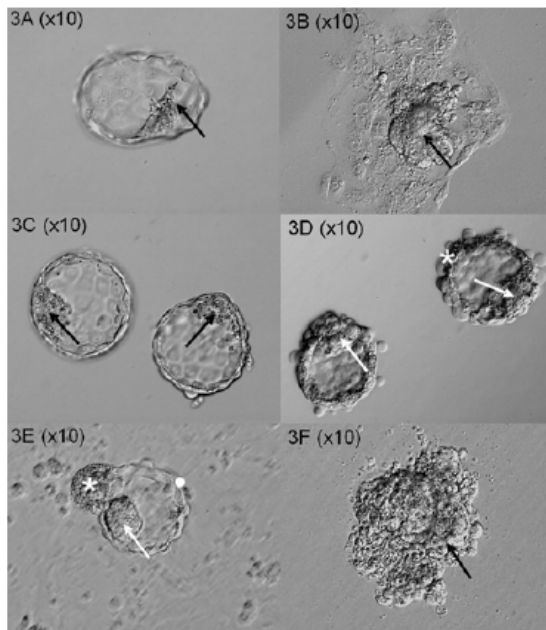


Figure 3 Examples of murine blastocysts included in the study

Methods of ICM isolation were evaluated. (A) Expanded murine blastocyst treated with Tyrode Acid to assure the complete dissolution of zona pellucida. The black arrow indicates the ICM region; (B) primary colony of a murine blastocyst adhered to gelatin-coated dishes using the whole-embryo culture method. The black arrow indicates the ICM region; (C) good-quality murine blastocyst with large and distinct ICM before laser drilling. The black arrows indicate the ICM regions; (D) murine embryos treated with the laser drilling. The white arrows indicate the ICM regions. The white asterisk indicates the lysed trophoblast; (E) murine blastocyst treated with the laser at day +1 formed a pseudo-trophoblast with a few cells not destroyed by the laser because they were near the ICM; cells were cultured over a fibroblastic feeder layer; the white arrow indicates the ICM region; the white asterisk indicates the lysed trophoblast and the white closed circle indicates the pseudo-trophoblast; (F) primary colony of a murine blastocyst adhered to gelatin-coated dishes using the laser drilling technique. The black arrow indicates the ICM region.

ESC medium

The ESC medium used consisted of Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco-Invitrogen), 20% (v/v) fetal-bovine serum (PAA, Colbe, Germany), 1% L-glutamine (Gibco-Invitrogen), 0.1 mM non-essential amino acids (Gibco-Invitrogen), supplemented with mouse leukaemia inhibitory factor; 2000 i.u./ml (Sigma-Aldrich), 0.1 mM 2-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich), 50 units/ml penicillin (PAA) and 50 µg/mg streptomycin (PAA).

ICM isolation methods

We used the whole-embryo culture method to isolate the ICM and to establish mESC (murine ESC) lines in cases where the blastocysts had a distinct, but smaller or indistinguishable, ICM, in such a way that the trophoblast cells and the ICM tend to adhere to the growth surface used.

Using this method and after 2 days had passed, the attachment of the whole embryo to the growth surface was confirmed and the old medium was replaced with fresh medium. The trophoblast layer began to expand on the third day of culturing. On day 6, the ICM-like cells formed a dome structure, surrounded by trophoblast (Figure 3B). At this point, the ICM was removed, after which it was transferred to a freshly prepared growth surface. The whole-embryo culture tends to manifest an abundance of both trophoblast and differentiated cells, and the isolation of mESC-like colonies from differentiated cells requires a great deal of care and caution. However, the poor quality of the blastocysts often results in failures in the attachment of the ICM to the dish, so this procedure runs a much greater risk of trophoblast overgrowth than other methods because the entire trophoblast is cultured along with the ICM.

However, with good quality blastocysts with a large and distinct ICM, we used the laser drill (Eyeware™; Octax, Herborn, Germany), which was connected to an inverted microscope (XI-71; Olympus) and processed by a computer program which permits data analysis. We did not use poor-quality blastocysts in this method for this study because we cannot shoot the ICM if we cannot see it. In our experiment, the murine blastocyst to be treated with laser drill was positioned at the centre of the field of view under low magnification; this was done either with an object guide which moves the Petri dish over the microscope table in an x-y direction or using a mechanical or motorized stage which brings the Petri dish and thereby the blastocyst into the desired position by moving the table. The blastocyst position was moved when necessary. Blastocysts can be secured by holding two pipettes with the ICM positioned at '9 o'clock' if desired [12]. The special gold-coloured and octagonally shaped Laser Shot™ laser objective was turned inwards. It was necessary to lower the objective revolver to prevent the objective from touching anything prior to turning it. After focusing on the trophoblast cells, the object had to be moved so that the part of the trophoblast to be treated was located at the cross-hair position displayed on the monitor as the impact location of the laser focus. Thus this new mechanical method destroyed the trophoblast cells by shooting the laser over them carefully without damaging the ICM (Figures 3C and 3D). The length of radiation time of the laser and the number of laser shots were controlled by the embryologist. So the ICM cells were the ones that achieved adhesion (Figure 3F).

Growth surfaces

Both types of blastocyst groups were cultured individually in plates using two different growth surfaces in equal proportions {MEF [13] and an extracellular growth surface using gelatin-coated dishes (Sigma-Aldrich) [14]} to compare the

Table 1 Number of blastocysts used in each derivation method over each growth surface

ICM isolation method	Number of blastocysts used	Murine feeder layer	Gelatin-coated dishes
Whole-embryo culture; bad-quality blastocysts	10/31 (32.2%)	6/10 (60.0%)	4/10 (40.0%)
Laser-drilling method; good quality blastocysts	21/31 (67.7%)	10/21 (47.6%)	11/21 (52.4%)

efficiency. Confluent active MEF were treated with 10 µg/ml of mitomycin C (Sigma–Aldrich) for 3 h. The monolayer was washed with PBS and incubated with 0.05% trypsin/0.53 mM EDTA solution for 2 min at 37 °C. When the cells detached from the flask surface, complete medium was added to inactivate the trypsin/EDTA solution. After centrifugation, the single-cell suspension of inactive MEF was resuspended in completed medium and plated in cell culture dishes of 3.5 cm pre-coated with 0.2% of gelatin (Sigma–Aldrich) to maintain the feeder attachment on the concentration necessary to obtain a confluent layer. Only 3.5-cm-diameter dishes precoated with 0.2% gelatin were used for the other surface test.

Results

Ten blastocysts out of the 31 obtained had a smaller, but distinct or indistinguishable, ICM (32.2%), so we tried ICM isolation by the whole-embryo culture method. Six out of ten were placed over an inactive MEF (60%) and four over gelatin-coated dishes (40%). By contrast, 21 blastocysts with good quality were derived using the laser drill (67.7%). Ten blastocysts were placed over an inactive MEF (47.6%) and 11 over gelatin (52.4%) (Table 1).

Using the whole-embryo culture we obtained adhesion and isolation of the ICM in four blastocysts over an inactive MEF (66.7%) and three over gelatin (75%). So the total adhesion/isolation rate was 70%. Using the laser-drilling method we obtained adhesion and isolation of the ICM in eight blastocysts over an inactive MEF (80%) and three

over gelatin (27.3%). So the total adhesion/isolation rate was 52.4% (Table 2).

We derived two lines which were morphologically similar to mESC lines using the whole-embryo culture method over MEF (33.3%) and none over the gelatin-coated dishes. One line which was morphologically similar to mESC line using the laser drill over MEF (10%) and one over gelatin (9.1%) (Table 2).

Discussion

According to the adhesion and isolation of the ICM, we observed that the whole-embryo culture method of the blastocysts is more effective than the laser method (70 versus 52.4%). Taking into account that we had used the laser drill for the good-quality blastocysts and that the concealment of the ICM by the trophectoderm cells is the only disadvantage of the whole-embryo culture method [6], we must continue to improve the laser-drill technique so that the trophectoderm cells are destroyed and do not interfere with ICM adhesion [12]. Curiously, the blastocysts treated with the laser at day +1 formed a pseudo-trophectoderm, with a few cells not destroyed by the laser because they were near the ICM (Figure 3E). These trophectoderm cells disappeared after repeated passages.

In addition, we think that murine blastocyst quality is important for selecting the most adequate derivation method for future application in the derivation of hESC lines [7].

On the other hand, regardless of the isolation method used, some groups have come to the general conclusion that cells grown on mouse feeder cells would not be appropriate for clinical applications, and this has led to significant efforts to grow ESC lines on human feeders [17], immortalized cells [18], feeder cell lines that have been derived from the original ESC themselves [19] and the culture on Matrigel™ [20]. We obtained better adhesion rates when we used the MEF instead of the gelatin growth surface using the laser drill (80 versus 27.3%). Using whole-embryo culture we obtained a better adhesion rate using gelatin, but with only a small

Table 2 Comparison of the methods to isolate ICM from murine blastocysts

ICM isolation method	Murine feeder layer		Gelatin-coated dishes		
	Adhesion/isolation ICM	Establishment mESC	Adhesion/isolation ICM	Establishment mESC	Total adhesion isolation rate
Whole-embryo culture; bad-quality blastocysts	4/6 (66.7%)*	2/6 (33.3%)	3/4 (75.0%)	0/4 (0%)	7/10 (70.0%)
Laser-drilling method; good-quality blastocysts	8/10 (80.0%)	1/10 (10.0%)	3/11 (27.3%)	1/11 (9.1%)	11/21 (52.4%)

*Owing to a limitation in the number of the murine embryos used in the present study, these percentages have to be considered as only very approximate.

difference with respect to the use of an inactive MEF (66.7 versus 75%). If our purpose is not to be dependent on the culture and the inactivation of murine fibroblasts to maintain our stem-cell cultures, we need to do more research on the use of extracellular growth surfaces using gelatin-coated dishes. Furthermore, the mouse feeder layers could present special risks of microbiological contamination in the culture of hESC lines (e.g. mycoplasma, bacteria, yeast and fungi) [21]. However, viral contamination of feeder cells is a common risk in all biotechnological products derived from cell lines, irrespective of the species of origin [22]. For future experiments, we want to carry out the culture of ESCs in a serum-free system in order to eliminate dependence on the culture and the inactivation of murine fibroblasts as well as the risk of contamination with animal pathogens [23].

Our study must be completed with the assessment of the following data concerning the establishment of the mESC line carrying out the ESC characterization, ESC gene expression, embryoid-body formation and determination of cellular differentiation [12]. Moreover, our study should adopt a randomized point-of-view.

The future direction of our group is research on the use of the laser drill for the whole-embryo culture method, using the laser drill in the destruction of the trophectoderm cells that adhere to the ICM before the first passage (results not shown). Finally, research and experiments with animal models [3,4] must form part of the tasks of research centres and stem-cell banks, because, in the future, this will help us find new strategies in human regenerative medicine and cell therapy.

Acknowledgments

We thank Ms Angela H. Barnie for the presubmission English revision of the manuscript. This work was funded by a grant (0030/2006) from the Fundacion Progres y Salud (Consejería de Salud, Junta de Andalucía). We also acknowledge the Servicio Andaluz de Salud (SAS) and the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Madrid, Spain, for its full support. We are also indebted to Gertrudis Ligeró and Laura Sanchez for their outstanding technical help.

References

- 1 Reubinoff, B. E., Pera, M. F., Fong, C. I., Trounson, A. and Bongso, A. (2000) *Nat. Biotechnol.* **18**, 399–404
- 2 Cortes Generales (2006) Ley Español 14/2006, de 26 de mayo. Sobre técnicas de reproducción humana asistida. *Boletín Oficial del Estado* **126**, 19947–19956
- 3 Evans, M. J. and Kaufman, M. H. (1981) *Nature* **292**, 154–156
- 4 Martin, G. R. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78**, 7634–7638
- 5 Solter, D. and Knowles, B. B. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **72**, 5099–5102
- 6 Bongso, A., Fong, C. Y., Ng, S. C. and Ratnam, S. (1994) *Hum. Reprod.* **9**, 2110–2117
- 7 Kim, H. S., Oh, S. K., Park, Y. B., Anh, H. J., Sung, K. C., Kang, M. J., Lee, L. A., Suh, C. S., Kim, S. H., Kim, D. and Moon, S. Y. (2005) *Stem Cells* **23**, 1228–1233
- 8 Chung, Y., Klimanskaya, I., Becker, S., Marh, J., Lu, S. J., Johnson, J., Meisner, L. and Lanza, R. (2006) *Nature* **439**, 216–219
- 9 Antinori, S., Selman, H. A., Caffa, B., Panci, C., Dani, G. L. and Versaci, C. (1996) *Hum. Reprod.* **11**, 2488–2492
- 10 Sermon, K., Van Steirteghem, A. and Liebaers, I. (2004) *Lancet* **363**, 1633–1641
- 11 Wang, W. H. and Sun, X. F. (2005) *Hum. Reprod.* **20**, 2987–2989
- 12 Tanaka, N., Takeuchi, T., Neri, Q. V., Sills, E. S. and Palermo, G. D. (2006) *J. Transl. Med.* **4**, 20
- 13 Nichols, J., Evans, E. P. and Smith, A. G. (1990) *Development* **110**, 1341–1348
- 14 Venien, A. and Leveux, D. (2005) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **39**, 418–424
- 15 Mitalipova, M., Calhoun, J., Shin, S., Winger, D., Schulz, T., Noggle, S., Venable, A., Lyons, I., Robins, A. and Stice, S. (2003) *Stem Cells* **21**, 521–526
- 16 Veeck, L. L. and Zaninovic, N. (2003) in *An Atlas of Human Blastocysts* (Veeck, L. L. and N. Zaninovic, N., eds.), pp. 99–137, The Parthenon Publishing Group, New York
- 17 Genbacev, O., Krtolica, A., Zdravkovic, T., Brunette, E., Powell, S., Nath, A., Caceres, E., McMaster, M., McDonagh, S., Li, Y. et al. (2005) *Fertil. Steril.* **83**, 1517–1529
- 18 Park, S. P., Lee, K. S., Ah Shin, H., Cho, H. Y., Chung, K. S., Kim, E. Y. and Lim, J. H. (2004) *Hum. Reprod.* **19**, 676–684
- 19 Stojkovic, P., Lako, M., Stewart, R., Przyborski, S., Armstrong, L., Evans, J., Murdoch, A., Strachan, T. and Stojkovic, M. (2005) *Stem Cells* **23**, 306–314
- 20 Amit, M., Margulets, V., Segev, H., Shakiri, K., Laevski, I., Coleman, R. and Itskovitz-Eldor, J. (2003) *Biol. Reprod.* **68**, 2150–2156
- 21 Stacey, G. N., Cobo, F., Nieto, A., Talavera, P., Healy, L. and Concha, A. (2006) *J. Biotechnol.* **125**, 583–588
- 22 Cobo, F., Talavera, P. and Concha, A. (2006) *Virology* **347**, 1–10
- 23 Ludwig, T. E., Levenstein, M. E., Jones, J. M., Berggren, W. T., Mitchen, E. R., Frane, J. L., Grandall, L. J., Daigh, C. A., Conard, K. R., Piekarczyk, M. S. et al. (2006) *Nat. Biotechnol.* **24**, 185–187

Received 28 June 2006/13 October 2006; accepted 25 October 2006
Published as Immediate Publication 25 October 2006, doi:10.1042/BA20060119

IV.5.- Whole-blastocyst culture followed by laser drilling technology enhances the efficiency of ICM isolation and ESC derivation from good and poor-quality mouse embryos: new insights in the derivation of hESC lines. JL Cortés, L Sánchez , P Catalina, F Cobo, C Bueno, A Martínez-Ramírez, A Barroso, C Cabrera, G Ligeró, R Montes, R Rubio, A Nieto, P Menéndez. *Stem Cells and Development*, 2008. 17:255-267

Esta parte del trabajo ha sido sometida a la siguiente patente internacional:

Inventores: Pablo Menéndez, José Luis Cortés, Fernando Cobo

Título: Procedimiento para el aislamiento de la masa celular interna en blastocistos de mamíferos

Nº solicitud de patente de invención: P200701625

Fecha prioridad: 1/06/2007

Entidad u organismo titular: Fundación Progreso y Salud

INTRODUCCIÓN: La optimización de los métodos de derivación de hESCs es un reto debido a que muchos laboratorios no tienen acceso a embriones humanos sobrantes. Además, los estudios de experimentación preliminar, realizados directamente sobre embriones humanos, implican un desperdicio de este preciado material biológico. Los métodos actuales para aislar la ICM están aún en discusión. La ICM es usualmente aislada utilizando una variedad de técnicas, que incluyen la inmunocirugía, los mecanismos mecánicos, y el cultivo directo del blastocisto. La tecnología láser es usada principalmente para reproducción asistida. Como se ha demostrado en el anterior artículo presentado en este trabajo doctoral, la técnica del láser ha sido utilizada para destruir la ICM de embriones murinos de buena calidad permitiendo el aislamiento de la ICM.

OBJETIVO: Nuestro objetivo ha sido desarrollar una nueva estrategia basada en la combinación de la técnica de cultivo directo del blastocisto, seguida de la destrucción de las células del trofoectodermo adyacentes a la ICM utilizando la tecnología láser, buscando mejorar la eficiencia tanto en el aislamiento de la ICM como en el establecimiento de las líneas celulares.

MATERIAL Y MÉTODOS: Un total de 130 blastocistos murinos han sido incluidos en este estudio, que fueron obtenidos en estadio de compactación o en estadio expandido. El método de aislamiento de la ICM se adecuó a la calidad de los blastocistos. Para este experimento utilizamos tres métodos de aislamiento de la ICM: i) el cultivo directo del blastocisto, ii) la tecnología láser, y iii) la combinación del cultivo directo del blastocisto seguida de tecnología láser. Además, para observar cual de las superficies de crecimiento facilita más la adhesión del blastocisto y su crecimiento primario respecto al establecimiento de la mESCs, las colonias primarias fueron cultivadas sobre MEFs o sobre placas con 0,2% de gelatina. Para demostrar el establecimiento de las mESCs realizamos estudios de inmunocitoquímica, diferenciación espontánea *in vitro* (formación cuerpos embrionarios) e *in vivo* (formación de tertomas), así como un análisis citogenético para estudiar si las mESCs sufrían algún tipo de alteración cromosómica tras un periodo de cultivo largo.

El diseño experimental se simplifica en la figura 26:

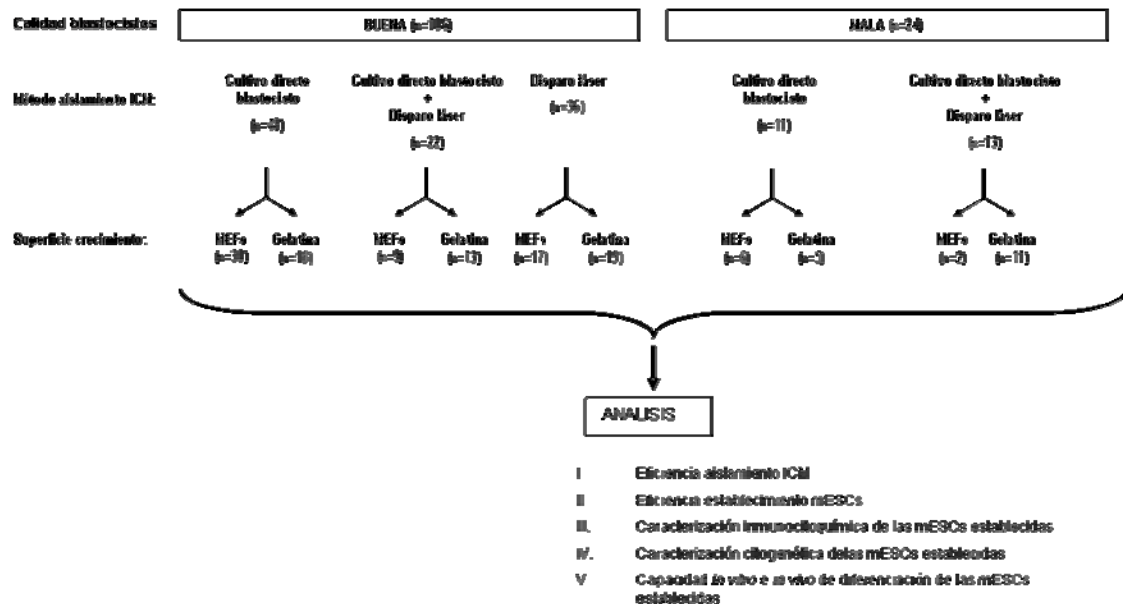


Figura 26: Diseño del experimento

RESULTADOS: El cultivo directo de los blastocistos seguido de un tratamiento con láser ofreció resultados más prometedores en el aislamiento de la ICM y posterior derivación de mESCs, que el cultivo directo o tecnología láser por separado. Además, respecto al método de aislamiento de la ICM, el proceso de

derivación de mESCs parece ser dependiente del uso de MEFs como superficie de crecimiento. Más importante aún es el hecho de que este nuevo método puede ser utilizado en blastocistos de mala calidad, ya que con este tipo de blastocistos no podemos utilizar el láser aisladamente como método de derivación de ESCs, debido a la imposibilidad de reconocer la ICM. Las mESCs derivadas con este nuevo método fueron completamente caracterizadas y mostraron una morfología típica de ESCs, un fenotipo indiferenciado (expresión de SSEA-1 y Oct-3/4) y fueron capaces de diferenciarse *in vitro* e *in vivo* en cada una de las tres capas germinales (ectodermo, mesodermo y endodermo). Finalmente, las líneas de ESCs establecidas utilizando esta tecnología no presentaron cambios en el cariotipo en los primeros pases de cultivo, aunque todas las líneas adquirieron aneuploidías en el cariotipo en cultivos más extendidos en el tiempo, sugiriendo que el método usado para la derivación de ESCs no parece influir en la aparición de aneuploidias en las ESCs tras cultivos sucesivos. Esto concuerda con múltiples estudios anteriores que sugieren la ganancia de alteraciones en el cariotipo de las mESCs tras cultivo *in vitro* a largo plazo.

CONCLUSIONES: Aquí demostramos que la eficiencia en la derivación de mESCs usando este nuevo método (Cultivo directo apoyado por disparo láser) es significativamente superior a la técnica de cultivo directo del blastocisto (42% vs. 23%) y la tecnología láser por separado (42% vs. 6%). Respecto al soporte utilizado, hemos obtenido mejores resultados utilizando MEFs que gelatina. Finalmente, esta nueva tecnología combinada puede abrir nuevas perspectivas para la mejora en el proceso de derivación de hESCs, donde la mayoría de los embriones utilizados son congelados, y por lo tanto poseen mala calidad.

Original Research Report

Whole-Blastocyst Culture Followed by Laser Drilling Technology Enhances the Efficiency of Inner Cell Mass Isolation and Embryonic Stem Cell Derivation from Good- and Poor-Quality Mouse Embryos: New Insights for Derivation of Human Embryonic Stem Cell Lines

J.L. CORTES,¹ L. SÁNCHEZ,¹ P. CATALINA,¹ F. COBO,¹ C. BUENO,¹
A. MARTÍNEZ-RAMÍREZ,² A. BARROSO,¹ C. CABRERA,¹ G. LIGERO,¹
R. MONTES,¹ R. RUBIO,¹ A. NIETO,¹ and P. MENENDEZ¹

ABSTRACT

The optimization of human embryonic stem (hES) cell line derivation methods is challenging because many worldwide laboratories have neither access to spare human embryos nor ethical approval for using supernumerary human embryos for hES cell derivation purposes. Additionally, studies performed directly on human embryos imply a waste of precious human biological material. In this study, we developed a new strategy based on the combination of whole-blastocyst culture followed by laser drilling destruction of the trophoectoderm for improving the efficiency of inner cell mass (ICM) isolation and ES cell derivation using murine embryos. Embryos were divided into good- and poor-quality embryos. We demonstrate that the efficiency of both ICM isolation and ES cell derivation using this strategy is significantly superior to whole-blastocyst culture or laser drilling technology itself. Regardless of the ICM isolation method, the ES cell establishment depends on a feeder cell growth surface. Importantly, this combined methodology can be successfully applied to poor-quality blastocysts that otherwise would not be suitable for laser drilling itself nor immunosurgery in an attempt to derive ES cell lines due to the inability to distinguish the ICM. The ES cell lines derived by this combined method were characterized and shown to maintain a typical morphology, undifferentiated phenotype, and *in vitro* and *in vivo* three germ layer differentiation potential. Finally, all ES cell lines established using either technology acquired an aneuploid karyotype after extended culture periods, suggesting that the method used for ES cell derivation does not seem to influence the karyotype of the ES cells after extended culture. This methodology may open up new avenues for further improvements for the derivation of hES cells, the majority of which are derived from frozen, poor-quality human embryos.

INTRODUCTION

EMBRYONIC STEM (ES) CELL LINES were first generated in 1981 from mouse blastocysts [1,2]. They are endowed with two unique properties that distinguish them

from all other organ-specific stem cells identified thus far. First, they self-renew continuously and can be maintained and expanded for extended periods of time while maintaining their undifferentiated status. Second, they are pluripotent, capable of differentiating into every cell type

¹Spanish Stem Cell Bank (Andalusian Branch), University of Granada, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Parque Tecnológico de la Salud, Avda del Conocimiento s/n, Granada, Spain.

²Cytogenetics Unit, M.D. Anderson Hospital, Madrid, Spain.

in the body [3,4]. The first human (h) ES cell lines were derived in 1998 from the inner cell mass (ICM) of donated, preimplantation embryos [5,6] and were also endowed with these biological properties of self-renewal and pluripotency [7–20]. Several laboratories have since reported the derivation of additional hES cell lines from preimplantation embryos, using either mouse or human feeders (for review, see ref. 21). Human ES cells are expected to open up new avenues in regenerative medicine by permitting the *in vitro* generation of transplantable cells to be used in future cell replacement therapies, but it is also anticipated that they will become a promising system to study stages of early human development that are inaccessible *in vivo* [3,22–29]. hES cell research represents a nascent area of investigation, and, therefore, many fundamental questions regarding the cellular and molecular mechanisms controlling pluripotency must be addressed and more efficient ES cell derivation methods still need to be developed.

The blastocyst quality and the ICM isolation method used are the two main factors dictating either ES cell derivation failure or success. Regarding blastocyst quality, human blastocysts available for ES cell derivation are of poorer quality than their mouse counterparts. This is owing to: (1) in many countries human embryos are frozen at the time of hES cell derivation because of ethical constraints [30] whereas mouse blastocysts are always used fresh, and (2) in countries allowing the use of fresh embryos for hES cell derivation the best-quality embryos are transferred into the woman's uterus leaving the poor-quality leftover embryos for hES cell derivation. This explains not only the extremely low hES cell derivation success rates [31] but also implies that in many countries (i.e., United States and many European countries) surplus poor-quality fresh human embryos have to be either frozen or directly discarded without even being used for ES cell derivation [30].

The current methods to isolate the ICM are still controversial. The ICM is usually isolated from the expanded blastocysts using a variety of techniques, including immunosurgery [32], mechanical processes [33], and whole-blastocyst culture methods [34]. Alternatively, ES cells were established from single blastomeres obtained from cell-stage embryos [35,36]. These ICM isolation methods are associated with some challenges, including the use of xeno-components, which may prevent the use of hES cell derivatives in potential future therapeutic applications, and the low ES cell establishment efficiency [32].

Culture of ES cells has been associated with long-term karyotypic changes [37], although it remains to be elucidated whether the ES cell derivation process itself or the culture conditions used might be responsible for this loss of genetic stability. Clearly, further studies on blastocyst quality, ICM isolation methods, and subsequent ES cell

derivation and genomic stability are urgently required for hES cell research to meet its expectations.

Ideally, the optimization of new ES cell derivation methods should be done using human embryos as starting material. However, this represents a scientific and logistic challenge because: (1) many laboratories have no access to spare human embryos from *in vitro* fertilization (IVF) cycles and (2) even if the embryos were available for laboratories linked to IVF clinics, the experimental optimization on human embryos would imply a great waste of precious human biological material.

The laser drilling technology is commonly used for assisted reproduction [38–40]. This laser technology also facilitates the somatic cell nuclear transfer, by speeding up the process of enucleation to a matter of seconds, without eliciting damage to the egg [41]. Very recently, we and others have harnessed this laser drilling technology to destroy the trophoectoderm of good-quality expanded murine blastocysts allowing for ICM isolation and murine (m) ES cell derivation [42,43]. Importantly, however, it needs to be stressed that the use of laser drill technology to shoot and break down the trophoectoderm requires the use of good-quality expanded blastocysts with large and clearly distinguishable ICM, otherwise there is no way the embryologist can precisely identify and distinguish the ICM from the trophoectoderm cells, making the laser-shooting process inaccurate and random [42,43].

Here, we have developed a two-step ES cell derivation method based on the combination of whole-blastocyst culture followed by laser drilling destruction of the trophoectoderm cells. We demonstrate that the efficiency of ICM isolation and ES cell derivation using this strategy is significantly superior to both whole-blastocyst culture and laser drilling technology itself. Regardless of the ICM isolation method employed, the ES cell establishment seems to be dependent on the use of a feeder cell layer as growth surface. Most importantly, this combined whole-blastocyst culture followed by laser drilling technology can be successfully applied to poor-quality blastocysts that otherwise would not have even been used by alternative methods for ES cell line derivation due to the inability to distinguish the ICM. The ES cell lines derived by this combined method were fully characterized and shown to maintain an undifferentiated state and three germ layer differentiation potential. Finally, ES cell lines established using either methodology acquired an abnormal aneuploid karyotype after extended culture, suggesting that the method used for ES cell derivation does not seem to make the ES cell lines more vulnerable to genetic instability [44–46]. We envision this two-step ES cell derivation strategy will open up new avenues to further improve the derivation of hES cells, which are commonly derived from frozen, poor-quality human embryos.

MATERIALS AND METHODS

Blastocyst recovery

Blastocysts were flushed from oviducts of 3- 6-month-old female mice (C57BL/CBA) ($n = 43$) that were sacrificed by cervical dislocation on day 4.5 of pregnancy. The oviducts were dissected and placed in prewarmed phosphate-buffered saline (PBS; Gibco-Invitrogen, CA) and then were carefully manipulated into a plastic Petri dish with warm G-MOPS (Vitrolife, Sweden) as previously described [43]. Briefly, the oviducts were removed by first cutting through the top of the uterus, leaving a small portion of the uterus attached to the oviduct and the oviduct eventually dissected away from the ovary as previously described [43].

Blastocyst quality assessment

A total of 130 murine blastocysts were included in the present study. They were harvested either as a compacting blastocyst (Fig. 1A) or as an expanded blastocyst (Fig. 1B). Compacting blastocysts were cultured until they achieved the expanded blastocyst stage (Fig. 1B). To identify the most effective ICM isolation and ES cell derivation method, the blastocyst quality was taken into account. Owing to the similar morphology between human and murine blastocysts, the human blastocyst grading system developed by the Cornell University (New York, NY) program was adopted [47]. In our mES cell derivation process, blastocysts were classified as good- or poor-quality blastocysts: good blastocysts had large and clearly distinguishable ICMs (Fig. 1C). Poor blastocysts were classified as having distinguishable but smaller ICMs (Fig. 1D) and those with indistinguishable ICMs (Fig. 1E).

ICM isolation methods

The following three different experimental approaches were used for ICM isolation and further ES cell line derivation. Figure 2 depicts our experimental design to enhance the efficiency of ICM isolation and ES cell derivation.

Whole-blastocyst culture. The whole-blastocyst culture method was used regardless of the quality of the blastocysts as previously described [34,43] (Fig. 2). Briefly, the embryo was cultured in such a way that the trophoectoderm cells and the ICM adhered to either mouse embryonic fibroblasts (MEFs) (Fig. 3A) or gelatin (Fig. 3B). Two days later, the attachment of the blastocyst was confirmed and the medium replaced by fresh prewarmed medium. By day 3 of culture, the trophoectoderm outgrowth was clearly visible (Fig. 3A,B), providing a support for the ICM to grow and form a dome-like structure. At this time, the ICM was carefully plucked and transferred to a freshly prepared growth surface [43].

The whole-blastocyst culture method has the risk of trophoectoderm overgrowth because the entire trophoectoderm is cultured along with the ICM, preventing the embryologist from accessing the ICM in poor-quality blastocysts.

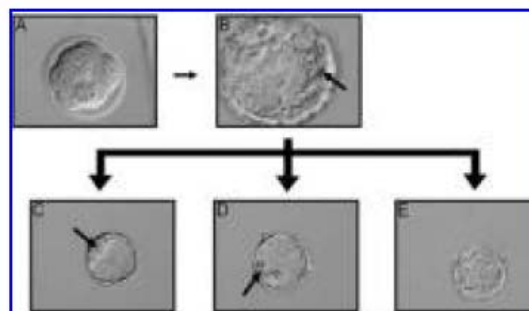


FIG. 1. Representative pictures depicting the quality classification of murine blastocysts obtained in this study. (A) Embryo in compacting blastocyst stage. (B) Embryo in expanded blastocyst stage. (C) Good-quality expanded blastocyst with large and clearly distinguishable ICM. (D) Poor expanded blastocyst with distinguishable but small ICM. (E) Poor blastocyst with indistinguishable ICM. The black arrows indicate the ICM region.

Laser drill technology. The laser drill technology was first reported from the Palermo Laboratory at Cornell University [42] and very recently reproduced in our laboratory [43]. The laser (OCTAX Eyeware™, Germany) is connected to an inverted microscope (XI-71, Olympus) and processed by computer software that permits data analysis. The rationale of using laser drill technology is to laser-shoot the unwanted trophoectoderm cells so as to remove them. The laser drilling technology may be used by itself only when good-quality expanded blastocysts are available. Unfortunately, however, the laser drilling technology itself is not feasible for poor-quality blastocysts because the ICM is not distinguishable and therefore can not be identified by the embryologist.

As previously described [42], expanded blastocysts are secured by holding two pipettes with the ICM positioned at 9 o'clock [42]. The length of laser exposure and the number of laser shots are controlled by the embryologist and may vary slightly among embryos. This laser drilling method, allows the ICM to adhere to the growth surface while removing the trophoectoderm cells (Fig. 3C-E).

Whole-blastocyst culture followed by laser drill technology. In an attempt to improve the methodology to isolate the ICM and to establish ES cell lines from poor-quality expanded blastocysts, we have developed a two-step method based on the whole-blastocyst culture followed by laser drilling. Murine expanded blastocysts were treated with Tyrode's acid (Irvine Scientific, CA) for no more than 1 min, to assure the complete dissolution of zona pellucida, in such a way that the trophoectoderm cells and the ICM adhere to the growth surface (Fig. 3F). Two days later, the attachment of the whole embryo was confirmed and the medium replaced by fresh prewarmed medium. By day 3 of culture the trophoectoderm, cells began to expand leaving the ICM accessible and forming a dome-like structure (Fig. 3F). At this point, we used the laser to shoot the trophoectoderm cells that surround the ICM, leaving the area near the ICM free of

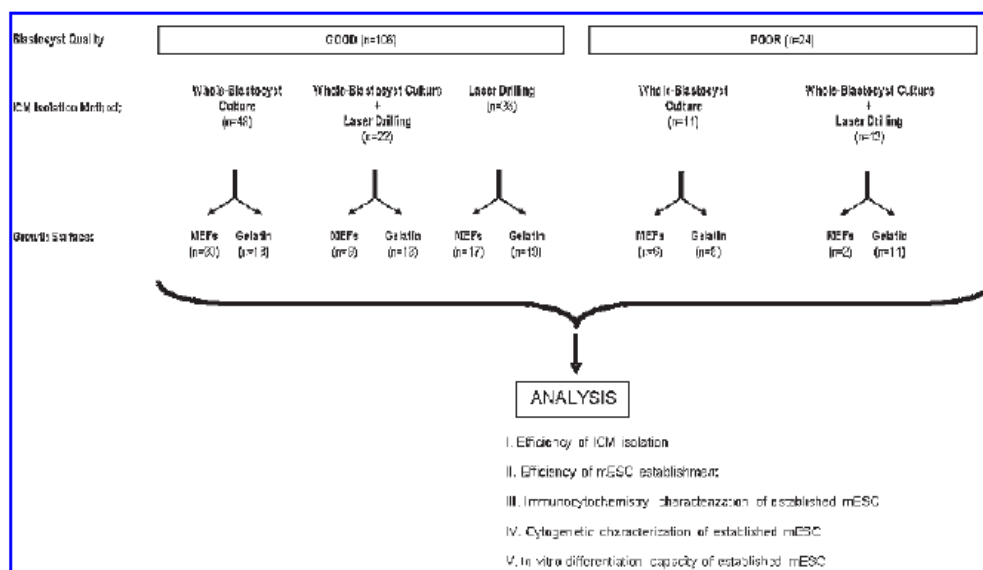


FIG. 2. Experimental design for the optimization of the efficiency of ES cell derivation based on the impact of blastocyst quality, ICM isolation method, and growth surface. A total of 130 murine expanded blastocysts were used in the present study. Blastocysts were classified as good-quality blastocysts ($n = 106$) or poor-quality blastocysts ($n = 24$). Good-quality blastocysts had large and clearly distinguishable ICMs whereas poor-quality blastocysts had distinguishable but small ICMs or indistinguishable ICMs. Good-quality blastocysts were subdivided into three groups to isolate the ICM and derive mES cell lines based on three different ICM isolation methods: (1) whole-blastocyst culture ($n = 48$) [42]; (2) laser drilling ($n = 36$) [41]; and (3) a new strategy combining whole-blastocyst culture and laser drilling technology ($n = 22$). Poor-quality blastocysts, however, were subdivided into two groups: (1) whole-blastocyst culture ($n = 11$) [42] and (2) whole-blastocyst culture followed by laser drilling ($n = 13$). It should be noted that the laser drill technology alone could never be applied to poor-quality blastocysts because the ICM is not distinguishable and therefore it can not be identified by the embryologist. Isolated ICMs were cultured either on MEFs or gelatin-coated plates to ascertain which of these growth surfaces best supports the expansion of the ICMs and subsequent establishment of mES cell lines. The efficiency of ICM isolation and mES cell establishment were analyzed under each experimental condition. In addition, established mES cell lines were characterized by immunocytochemistry, cytogenetic analysis, and their in vitro differentiation potential into the three germ layers (ectoderm, mesoderm, and endoderm).

trophoectoderm cells (Fig. 3G) and reducing the risk of dragging the trophoectoderm cells when the ICM was plucked and transferred to a freshly prepared growth surface (Fig. 3F–H).

Embryonic outgrowth culture

Embryonic outgrowths were cultured either on MEFs or in gelatin-coated plates in medium consisting of Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM; Gibco-Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with 20% fetal bovine serum (FBS; PAA, Colbe, Germany), 1% L-glutamine (Gibco), 0.1 mM nonessential amino acids (Gibco-Invitrogen), mouse leukemia inhibitory factor (LIF, 2,000 IU/ml; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 0.1 mM β -mercaptoethanol (Sigma-Aldrich), and 50 U/ml penicillin and 50 μ g/ml streptomycin (PAA).

Growth surfaces

To determine the extent to which the growth surface facilitates the embryo attachment and early growth versus ES cell

establishment and maintenance, the embryonic outgrowths were cultured individually either on MEFs [48] or in 0.2% gelatin-coated dishes (Sigma Aldrich) [49], as previously described [43].

Immunocytochemistry characterization of established mES cells

Established mES cells were characterized by indirect immunocytochemistry using antibodies against stage-specific embryonic antigen-1 (SSEA-1; Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, IA) and Oct-3/4 (Santa Cruz Biotechnology, CA). Briefly, mES cell colonies were cultured in chamber slides coated with gelatin. Cells were fixed in 4% of paraformaldehyde for 20 min followed by 30 min incubation in 10% normal goat serum in PBS. For Oct-3/4 immunostaining, cells are then permeabilized with Triton X-100 (Sigma). Colonies were incubated with primary antibodies for 1 h at room temperature. Conjugated secondary antibodies were used for 30 min at room temperature as follows: fluorescein isothiocyanate

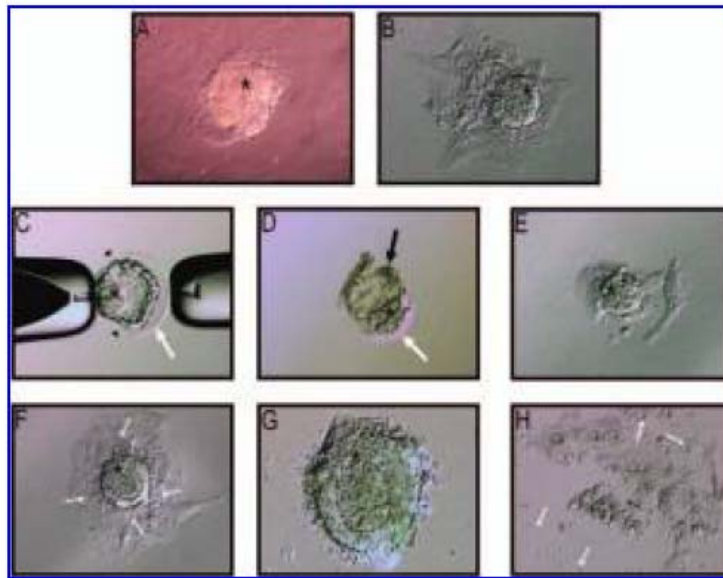


FIG. 3. Representative pictures showing the assessment of ICM isolation methods compared in the present study. (A and B) Isolation of the ICM by whole-blastocyst culture method alone. (A) Outgrowth of a blastocyst adhered to MEFs 5 days after whole-blastocyst culture. (B) Outgrowth of a blastocyst adhered to gelatin 5 days after whole-blastocyst culture. Please note the outgrowth of the trophoectoderm in gelatin. (C–E) Isolation of the ICM by laser drilling technology itself. (C) Blastocyst secured by two holding pipettes with the ICM being released by laser destruction of the trophoectoderm and zona pellucida. The black arrows represent the laser shots. (D) Blastocyst shown in C right after trophoectoderm breakdown by laser shot. The black arrow indicates the laser-lysed trophoectoderm. (E) Outgrowth of the same blastocyst 2 days

after direct laser drilling. (F and G) Isolation of the ICM by whole-blastocyst culture and subsequent laser drilling of the trophoectoderm. (F) Outgrowth of a blastocyst 5 days after whole-blastocyst culture. (G) Clean ICM free of trophoectoderm cells after laser shots. (H) Residual trophoectoderm after laser drilling. The asterisks represent the ICMs. The wide white arrows denote the embryo zona pellucida. The fine white arrows show examples of the exact laser shots.

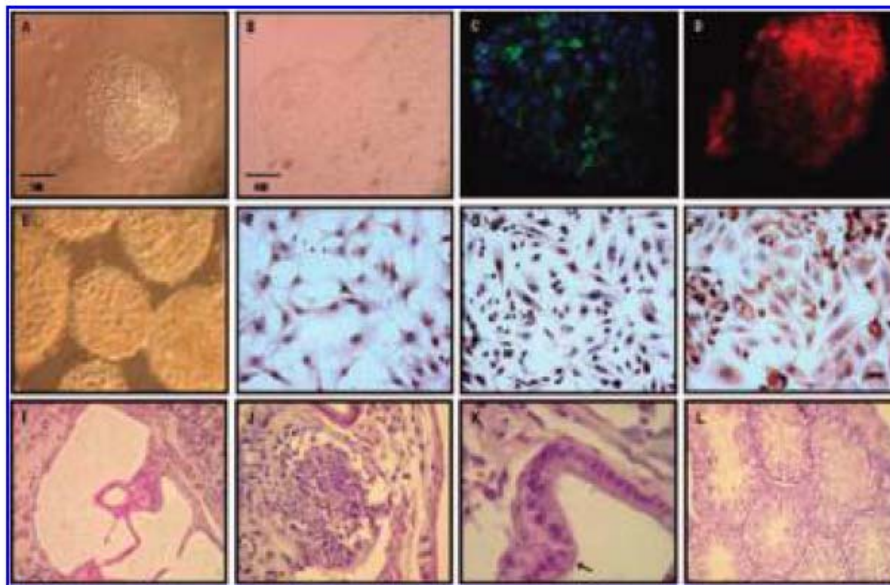


FIG. 4. ES cells derived by whole-blastocyst culture plus laser drilling technology show a typical ES cell morphology, express undifferentiated markers and retain in vitro and in vivo three germ layer differentiation potential. (A) Typical morphology of an ES cell line growing on MEFs established by whole-blastocyst culture and subsequent laser drilling of the trophoectoderm. Magnification, 10 \times . (B) ES cell colony established by whole-blastocyst culture followed by laser drilling of the trophoectoderm. Magnification, 40 \times . (C) Expression of SSEA-1 (green). Nuclei counterstaining with DAPI (blue). (D) Expression of Oct-3/4 (red). (E) Representative pictures of EBs. (F) Expression of α -fetoprotein (endoderm). (G) Expression of smooth muscle actin (mesoderm). Black arrows depict actin-positive cells. (H) Expression of nestin (ectoderm). (I–K) Sections from a 10-week teratoma formed by mES cells derived with the newly developed technique: (I) representative image of cystic epithelium (ectoderm); (J) representative image of glomerular-like structure (mesoderm); (K) representative image of ciliated epithelium (endoderm, black arrow indicates the ciliae within the epithelia lumen). (L) Representative image of a control testicle non-injected with mES cells showing normal seminiferous tubules.

(FITC)-conjugated anti-mouse immunoglobulin M (IgM) for detecting SSEA-1 and anti-mouse IgG for Oct-3/4 (Jackson Laboratories Inc). The slides were mounted in Vectashield containing DAPI. For negative control staining, the primary antibodies were replaced by PBS.

Embryoid body formation and differentiation analysis

Near-confluent mES cells were treated with 0.05% trypsin for 5 min at 37°C, transferred (2×10^2 cells/cm²) to nonadherent plates and allowed to differentiate spontaneously by embryoid body (EB) formation in DMEM supplemented with 20% FBS, 1% L-glutamine, 0.1 mM nonessential amino acids, and 0.1 mM β -mercaptoethanol but without LIF, with medium changes every 2–3 days. After 21 days in differentiation medium, the EBs were transferred to tissue-treated plates where they grew and gave rise to a confluent monolayer. Differentiation into three germ layers was determined by immunocytochemistry. EB cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min. Then, cells were incubated (1 h at room temperature) with primary antibodies for α -fetoprotein (Santa Cruz Biotechnology), anti-nestin (Chemicon), and anti-actin (Chemicon). Slides were then incubated with a biotinylated secondary antibody (30 min at room temperature) and a streptavidin peroxidase complex (30 min at room temperature) (Vector Laboratories Inc). The immunostaining was shown using diaminobenzidine and counterstained with Hematoxylin.

Teratoma formation assays

Animal protocols were approved by the Institute's Council On Animal Care. In vivo pluripotency was tested as previously described [15]. In brief, exponentially growing mES cells were harvested from the culture plate. mES cells were implanted beneath the testicular capsule of young (6-week) nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency (NOD/SCID) mice. Teratoma growth was determined weekly by palpation, and the mice were sacrificed (cervical dislocation) 9–11 weeks after implantation. The teratoma was fixed, and sections were stained with Hematoxylin & Eosin. The presence of tissue components of all three embryonic germ cell layers was shown, as analyzed from the stained sections.

Cytogenetic analysis

Conventional karyotyping analysis was performed between passages (p12–p35) after establishment of the new ES cell lines (44,45,50). Thirty metaphase spreads per mES cell line were analyzed (44,45). The metasytem software (Izasa, Barcelona, Spain) was used for karyotyping analysis.

Statistical analysis

To explore the significance in the differences found between groups, the Pearson chi-square test and Yates correlation were used. All analyses were done with the Statgraphic program. Differences were considered significant when *p* values were less than 0.05.

RESULTS

Experimental strategy for the development of an approach combining whole-blastocyst culture followed by laser drilling technology considering the blastocyst quality

Our Spanish Stem Cell Bank is developing new methods to enhance the efficiency of hES cell line derivation for future applications in basic biology and cell replacement therapies. The optimization of new ES cell derivation methods using human embryos would be ideal but it is a scientific and logistic challenge because: (1) many laboratories have no access to spare human embryos from IVF cycles and (2) even if the embryos were available to laboratories linked to IVF clinics, the experimental optimization on human embryos would imply a great loss of precious human material.

To the best of our knowledge, the blastocyst quality is rarely taken into account in a prospective manner before making a decision about the ES cell derivation method to be used [34]. Accordingly, we have used 130 murine embryos to develop a new technique based on whole-blastocyst culture followed by laser shooting of the trophoectoderm cells. A total of 106 out of the 130 embryos were good-quality expanded blastocysts and 24 out of 130 blastocysts were poor-quality expanded blastocysts (Fig. 1). On the basis of this blastocyst quality distribution, we designed the experimental strategy illustrated in Fig. 2 to determine whether our proposed two-step method combining whole-blastocyst culture and laser drilling enhances the efficiency of ICM isolation/ES cell establishment as compared to the whole-blastocyst culture [34,43] and the laser drilling itself [42,43] and whether it may be successfully applied to poor-quality blastocysts that otherwise would not have even been employed by laser drilling technology itself because the ICM is not distinguishable for the embryologist (Figs. 1 and 2). ICM outgrowths were allowed to expand either over MEFs or gelatin to ascertain which growth surface best facilitates the embryo attachment and ES cell establishment and determine the potential interference between the ICM isolation method, growth surface, and blastocyst quality for ES cell derivation. Finally, established ES cell lines were fully characterized by morphology, immunocytochemistry, cytogenetic analysis, and in vitro and in vivo differentiation potential.

Whole-blastocyst culture followed by laser drilling enhances the efficiency of ICM isolation regardless of the blastocyst quality and growth surface

Using the whole-blastocyst method, the ICM isolation efficiency was not affected by the growth surface used

lines when the whole-blastocyst culture followed by laser drilling strategy was employed. In contrast, only 16% (two-fold decrease; $p = 0.04$) and 6% (six-fold decrease; $p = 0.0001$) of the isolated ICMs expanded and gave rise to ES cell lines using the whole-blastocyst culture itself or the laser drilling technology alone, respectively (Table 2). Importantly, an almost two-fold increase in the efficiency of ES cell derivation was observed among the poor-quality embryos when the whole-blastocyst culture followed by laser drilling was used as compared with whole-blastocyst culture (50% vs. 30%; $p = 0.09$) (Table 2).

Despite proper embryo attachment and survival and ICM isolation using gelatin as a growth surface (Table 1), it is remarkable that no ES cell line could be established and/or maintained in such a feeder-free system, regardless of the blastocyst quality and/or the ICM isolation method used (Table 2). On gelatin, an extensive trophoectoderm overgrowth was always observed (Fig. 3A), preventing us from plucking a clean ICM without dragging trophoectoderm cells. Taken together, these data suggest that this new two-step combined method significantly enhances the efficiency of ES cell derivation and further maintenance regardless of the blastocyst quality but in a feeder-dependent manner.

In vitro and in vivo characterization of ES cell lines established using whole-blastocyst culture followed by laser drilling technology

To ensure that the new technology does not impair the intrinsic biological properties of the derived ES cell lines, we characterized the ES cell lines derived with this novel approach. The ES cell lines showed a typical ES cell morphology (Fig. 4A,B) and expressed the markers associated with an undifferentiated stage SSEA-1 (Fig. 4C) and Oct-3/4 (Fig. 4D).

To assess their *in vitro* differentiation potential, EBs (Fig. 4E) were formed and allowed to differentiate under conditions that promoted the specification into tissues representing the three germ layers. Accordingly, ES cell lines derived using whole-blastocyst culture helped by laser drilling showed homogeneous expression of the endoderm-associated pan-marker α -fetoprotein (Fig. 4F), the mesoderm marker actin (Fig. 4G), and the ectoderm marker nestin (Fig. 4H). Most importantly, the mES cell lines derived using this combined strategy retained *in vivo* developmental potential beyond 40 passages, as evidenced by the formation of teratomas containing tissues representing all three embryonic germ layers (Fig. 4I-L). Taken together, these data demonstrate that the newly developed methodology does not compromise the capacity of the derived ES cell lines to maintain an undifferentiated stage and three germ-layer developmental potential.

The method used for ES cell derivation does not seem to determine the karyotype of the ES cells after extended culture

Long-term culture of ES cells is associated with karyotypic changes, although it remains to be elucidated whether or not the ES cell derivation process itself is responsible for the loss of genetic stability. Here we analyzed whether the methodology used for ES cell derivation makes the ES cells more susceptible to genetic instability after long-term culture. Using conventional karyotyping, we assessed the frequency of aneuploidy of ES cell lines derived either using a whole-blastocyst culture or laser drilling technology.

ES cell lines established using either method were diploid (40 chromosomes) after short culture (passage 12) (Fig. 5A,B). However, regardless of the derivation method used, all ES cell lines established acquired an ab-

TABLE 2. EFFICIENCY OF ES CELL ESTABLISHMENT BASED ON BLASTOCYST QUALITY AND ICM ISOLATION METHOD USING EITHER MEFs OR GELATIN AS GROWTH SURFACE

Growth surface	ICM isolation method	Blastocyst quality	
		Good	Poor
MEFs	Whole blastocyst culture	16% ^a	30% ^c
	Laser drilling	6% ^b	N.F.
	Whole blastocyst culture helped by laser drilling	33%	50%
Gelatin	Whole blastocyst culture	0%	0%
	Laser drilling	0%	N.F.
	Whole blastocyst culture helped by laser drilling	0%	0%

MEFs, Inactive mouse embryonic fibroblasts; N.F., not feasible.

Statistical differences between:

^aWhole blastocyst culture helped by laser drilling vs. whole blastocyst culture for good-quality blastocysts, $p = 0.04$.

^bWhole blastocyst culture helped by laser drilling vs. laser drilling for good-quality blastocysts, $p = 0.00001$.

^cWhole blastocyst culture helped by laser drilling vs. whole blastocyst culture for poor-quality blastocysts, $p = 0.09$.

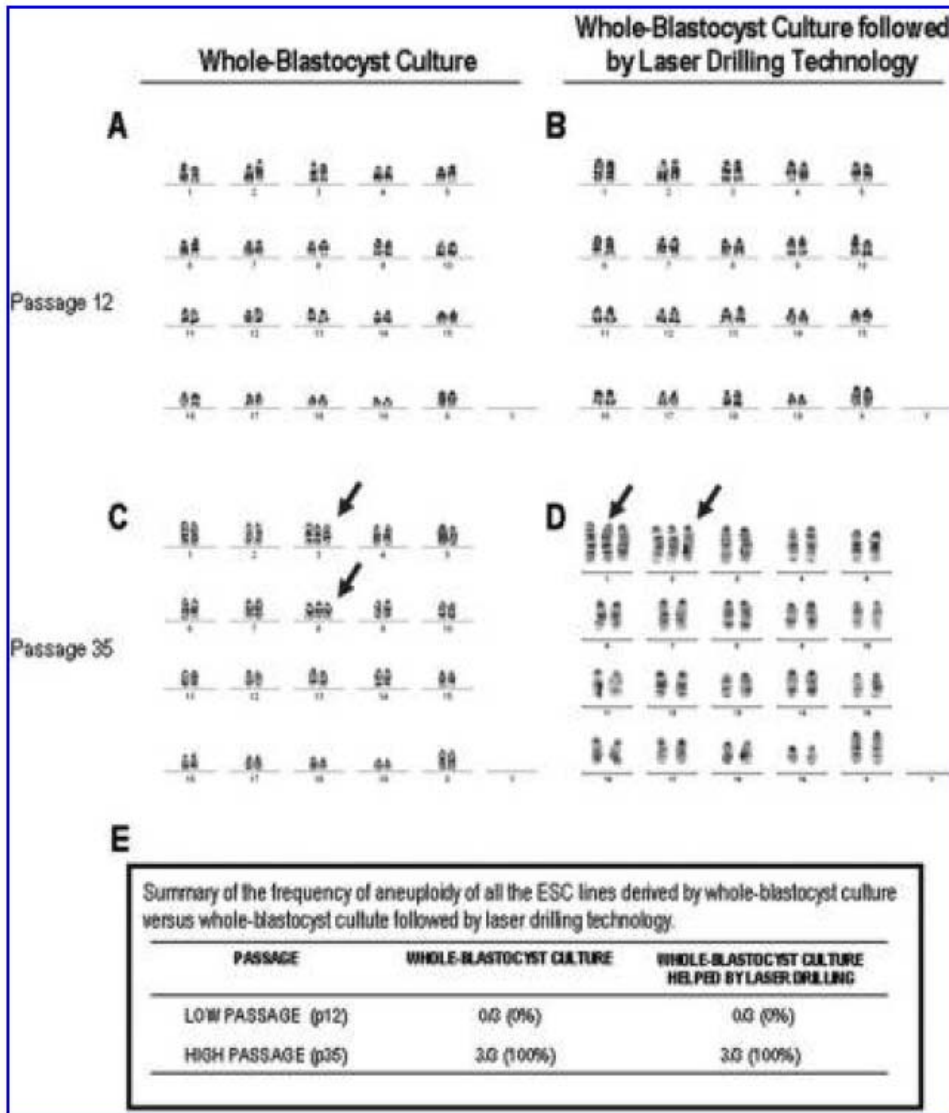


FIG. 5. Cytogenetic characterization of established ES cell lines. (A) Representative diploid karyotype of an ES cell line established by whole-blastocyst culture after 12 passages in in vitro culture. (B) Representative diploid karyotype of an ES cell line established by laser drilling technology after 12 passages in in vitro culture. (C) Representative aneuploid karyotype of an ES cell line established by whole-blastocyst culture after extended in vitro culture. (D) Representative aneuploid karyotype of an ES cell line established by laser drilling technology after extended in vitro culture. Arrows denote karyotypic changes (chromosome trisomies). (E) Summary of the frequency of aneuploidy of all the ES cell lines derived by whole-blastocyst culture versus whole-blastocyst culture followed by laser drilling technology.

normal aneuploid karyotype (>40 chromosomes) after extended culture (passage 35) (Fig. 5C–E). These data suggest that the method used for ES cell derivation does not seem to influence the likelihood of karyotypic changes, although further studies are still needed to determine whether and how the frequently observed karyotypic changes are due to the routine ES cell maintenance and culture adaptation.

DISCUSSION

Human ES cell research represents a nascent area of research, and, therefore, many fundamental questions regarding the cellular and molecular mechanisms controlling proliferation, self-renewal, differentiation, and cellular transformation must be addressed. The current methods for isolating the ICM are still controversial. The

ICM is usually isolated from the expanded blastocysts using a variety of techniques including immunosurgery [2], mechanical processes [33], and whole-blastocyst culture methods [34] that are associated with several drawbacks, including the use of xeno-components and low ES cell establishment efficiency.

Our Spanish Stem Cell Bank is undertaking efforts to optimize new methods to enhance the efficiency of hES cell line derivation. Ideally, the optimization of ES cell derivation methods should be carried out using human embryos. However, this represents a scientific and logistic challenge because: (1) many European countries as well as United States have strict regulations regarding embryos, either impeding or considerably delaying projects (i.e., generation of new hES cell lines by testing new methodologies), especially because prior to obtaining any ethical approval, researchers must go through the National Steering Committees for human embryo research and have in place informed consents from couples willing to donate their surplus frozen embryos to research [30]; (2) many laboratories have no access to spare human embryos from IVF clinics; and (3) the use of human embryos would imply a great loss of precious human material when first optimizing a new ES cell derivation strategy. Although there are differences between mouse and human embryogenesis, as with any scientific research using animal models, it is envisioned that experience gained from mES cell work will supply answers to challenges still vexing the hES cell field. Here, we have developed a new strategy based on the combination of whole-blastocyst culture followed by laser drilling destruction of the trophoectoderm for improving the efficiency of ICM isolation and ES cell derivation. We demonstrate that the efficiency of both ICM isolation and ES cell derivation using this new technology is significantly superior to both whole-blastocyst culture and laser drilling technology itself. It is worth mentioning that our mES cell derivation efficiency, although higher than the majority of the published studies, is not as high as the derivation efficiency recently reported by Bryja et al. [51,52]. Apart from the fact that both studies used distinct mice strains, this lower ES cell derivation efficiency might be due to the use of distinct experimental approaches. We focused on exploring a new physical laser-based method rather than assessing different media, sera, and cell culture conditions. Additionally, the main core of our work was to apply this laser-based technology to embryos regarding their quality. We wanted to optimize and compare our laser-based technology in good- versus poor-quality embryos to see whether this technique facilitates the derivation of ES cell lines from poor-quality embryos that otherwise would not be suitable, somehow preventing us from comparing our derivation efficiency with other groups. The ES cell lines derived by this two-step method were characterized and shown to maintain a typical ES cell morphology, an un-

differentiated phenotype, and being capable of *in vitro* and *in vivo* three germ layer differentiation potential.

Apart from the ICM isolation method, the blastocyst quality used represents a key factor influencing ES cell derivation success. As already mentioned, frozen surplus human blastocysts available for ES cell derivation are of much poorer quality than their mouse counterparts, explaining not only the extremely low hES cell derivation success rates [31] but also implying that in many countries surplus poor-quality fresh human embryos have to be either frozen or directly discarded without being even used for ES cell derivation [30]. Accordingly, to the best of our knowledge, the blastocyst quality is rarely taken into account in a prospective manner before making a decision about the ES cell derivation method to be used [34].

Regardless of the blastocyst quality and the ICM isolation method, the ES cell establishment and maintenance seems to be dependent on the use of a feeder cell layer as growth surface, as previously claimed [51,52]. The need of feeder cells for ES cell derivation has been previously documented. However, many ES cell lines may be maintained in the absence of any kind of feeders. In an attempt to gain insights into why ES cells cannot be established without MEFs [51,52] while being able to be maintained in feeder-free conditions, we intended to answer the question of whether the presence of MEFs is required for both initial embryo attachment, early growth and subsequent ES cell establishment or, in contrast, it is solely necessary for promoting ES cell colonies maintenance (survival and proliferation). Our data suggest that regardless of the technique employed for ES cell derivation and embryo quality the proportion of embryos that initially attached to the surface was 74% in MEFs versus 66% in gelatin, allowing for subsequent trophoectoderm removal, ICM isolation, and being capable of growing for up to 1–3 passages. On the basis of this lack of significant difference, we propose that gelatin might be a suitable surface for embryo initial attachment and early development. In contrast, however, after 1–3 passages, the ICMs kept developing in MEFs, eventually giving rise to ES cell colonies. However, in gelatin the ICMs stopped growing and started dying off after 1–3 passages. Taken together, it seems that supportive factors released by the feeders (MEFs) are required for promoting ES cell colony maintenance (survival and proliferation) rather than playing a key role in embryo attachment and early growth, which seems to occur in a surface-independent manner. This is further supported by our very recently published work [53] showing that maintenance of hES cell grown in feeder-free culture depends on a dynamic interplay between hES cells and autologously derived hES cell-derived fibroblast-like cells, highlighting the importance of establishing a regulatory stem cell niche *in vitro*.

WHOLE-EMBRYO CULTURE AND LASER DRILLING IMPROVES ES CELL DERIVATION

From our point of view, the major contribution of this study is the fact that this combined whole-blastocyst culture followed by laser drilling technology can be applied equally with success to both good- and poor-quality blastocysts that otherwise would not have even been used for laser drilling to derive ES cell lines due to the inability to distinguish the ICM. This technological advance should encourage new initiatives aimed at deriving hES cell lines from frozen poor-quality human embryos that are normally discarded or not considered for ES cell derivation.

Finally, long-term culture of mES cells [46] and hES cells [37,44,50,54,55] is associated with karyotypic changes, although it remains to be elucidated whether or not the ES cell derivation process itself influences such a loss of genetic stability. Here, we have analyzed whether whole-blastocyst culture or laser drilling technology makes the ES cells more vulnerable to karyotypic changes after long-term culture. All of our established ES cell lines, acquired an abnormal aneuploid karyotype after extended culture periods, regardless of the derivation method used, suggesting that the ES cell derivation method does not influence the karyotype of the ES cell lines. As it has been previously described by Jaenisch's group [44], trisomy 8 was a common chromosomal abnormality in all of our ES cell lines established by whole-embryo culture. However, ES cell lines derived using a laser shooting method showed gains of chromosomes 1 and 2, but they never showed trisomy of chromosome 8. Future studies may reveal the molecular and cellular mechanisms underlying the different karyotypic changes observed in ES cells obtained by different methodologies.

We speculate that rather than the ES cell derivation method, the routine culture conditions used for maintenance entails an ES cell culture adaptation and subsequent clonal evolution, which is likely to contribute to these karyotypic changes. However, we must be cautious and recognize that further genetic studies are needed to clarify whether the ES cell derivation process itself or the culture methods used for ES cell maintenance are responsible for the loss of genetic stability. This raises concerns because it would limit any potential therapeutic use. Besides the therapeutic potential of ES cells, loss of genetic stability could subsequently compromise the balance between self-renewal and differentiation, affecting cellular and molecular mechanisms such as cell cycle regulation, proliferation, and apoptosis. Increased knowledge about genetic integrity of ES cells will undoubtedly improve our understanding of the mechanisms for tumor progression, particularly for tumors occurring in early prenatal life [56; P. Catalina, submitted].

On the basis of these studies, our laboratory is actively working in conjunction with multiple IVF clinics that are assessing the willingness of couples who have undergone

an IVF process to donate, through an informed consent, surplus frozen human embryos to our Institution. We can then apply for ethical approval from the Embryo Research Steering National Committee to start prospectively experiments aimed at refining and applying this new technique for the derivation of hES cell lines from frozen poor-quality embryos that represent very valuable human material for research in cell therapy and basic biology. It should be recognized that although differences between mES cells and hES cells exist [57], caution is required when extrapolating findings between species.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Jose Luis García (Michigan University) and Dr. Javier García-Castro (BACM, Granada, Spain) for critically reading the manuscript. We are indebted to Dr. Antonia Collado for the outstanding technical support and advice on animal experimentation.

This work was funded by the Fundación Progreso y Salud (grants reference 0004/2005 to A.B., 0028/2006 & 0030/2006 to P.M., and 0029/2006 to C.B. and P.M), Consejería de Salud, Junta de Andalucía, Spain, and The International Jose Carreras Foundation against the Leukemia Award to P.M. and C.B (EDThomas-05) and the Spanish Ministry of Health (FIS-PI070026 to P.M.).

REFERENCES

1. Evans MJ and MH Kaufman. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292:154-156.
2. Martin GR. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:7634-7638.
3. Bradley A, P Hasty, A Davis and R Ramirez-Solis. (1992). Modifying the mouse: design and desire. *Biotechnology* 10:534-539.
4. Keller G. (2005). Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine. *Genes Dev* 19:1129-1155.
5. Reubinoff BE, MF Pera, CY Fong, A Trounson and A Bongso. (2000). Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nature Biotechnol* 18:399-404.
6. Thomson JA, J Itskovitz-Eldor, SS Shapiro, MA Waknitz, JJ Swiergiel, VS Marshall and JM Jones. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282:1145-1147.
7. Chadwick K, L Wang, L Li, P Menendez, B Murdoch, A Rouleau and M Bhatia. (2003). Cytokines and BMP-4 promote hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells. *Blood* 102:906-915.

8. Cerdan C, A Rouleau and M Bhatia. (2004). VEGF-A165 augments erythropoietic development from human embryonic stem cells. [Blood](#) 103:2504–2512.
9. Kehat I, D Kenyagin-Karsenti, M Snir, H Segev, M Amit, A Gepstein, E Livne, O Binah and J Itskovitz-Eldor, L. Gepstein. (2001). Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. [J Clin Invest](#) 108:407–414.
10. Levenberg S, JS Golub, M Amit, J Itskovitz-Eldo and R Langer. (2002). Endothelial cells derived from human embryonic stem cells. [Proc Natl Acad Sci USA](#) 99:4391–4396.
11. Lumelsky N, O Blondel, P Laeng, I Velasco, R Ravin and R McKay. (2001). Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. [Science](#) 292:1389–1394.
12. Nistor GI, MO Tatoi, N Haque, MK Carpenter and HS Keirstead. (2005). Human embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes in high purity and myelinate after spinal cord transplantation. [Glia](#) 49:385–396.
13. Xu C, S Police, N Rao and MK Carpenter. (2002). Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. [Circ Res](#) 91:501–508.
14. Sottile V, K Seuwen and M. Kneissel. (2004). Enhanced marrow adipogenesis and bone resorption in estrogen-deprived rats treated with the PPAR γ agonist BRL49653 (rosiglitazone). [Calcif Tissue Int](#) 7:329–337.
15. Wang L, L Li, P Menendez, C Cerdan and M Bhatia. (2005). Human embryonic stem cells maintained in the absence of mouse embryonic fibroblasts or conditioned media are capable of hematopoietic development. [Blood](#) 105:4598–4603.
16. Wang L, P Menendez, F Shojaei, L Li, F Mazurier, JE Dick, C Cerdan, K Levac and M Bhatia. (2005). Generation of hematopoietic repopulating cells from human embryonic stem cells independent of ectopic HoxB4 expression. [J Exp Med](#) 201:1603–1614.
17. Kaufman DS, ET Hanson, RL Lewis, R Auerbach and JA Thomson. (2001). Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells. [Proc Natl Acad Sci USA](#) 98:10716–10721.
18. Andrews PW. (1988). Human teratocarcinomas. [Biochim Biophys Acta](#) 948:17–36.
19. Iuchi S, S Dabelsteen, K Easley, JG Rheinwald and H Green. (2006). Immortalized keratinocyte lines derived from human embryonic stem cells. [Proc Natl Acad Sci USA](#) 103:1792–1797.
20. He JQ, Y Ma, Y Lee, JA Thomson and TJ Kamp. (2003). Human embryonic stem cells develop into multiple types of cardiac myocytes: action potential characterization. [Circ Res](#) 93:32–39.
21. Hoffman LM and MK Carpenter. (2005). Characterization and culture of human embryonic stem cells. [Nature Biotechnol](#) 23:699–708.
22. Lerou PH and GQ Daley. (2005). Therapeutic potential of embryonic stem cells. [Blood Rev](#) 19:321–331.
23. Menendez P, C Bueno, L Wang and M Bhatia. (2005). Human embryonic stem cells: Potential tool for achieving immunotolerance? [Stem Cell Rev](#) 1:151–158.
24. Hipp J and A Atala. (2004). Tissue engineering, stem cells, cloning, and parthenogenesis: new paradigms for therapy. [J Exp Clin Assist Reprod](#) 1:3–14.
25. Lebkowski JS, J Gold, C Xu, W Funk, CP Chiu and MK Carpenter. (2001). Human embryonic stem cells: culture, differentiation, and genetic modification for regenerative medicine applications. [Cancer J](#) 7:S83–S93.
26. Brivanlou AH, FH Gage, R Jaenisch, T Jessell, D Melton and J Rossant. (2003). Stem cells. Setting standards for human embryonic stem cells. [Science](#) 300:913–916.
27. Menendez P, C Bueno and L Wang. (2006). Human embryonic stem cells: a journey beyond cell replacement therapies. [Cytotherapy](#) 8:530–541.
28. Lensch MW and GQ Daley. (2006). Scientific and clinical opportunities for modeling blood disorders with embryonic stem cells. [Blood](#) 107:2605–2612.
29. Pera M and A Trounson. (2004). Human embryonic stem cells: prospects for development. [Development](#) 131:5515–5525.
30. Cortes JL, G Antiñolo, L Martinez, F Cobo, A. Barne, A Zapata and P Menendez. (2007). Spanish Stem Cell Bank interviews examine the interest of couples in donating surplus human IVF embryos for stem cell research. [Cell Stem Cell](#) 1:17–20.
31. Findikli N, NZ Candan and S Kahraman. (2006). Human embryonic stem cell culture: current limitations and novel strategies. [RBMon line](#) 13:581–590.
32. Solter D and BB Knowles. (1975). Immunology of mouse blastocysts. [Proc Natl Acad Sci USA](#) 72:5099–5102.
33. Bongso A, CY Fong, SC Ng and S Ratnam. (1994). Isolation and culture of inner cell mass cells from human blastocysts. [Hum Reprod](#) 9:2110–2117.
34. Kim HS, SK Oh, YB Park, HJ Ahn, KC Sung, MJ Kang, LA Lee, CS Suh, SH Kim, DW Kim and SY Moon. (2005). Methods for derivation of human embryonic stem cells. [Stem Cells](#) 23:1228–1233.
35. Chung Y, I Klimanskaya, S Becker, J Marh, SJ Lu, J Johnson, L. Meisner and R Lanza. (2006). Embryonic and extraembryonic stem cell lines derived from single mouse blastomeres. [Nature](#) 439:216–219.
36. Klimanskaya I, Y Chung, S Becker, SJ Lu, R Lanza. (2006). Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres. [Nature](#) 444:481–485.
37. Draper JS, K Smith, P Gokhale, HD Moore, E Maltby, J Johnson, L Meisner, TP Zwaka, JA Thomson and PW Andrews. (2004). Recurrent gain of chromosomes 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells. [Nature Biotech](#) 22:53–54.
38. Antinori S, HA Selman, B Caffa, C Panci, GL Dani and C Versaci. (1996). Zona opening of human embryos using non-contact UV laser for assisted hatching in patients with poor prognosis of pregnancy. [Hum Reprod](#) 11:2488–2492.
39. Sermon K, A Van Steirteghem and I Liebaers. (2004). Preimplantation genetic diagnosis. [Lancet](#) 363:1633–1641.
40. Mukaida T, C Oka, T Goto and K Takahashi. (2006). Artificial shrinkage of blastocoels using either a micro-needle or a laser pulse prior to the cooling steps of vitrification improves survival rate and pregnancy outcome of vitrified human blastocysts. [Hum Reprod](#) 21:3246–3252.

WHOLE-EMBRYO CULTURE AND LASER DRILLING IMPROVES ES CELL DERIVATION

41. Chen S, K Chao, C Chang, FJ Hsieh, HN Ho and YS Yang. (2004). Technical aspects of the piezo, laser-assisted, and conventional methods for nuclear transfer of mouse oocytes and their efficiency and efficacy: Piezo minimizes damage of the ooplasmic membrane at injection. *J Exp Zool* 301: 344–351.
42. Tanaka N, T Takeuchi, QV Neri, ES Sills and GD Palermo. (2006). Laser-assisted blastocyst dissection and subsequent cultivation of embryonic stem cells in a serum/cell free culture system: applications and preliminary results in a murine model. *J Transl Med* 4:20–32.
43. Cortes JL, F Cobo, P Catalina, A Nieto, C Cabrera, R Montes, A Concha and P Menendez. (2007). Evaluation of the laser technique method to isolate the inner cell mass of murine blastocysts. *Biotechnol. Appl Biochem* 46:205–209.
44. Menendez P, L Wang and M Bhatia. (2005). Genetic manipulation of human embryonic stem cells: a system to study early human development and potential therapeutic applications. *Curr Gene Ther* 5:375–385.
45. Catalina P, F Cobo, JL Cortes, AI Nieto, C Cabrera, R Montes, A Concha and P Menendez. (2007). Conventional and molecular cytogenetic diagnostic methods in stem cell research: a concise review. *Cell Biol Int* 31:861–869.
46. Liu X, H Wu, J Loring, S Hormuzdi, CM Disteche, P Bornstein and R Jaenisch. (1997). Trisomy eight in ES cells is a common potential problem in gene targeting and interferes with germ line transmission. *Dev Dyn* 209:85–91.
47. Veeck LL, N Zaninovic. (2003). *An Atlas of Human Blastocysts*. The Parthenon Publishing Group, New York.
48. Nichols J, EP Evans and AG Smith. (1990). Establishment of germ-line component embryonic stem (ES) cells using differentiation inhibiting activity. *Development* 110:1341–1348.
49. Greenlee AR, TA Kronenwetter-Koepel, SJ Kaiser and K Liu. (2005). Comparison of Matrigel and gelatine substrata for feeder-free culture of undifferentiated mouse embryonic stem cells for toxicity testing. *Toxicol In Vitro* 19:389–397.
50. Cowan CA, I Klimanskaya, J McMahon, J Atienza, J Witmyer, JP Zucker, S Wang, CC Morton, AP McMahon, D Powers and DA Melton. (2004). Derivation of embryonic stem cell lines from human blastocysts. *N Engl J Med* 351:1353–1356.
51. Bryja V, S Bonilla, L Cajanek, CL Parish, CM Schwartz, Y Luo, MS Rao, E Arenas. (2006). An efficient method for the derivation of mouse embryonic stem cells. *Stem Cells* 24:844–849.
52. Bryja V, S Bonilla and E Arenas. (2006). Derivation of mouse embryonic stem cells. *Nature Protoc* 1:2082–2087.
53. Bendall SC, MH Stewart, P Menendez, D George, K Vijayaragavan, T Werbowetski-Ogilvie, V Ramos-Mejia, A Rouleau, J Yang, M Bosse, G Lajoie and M Bhatia. (2007). IGF and FGF cooperatively establish the regulatory stem cell niche of pluripotent human cells in vitro. *Nature* 448: 1015–1021.
54. Inzunza J, S Sahlen, K Holmberg, AM Stromberg, H Teerijoki, E Blennow, O Hovatta and H Malmgren. (2004). Comparative genomic hybridization and karyotyping of human embryonic stem cells reveals the occurrence of an isodicentric X chromosome after long-term cultivation. *Mol Hum Reprod* 12:461–466.
55. Imreh MP, K Gertow, JCedervall, C Unger, K Holmberg, K Szoke, L Csoregh, G Fried, S Dilber, E Blennow and I Ahrlund-Richter. (2006). In vitro culture conditions favoring selection of chromosomal abnormalities in human ES cells. *J Cell Biochem* 99:508–516.
56. Bueno C, R Montes, J Garc'a-Castro and P Menendez (2007). Human Embryonic Stem Cells: A Potential System For Modelling Infant Leukemia Harboring MLL-AF4 fusion gene. *Drug Discovery Today*. DOI: 10.1016/j.ddtd.2007.10.004.
57. Ginis I, Y Luo, T Miura, S Thies, Brandenberger, S Gerecht-Nir, M Amit, A Hoke, MK Carpenter, J Itskovitz-Eldor and MS Rao. (2004). Differences between human and mouse embryonic stem cells. *Dev Biol* 269:360–380.

Address reprint requests to:

*Dr. Pablo Menendez
Andalusian Stem Cell Bank (BACM),
Instituto de Investigaciones Biomédicas
Parque Tecnológico de la Salud
Avda del Conocimiento s/n. Granada, Spain*

*E-mail: pablo.menendez@juntadeandalucia.es or
jose.l.cortes.sspa@juntadeandalucia.es*

Received for publication August 9, 2007; accepted after revision September 14, 2007.



MINISTERIO
DE INDUSTRIA, TURISMO
Y COMERCIO



Oficina Española
de Patentes y Marcas

JUAN G. MARTINEZ ARMESTO
(FUND. PROGRESO Y SALUD)
AV. AMERICO VESPUCCIO, 5 BLQ.2
41092 SEVILLA

13 de junio de 2007

Asunto: ENVIO DOCUMENTOS

Remito a Vd. los siguientes documentos correspondientes a su solicitud de patente de invención nº P200701625.

X- Copia de la Solicitud
- Justificante de pago

Atentamente le saluda

Fdo.: Ana López-Quiroga Valencia
Jefe Negociado de Depósito de
Inventiones

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS (S. B.)
Salida
Nº 200700012243 14/06/2007 10:17:54

Comunicación al Interesado: Los plazos de resolución se señalan en el justificante de presentación comenzarán a computarse desde la fecha de recepción que figura en la copia que se adjunta.

NOTA IMPORTANTE:

Indicación de prioridad: El código del país con el número de su solicitud de prioridad, que ha de utilizarse para la presentación de solicitudes en otros países en virtud del Convenio de París, es: **ES200701625**

C/Castellana, 75, 1 28071 MADRID. TEL.: 902157530, FAX 913495597



MINISTERIO DE INDUSTRIA, TURISMO Y COMERCIO



Oficina Española de Patentes y Marcas

INSTANCIA DE SOLICITUD

(1) MODALIDAD: <input checked="" type="checkbox"/> PATENTE DE INVENCION <input type="checkbox"/> MODELO DE UTILIDAD		(3) EXP. PRINCIPAL O DE ORIGEN: MODALIDAD N° SOLICITUD FECHA SOLICITUD	
(2) TIPO DE SOLICITUD <input type="checkbox"/> ADICIÓN A LA PATENTE <input type="checkbox"/> SOLICITUD DIVISIONAL <input type="checkbox"/> CAMBIO DE MODALIDAD <input type="checkbox"/> TRANSFORMACIÓN SOLICITUD PATENTE EUROPEA <input type="checkbox"/> PCT: ENTRADA FASE NACIONAL		(4) LUGAR DE PRESENTACIÓN: Agencia IDEA - CICE CÓDIGO: 41	
(5) SOLICITANTE (S): APELLIDOS O DENOMINACIÓN SOCIAL FUNDACION PROGRESO Y SALUD		NACIONALIDAD: Española CÓDIGO PAIS: ES CNIC/IF: G-41825811 CNAE: PYME:	
(6) DATOS DEL PRIMER SOLICITANTE DOMICILIO: Ayda. Américo Vespucio nº5, bloque 2, 2ª planta LOCALIDAD: Sevilla PROVINCIA: Sevilla PAIS RESIDENCIA: España NACIONALIDAD: España		TELEFONO: 955 04 04 50 FAX: 955 04 04 57 CORREO ELECTRONICO: CÓDIGO POSTAL: 41092 CÓDIGO PAIS: ES CÓDIGO PAIS: ES	
(7) INVENTOR (ES): 1) Menéndez Buñán 2) Cortés Romero 3) Cobo Martínez		(8) MODO DE OBTENCIÓN DEL DERECHO: <input checked="" type="checkbox"/> INVENC. LABORAL <input type="checkbox"/> CONTRATO <input type="checkbox"/> SUCESIÓN	
(10) TÍTULO DE LA INVENCION: Procedimiento para el aislamiento de la masa celular interna en blastocistos de mamíferos			
(11) EFECTUADO DEPÓSITO DE MATERIA BIOLÓGICA: <input type="checkbox"/> SI <input checked="" type="checkbox"/> NO			
(12) EXPOSICIONES OFICIALES: LUGAR FECHA FECHA			
(13) DECLARACIONES DE PRIORIDAD: PAIS DE ORIGEN CÓDIGO PAIS NÚMERO FECHA			
(14) EL SOLICITANTE SE ACOGE AL APLAZAMIENTO DE PAGO DE TASAS PREVISTO EN EL ART. 152. LEY 11/86 DE PATENTES <input type="checkbox"/>			
(15) AGENTE / REPRESENTANTE: NOMBRE Y DIRECCIÓN POSTAL COMPLETA. (SI AGENTE P.T. NOMBRE Y CÓDIGO) (RELÍNESE ÚNICAMENTE POR PROFESIONALES) Juan G. Martínez Armesto (Fundación Progreso y Salud); Av. Américo Vespucio nº 5; bloque 2; 41092 Sevilla			
(16) RELACIÓN DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN <input checked="" type="checkbox"/> DESCRIPCIÓN N° DE PÁGINAS: 23 <input checked="" type="checkbox"/> DOCUMENTO DE REPRESENTACIÓN <input checked="" type="checkbox"/> N° DE REINVENCIÓNES: 12 <input checked="" type="checkbox"/> JUSTIFICANTE DEL PAGO DE TASA DE SOLICITUD <input checked="" type="checkbox"/> DIBUJOS, N° DE PÁGINAS: 6 <input type="checkbox"/> HOJA DE INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA <input type="checkbox"/> LISTA DE SECUENCIAS N° DE PÁGINAS <input type="checkbox"/> PRUEBAS DE LOS DIBUJOS <input checked="" type="checkbox"/> RESUMEN <input type="checkbox"/> CUESTIONARIO DE PROSPECCIÓN <input type="checkbox"/> DOCUMENTO DE PRIORIDAD <input type="checkbox"/> OTROS: <input type="checkbox"/> TRADUCCIÓN DEL DOCUMENTO DE PRIORIDAD		FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE FIRMA DEL FUNCIONARIO 	
NOTIFICACIÓN SOBRE LA TASA DE CONCESIÓN: Se le notifica que esta solicitud se considerará retirada si no procede al pago de la tasa de concesión, para el pago de esta tasa dispone de tres meses a contar desde la publicación del anuncio de la concesión en el BOP, más los diez días que establece el art. 81 del R.D. 224/1980			

NO CUMPLIMENTAR LOS RECUADROS ENNEGRICADOS EN ROJO

NO CUMPLIMENTAR LOS RECUADROS ENNEGRICADOS EN ROJO

ILMA, SRA. DIRECTORA DE LA OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
 informacion@oeppi.es
 www.oeppi.es

C/ PANAMA, 1 • 28071 MADRID

IV. 6.- Criterios de Valoración Morfológicos de Oocitos, Embriones tempranos y Blastocistos Humanos propuestos por ASEBIR: aplicabilidad en embriones crioconservados donados para investigación con células madre. JL Cortés, G Ligeró, L Sánchez, A Nieto, C Bueno, R Montes, P Menéndez. **Revista de la Asociación para el Estudio de la Biología de Reproducción (ASEBIR)**. Junio 2008. Vol. 14, nº 1, p 6-13.

INTRODUCCIÓN: La Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR) ha publicado en sus Cuadernos de Embriología Clínica los Criterios de Valoración Morfológicos de Oocitos, embriones tempranos y Blastocistos Humanos, buscando poder consensuar los criterios de calidad entre todas las clínicas de reproducción asistida españolas. Para la evaluación de la calidad embrionaria de aquellos embriones crioconservados que han sido donados a investigación, el Centro de Reproducción Asistida facilita al Banco Andaluz de Células Madre (BACM) toda la información referente a cada embrión; desde la calidad que poseía previo a la congelación, el método de congelación utilizado, así como el tiempo que llevan los embriones congelados, entre otros datos.

OBJETIVO: Desde el BACM nos hemos sumado a esta propuesta, para ver si estos criterios de valoración morfológicos son extrapolables a los embriones crioconservados que son donados a nuestro proyecto de investigación para derivación de hESCs.

MATERIAL Y MÉTODOS: Los Centros de Reproducción Asistida de donde proceden los embriones donados a investigación han facilitado al BACM toda la información referente a cada embrión, desde la calidad que poseía previo a la congelación, el método de congelación utilizado, así como el tiempo que llevan los embriones congelados, entre otros datos. Los embriones fueron congelados en estadio de división temprana (Día +2/+3), y fueron clasificados cualitativamente por las Clínicas de Reproducción de origen siguiendo los sistemas de evaluación de la calidad embrionaria tradicionales, comparándolos con los nuevos criterios propuestos por ASEBIR.

RESULTADOS: Para realizar nuestros experimentos hemos utilizado 52 embriones que fueron congelados en estadio de división temprana (D+2 y D+3). Diecisiete embriones fueron congelados en Día +2 (33%), mientras que 35 fueron congelados en Día +3 (67%). En todos los casos se utilizó para descongelar el protocolo de descongelación complementario al utilizado para la congelación. Cinco embriones fueron congelados por el método de congelación ultrarrápida (10%). Los embriones restantes fueron congelados por el método de congelación lenta (90%). Para poder derivar nuevas hESC, partimos de 9 embriones que poseían antes de la congelación calidad I (17%), 32 embriones que poseían calidad II (62%) y 11 embriones que poseían calidad III (21%). Tras el proceso de descongelación, nuestra evaluación con criterios tradicionales dio los siguientes resultados: 5 embriones con calidad I (10%), 23 embriones con calidad II (44%), 9 embriones con calidad III (17%), 10 embriones con calidad IV (19%), y tuvimos 5 embriones que se lisaron por completo y que no pudieron ser evaluados (10%). Según los nuevos criterios propuestos por ASEBIR y tras la descongelación de los embriones obtuvimos los siguientes resultados: 2 embriones de categoría A (4%), 4 embriones con categoría B (8%), 11 embriones con categoría C (21%), y 30 embriones con categoría D (58%). Queremos destacar que en 19 embriones (37%) observamos la lisis de alguna blastómera que no comprometió la supervivencia de los embriones, pero que se tuvo en cuenta a la hora de reclasificar su calidad. De los 52 embriones descongelados, 12 embriones llegaron al estadio de blastocisto (23%), siendo en todos los casos embriones descongelados con el método de descongelación lenta y en día +3 de desarrollo. Estos blastocistos procedían de embriones de categoría A en dos ocasiones (17%), de embriones de categoría C en 3 ocasiones (25%) y de embriones de categoría D en 7 ocasiones (58%). En ninguna ocasión el blastocisto se originó a partir de un embrión de categoría B. Respecto a la calidad blastocitaria evaluada con los criterios de Gardner, obtuvimos 2 blastocistos con calidad 4AA (17%), 2 blastocistos con calidad 4BB (17%), 3 blastocistos con calidad 3BB (25%), 4 blastocistos con calidad 3CC (33%), y un blastocisto con calidad 2BB (8%). Atendiendo a la nueva clasificación de ASEBIR obtuvimos un solo blastocisto con categoría A (8%), un solo blastocisto con categoría C (8%), y 10

blastocistos con categoría D (83%). Ninguno de los blastocistos se evaluó con categoría B.

Los 12 blastocistos fueron liberados de la zona pelucida utilizando ácido Tyrode y puestos sobre “feeders” para proceder a la derivación de hESCs. En 7 de los blastocistos (58%) se pudo aislar la ICM.

CONCLUSIONES: Desde el BACM confirmamos que la propuesta de ASEBIR para estandarizar los criterios de valoración morfológicos de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos es muy positiva y extrapolable en su mayor parte a la manipulación de estas células para propósitos diferentes de la reproducción, aunque creemos que es necesario publicar un anexo que se refiera concretamente a los embriones congelados, y que no sea tan exigente con la variable de número de células y ritmo de división. Este anexo específico para estos embriones sería útil tanto para el propósito de derivación de hESCs, donde la evolución de los embriones al estadio de blastocisto es necesaria, como para los programas de criotransferencia que se realicen dentro de los Centros de Reproducción Asistida.

Criterios de Valoración Morfológicos de Oocitos, Preembriones tempranos y Blastocistos Humanos propuestos por ASEBIR

Morphological Assessment of Human Oocytes, early Embryos and Blastocysts proposed by ASEBIR

José Luis Cortés*, Gertrudis Ligeró, Laura Sánchez, Ana Nieto, Clara Bueno, Rosa Montes, Pablo Menéndez. Banco Andaluz de Células Madre. Centro de Investigación Biomédica. Universidad de Granada. Campus de la Salud. Granada. *Correspondencia: josel.cortes.sspa@juntadeandalucia.es

Aplicabilidad en preembriones criopreservados donados para investigación con células madre. Applicability in cryopreserved embryos donated to stem cell research.

RESUMEN

ASEBIR ha publicado en sus Cuadernos de Embriología Clínica los Criterios de Valoración Morfológicos de Oocitos, Preembriones tempranos y Blastocistos Humanos, buscando poder consensuar los criterios de calidad entre todas las clínicas de reproducción asistida españolas. Sin embargo, estos criterios no sólo deben ser útiles para los embriólogos clínicos, sino que pueden servir a los embriólogos pertenecientes a centros de investigación como ayuda para facilitar la derivación de líneas celulares embrionarias humanas así como para estudios moleculares y genéticos básicos de embriología humana. El objetivo de este trabajo es mostrar si los criterios publicados por ASEBIR son extrapolables a preembriones congelados donados a investigación con células madre, utilizando para ello los preembriones autorizados para un proyecto de investigación del Banco Andaluz de Células Madre.

Palabras clave: Calidad blastocitaria, Calidad embrionaria, célula madre embrionaria humana, masa celular interna, preembrión congelado.

SUMMARY

ASEBIR proposed in its Clinical Embryology Notebooks the Morphological Assessment for Human Oocytes, early Embryos and Blastocysts, aiming at reaching an agreement on the quality criteria between all Spanish assisted reproduction clinics. Nevertheless, these proposed criteria not only will be useful to clinical embryologists, but can also be useful to embryologists moving into basic research to help facilitate the derivation of human embryonic stem cells and further basic molecular and genetic studies on human embryo development. The aim of this work is to discuss if the criteria published by ASEBIR are useful and can be extrapolated to cryopreserved embryos which are donated to stem cell research using the authorized embryos for an ethically and scientifically approved research project to be carried out at the Andalusian Stem Cell Bank.

Key words: Blastocyst quality, embryonic quality, human embryonic stem cell, inner cell mass, cryopreserved embryo

INTRODUCCIÓN

Los estudios sobre células madre constituyen en la actualidad uno de los campos con más expectativas de la biomedicina. Cuando en noviembre de 1998, el grupo estadounidense liderado por James Thomson publicó los datos sobre la derivación de una línea de células madre embrionarias humana (hESCs, siglas inglesas de human embryonic stem cells) a partir de un blastocisto en fase de preimplantación, se abrió una nueva puerta de esperanza para la curación de enfermedades hasta

ahora incurables (Thomson y cols., 1998). Estas células suponen una herramienta de enorme valor para el "screening" de nuevos fármacos, así como un modelo para estudiar la etiología de las enfermedades que tienen su origen durante la etapa embrionaria, o como fuente futura de células en medicina regenerativa (Menendez et al., 2006).

La legislación en España respecto al uso de preembriones humanos sobrantes de ciclos de fecundación "in vitro" (FIV) está actualmente regulada por la Ley

14/2006, sobre técnicas de reproducción asistida, por el Real Decreto 1301/2006, sobre células y tejidos humanos, y por la Ley 14/2007, sobre investigación biomédica. En nuestra interpretación de estas leyes, la pareja sometida a un ciclo FIV puede dar un destino final a aquellos preembriones sobrantes que se encuentren criopreservados en nitrógeno líquido, independientemente del tiempo de congelación, siempre bajo consentimiento informado de la pareja. Los diferentes destinos posibles que pueden darse a los preembriones sobrantes criopreservados son:

- > Su utilización por la propia mujer o cónyuge.
- > La donación con fines reproductivos.
- > La donación con fines de investigación.
- > El cese de su conservación sin otra utilización.

Respecto a la utilización de preembriones con fines de investigación, sólo se autorizará si se atiende a varios requisitos:

- > Posesión del consentimiento informado.
- > Que el preembrión no se haya desarrollado *in vitro* más allá de 14 días después de la fecundación.
- > Que la investigación se realice en centros autorizados.
- > Que la investigación se realice en base a un proyecto debidamente presentado y autorizado por las autoridades competentes
- > Que se especifiquen las posibles relaciones de interés entre centros.

Esta legislación deja a España en un término medio de permisividad, englobándola en el grupo de países donde está permitido investigar con preembriones sobrantes de ciclos de FIV para derivar hESC (Canadá, Holanda, Australia, Suecia), lejos del grupo de países donde está prohibido utilizar preembriones para investigación con hESC (Irlanda, Austria, Noruega), aunque un peldaño por debajo del grupo de países donde se pueden generar preembriones con fines únicos de investigación (Reino Unido, Bélgica, Israel, Singapur).

Para la evaluación de la calidad embrionaria de aquellos preembriones crioconservados que han sido donados a investigación, el Centro de Reproducción Asistida facilitó al Banco Andaluz de Células Madre (BACM) toda la información referente a cada preembrión; desde la calidad que poseía previo a la congelación, el método de congelación utilizado, así como el tiempo que llevan los preembriones congelados, entre otros datos.

ASEBIR, dentro de la Colección de Cuadernos de Embriología Clínica, ha publicado los Criterios de Valoración Morfológicos de Oocitos, Embriones Tempranos y Blastocistos Humanos. Esta propuesta ha sido diseñada debido a la falta de consenso en este aspecto clave

de la embriología clínica y que conlleva problemas tan comunes como la imposibilidad de generar estudios multicéntricos con valoraciones de calidad embrionaria común, de interpretar informes clínicos de laboratorios ajenos, o de comparar datos bibliográficos.

Desde el BACM hemos querido sumarnos a esta propuesta, para ver si estos criterios de valoración morfológicos son extrapolables a los preembriones crioconservados que son donados a nuestro proyecto de investigación para derivación de hESC.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para poder disponer de material biológico para nuestras investigaciones, el BACM ha realizado durante los años 2006 y 2007 una campaña de recuperación de preembriones sobrantes, tanto en hospitales públicos andaluces como en clínicas privadas (Cortes y cols., 2007). Estos preembriones han pasado los Comités necesarios (Comité de Investigación con Preembriones Humanos de Andalucía y la Comisión de Seguimiento y Control de la Donación del Instituto de Salud Carlos III), que han dado la autorización pertinente para su uso en investigación a nuestro proyecto de investigación.

A nivel de infraestructura y organización del espacio, disponemos de un completo laboratorio de embriología, dentro de salas GMP (siglas inglesas de Good Manufacturing Practice), con equipamiento y personal cualificado para realizar la manipulación de estos preembriones y su posterior derivación a hESCs (Cortes y cols., 2006a, b).

Para la configuración del laboratorio de embriología evaluamos las guías propuestas por distintas asociaciones de reproducción asistida, observando que el único enfoque fue el reproductivo, haciéndose necesaria una actualización de dichas guías, debido a la existencia de laboratorios de embriología que no se dedican a realizar técnicas de reproducción (Cortes y cols., 2006b).

Los Centros de Reproducción Asistida de donde proceden los preembriones donados a investigación han facilitado al

BACM toda la información referente a cada preembrión, desde la calidad que poseía previo a la congelación, el método de congelación utilizado, así como el tiempo que llevan los preembriones congelados, entre otros datos. Los preembriones fueron congelados en estadio de división temprana (Día +2/+3), y fueron clasificados cualitativamente por las Clínicas de Reproducción de origen siguiendo los sistemas de evaluación de la calidad embrionaria tradicionales (Calderón y cols., 2002). Para los preembriones que llegaron al estadio de blastocisto utilizamos como criterio de clasificación tradicional el propuesto por Gardner (Gardner y cols., 1998).

Según los criterios propuestos por ASEBIR, la valoración morfológica en estos estadios ha constituido tradicionalmente la base de la determinación de la calidad embrionaria. Sin embargo, aunque hay cierto consenso entre la definición de un preembrión de buena o mala calidad, no existe consenso entre laboratorios cuando se trata de valorar preembriones de calidades intermedias. El objetivo de ASEBIR ha sido poder consensuar los criterios de calidad, creando una nueva tabla de clasificación embrionaria, cuando se trata del estadio de oocitos, preembriones tempranos, o cuando se trata de blastocistos. Nosotros nos vamos a centrar en los dos últimos estadios.

La calidad embrionaria fue evaluada por un embriólogo del BACM inmediatamente después del proceso de descongelación, y en los días sucesivos hasta su evolución a blastocisto, aunque sólo mostramos en este trabajo la situación inicial postdescongelación (Tabla 1) y la calidad de aquellos preembriones que llegaron al estadio de blastocisto (Tabla 2).

Una vez descongelados los preembriones fueron lavados en medio G-MOPS (Vitrolife, Suecia) y colocados en medio de cultivo (G-1 y G-2 V.5 plus, Vitrolife, Suecia). A continuación se evaluó la calidad embrionaria en base a los criterios de evaluación tradicionales y también en base a los nuevos criterios ASEBIR, y además se compararon con la calidad embrionaria precongelación, según los datos facilitados por los

ARTICULO I

José Luis Cortés et al. Criterios de Valoración Morfológica.

8

Tabla 1: Tabla de asignación de calidad preembrionaria según los diferentes criterios en función de las variables consideradas.

Preemb.	Día de cong.	Nº células	% fragmentación	Similitud de tamaño	Multinucleación	Citoplasma	Zona pelúcida	Calidad pre-cong.	Calidad post-cong.	Calidad ASEBIR
1	D+3	4	>35%	No	No	Rugoso	Normal	4CII	4CIII	D
2	D+3	8	<35%	No	No	Rugoso	Normal	8CII	8CIII	C
3	D+2	1+1 lisada	>35%	-	No	Rugoso	Normal	2CII	1CIV	D
4	D+2	5	<35%	No	No	Rugoso	Normal	5CIII	5CIII	C
5	D+2	2	<10%	Iguales	Si	Rugoso	Normal	2CII	2CII	D
6	D+2	2	No	Iguales	No	No vacuolas	Normal	2CI	2CI	B
7	D+2	2	<10%	No	No	No vacuolas	Normal	2CII	2CII	C
8	D+2	2	No	Iguales	No	No vacuolas	Normal	2CI	2CI	B
9	D+2	2	<10%	No	Si	No vacuolas	Normal	2CII	2CII	D
10	D+3	5	No	Iguales	No	No vacuolas	Normal	5CII	5CII	B
11	D+3	5	<26%	No	No	No vacuolas	Normal	5CIII	5CIII	C
12	D+3	4	<10%	Iguales	No	No vacuolas	Normal	4CII	4CII	D
13	D+3	4	No	Iguales	No	No vacuolas	Elíptica	4CII	4CII	D
14	D+3	4	No	Iguales	No	No vacuolas	Elíptica	4CII	4CII	D
15	D+3	2+2 lisadas	>35%	Iguales	No	No vacuolas	Normal	4CIII	2CIV	D
16	D+3	4	<10%	No	No	No vacuolas	Elíptica	4CII	4CII	D
17	D+3	6	No	No	No	No vacuolas	Elíptica	6CII	6CII	C
18	D+3	4	No	Iguales	No	Escasas vacuolas	Normal	4CII	4CII	D
19	D+3	4	No	Iguales	No	No vacuolas	Normal	4CI	4CI	D
20	D+3	5+1 lisada	No	Iguales	No	No vacuolas	Normal	6CI	5CII	C
21	D+2	6	<10%	No	No	Escasas vacuolas	Normal	6CII	6CII	C
22	D+2	2	<35%	Iguales	No	No vacuolas	Elíptica	2CII	2CII	C
23	D+3	1+1 lisada	>35%	No	No	No vacuolas	Normal	2CIII	1CIV	D
24	D+3	7+1 lisada	No	No	No	No vacuolas	Normal	8CI	7CII	A
25	D+3	3+1 lisada	<35%	No	No	No vacuolas	Normal	4CII	3CIII	D
26	D+3	4	<10%	Iguales	No	No vacuolas	Elíptica	4CII	4CII	D
27	D+3	5	No	Iguales	No	No vacuolas	Normal	5CI	5CI	D
28	D+3	5+2 lisadas	No	Iguales	No	No vacuolas	Normal	7CII	5CIII	D
29	D+3	3+2 lisadas	>35%	Iguales	No	No vacuolas	Normal	5CIII	3CIV	D
30	D+3	4	<35%	Iguales	No	No vacuolas	Normal	4CII	4CII	D
31	D+3	Lisado	-	-	-	-	Normal	5CIII	-	-
32	D+3	1+2 lisadas	>35%	-	No	No vacuolas	Normal	3CIII	1CIV	D
33	D+2	Lisado	<35%	-	-	-	Normal	3CIII	-	-
34	D+2	Lisado	<35%	-	-	-	Normal	4CII	-	-
35	D+2	3+1 lisada	<35%	Iguales	No	No vacuolas	Normal	4CII	3CII	D
36	D+3	4+2 lisadas	<35%	Iguales	No	No vacuolas	Normal	6CII	4CIII	D
37	D+3	Lisado	-	-	-	-	Normal	6CII	-	-
38	D+3	4	<35%	No	No	No vacuolas	Normal	4CII	4CII	D
39	D+3	5	<35%	Iguales	No	No vacuolas	Normal	5CI	5CII	D
40	D+3	1+2 lisadas	No	-	No	No vacuolas	Normal	3CII	1CIII	D
41	D+3	5+1 lisada	No	Iguales	No	No vacuolas	Normal	6CI	5CII	D
42	D+2	2	>26%	Iguales	No	No vacuolas	Normal	2CII	2CII	B
43	D+2	2+1 lisada	<35%	Iguales	No	No vacuolas	Normal	3CII	2CIII	C
44	D+2	1+1 lisada	>35%	-	No	Escasas vacuolas	Elíptica	2CIII	1CIV	D
45	D+2	Lisado	<10%	-	-	-	Normal	3CIII	-	-
46	D+2	1+1 lisada	<35%	-	No	Escasas vacuolas	Normal	2CIII	1CIV	D
47	D+3	1+4 lisadas	>35%	-	No	No vacuolas	Normal	5CII	1CIV	D
48	D+3	4	<35%	Iguales	No	No vacuolas	Normal	4CII	4CII	C
49	D+3	7	No	Iguales	No	No vacuolas	Normal	7CI	7CI	A
50	D+3	6	No	No	No	No vacuolas	Normal	6CII	6CII	C
51	D+3	1+5 lisadas	<35%	-	No	No vacuolas	Normal	6CII	1CIV	D
52	D+3	1+3 lisadas	<35%	-	No	No vacuolas	Normal	4CII	1CIV	D

Centros de Reproducción de procedencia (Tabla 1).

Los 52 preembriones que hemos utilizado para este estudio fueron congelados mediante dos métodos distintos de criopreservación. Por una parte, se utilizó el protocolo de congelación denominado de congelación ultrarrápida (Trounson y cols., 1988), y que consiste en la inmersión directa de los preembriones,

incluidos en dimetil sulfóxido (DMSO), en nitrógeno líquido. Por otra parte se utilizó el protocolo de congelación lenta (Freeze-kit1, Vitrolife, Suecia), que consiste en el tratamiento de los preembriones con un crioprotector que ocupa el lugar del agua que hay en las células mediante procesos osmóticos, seguido de un programa de congelación llevado a cabo por un congelador programable (Nicolool plus, Air Liquide, España).

El objetivo de nuestro proyecto de investigación es poder derivar hESC a partir de estos preembriones. Esta derivación consiste en el desarrollo de los preembriones hasta estadio de blastocisto, la liberación de la zona pelúcida mediante el uso de ácido Tyrode (Irvine Scientific, CA, USA), la posterior colocación del blastocisto desnudo sobre una superficie de células de soporte (feeders), y el posterior aislamiento mecánico de la masa celular

interna (MCI), donde se encuentran las hESCs.

RESULTADOS

Día de desarrollo embrionario de los preembriones utilizados y métodos de congelación/descongelación utilizados

Para realizar nuestros experimentos hemos utilizado 52 preembriones que fueron congelados en estadio de división temprana (D+2 y D+3). Diecisiete preembriones fueron congelados en Día +2 (32,7%), mientras que 35 fueron congelados en Día +3 (67,3%). En todos los casos se utilizó para descongelar el protocolo de descongelación complementario al utilizado para la congelación.

Cinco preembriones (Preembriones 1-5) fueron congelados por el método de congelación ultrarrápida (9,6%). Los preembriones restantes (Preembriones 6-52) fueron congelados por el método de congelación lenta (90,4%).

Calidad embrionaria de los preembriones pre- y post-descongelación siguiendo los diferentes criterios de clasificación.

Para poder derivar nuevas hESC, partimos de 9 preembriones que poseían antes de la congelación calidad I (17,3%), 32 preembriones que poseían

calidad II (61,5%) y 11 preembriones que poseían calidad III (21,2%). Tras el proceso de descongelación, nuestra evaluación con criterios tradicionales dio los siguientes resultados: 5 preembriones con calidad I (9,6%), 23 preembriones con calidad II (44,2%), 9 preembriones con calidad III (17,3%), 10 preembriones con calidad IV (19,3%), y tuvimos 5 preembriones que se lisaron por completo y que no pudieron ser evaluados (9,6%). Según los nuevos criterios propuestos por ASEBIR y tras la descongelación de los preembriones obtuvimos los siguientes resultados: 2 preembriones de categoría A (3,8%), 4 preembriones con categoría B (7,7%), 11 preembriones con categoría C (21,1%), y 30 preembriones con categoría D (57,8%) (Tabla 1). Queremos destacar que en 19 preembriones (36,5%) observamos la lisis de alguna blastómera que no comprometió la supervivencia de los preembriones, pero que se tuvo en cuenta a la hora de reclasificar su calidad.

Fase experimental de descongelación y establecimiento de hESCs: datos preliminares.

De los 52 preembriones descongelados, 12 preembriones llegaron al estadio de blastocisto (23,1%), siendo en todos los casos preembriones descongelados con el método de descongelación lenta y en día +3 de desarrollo. Estos blastocistos procedían de preembriones de categoría

A en dos ocasiones (16,7%), de preembriones de categoría C en 3 ocasiones (25,0%) y de preembriones de categoría D en 7 ocasiones (58,3%). En ninguna ocasión el blastocisto se originó a partir de un preembrion de categoría B.

Respecto a la calidad blastocitaria evaluada con los criterios de Gardner, obtuvimos 2 blastocistos con calidad 4AA (16,7%), 2 blastocistos con calidad 4BB (16,7%), 3 blastocistos con calidad 3BB (25,0%), 4 blastocistos con calidad 3CC (33,3%), y un blastocisto con calidad 2BB (8,3%). Atendiendo a la nueva clasificación de ASEBIR obtuvimos un solo blastocisto con categoría A (8,3%), un solo blastocisto con categoría C (8,3%), y 10 blastocistos con categoría D (83,4%). Ninguno de los blastocistos se evaluó con categoría B (Tabla 2).

Los 12 blastocistos fueron liberados de la zona pelúcida utilizando ácido Tyrode y puestos sobre "feeders" para proceder a la derivación de hESCs. En 7 de los blastocistos (58,3%) se pudo aislar la masa celular interna. En el momento de escribir este trabajo, pequeñas colonias con morfología similar a hESCs seguían en cultivo y desarrollo buscando el establecimiento de la línea celular, correspondiendo al preembrion número 24 y al preembrion número 27.

Tabla 2: Tabla de asignación de calidad del blastocisto según los diferentes criterios en función de las variables consideradas.

Preembrion / Calidad embrionaria ASEBIR	Organización en blastocisto	Zona pelúcida	MCI	Tamaño MCI	Trofoectodermo	Grado expansión	Calidad Gardner	Calidad ASEBIR	Aislamiento de MCI para derivación hESC
13 (D)	D+6	Afinada	Oval y compactada	3800 µm ² -1900 µm ²	Epitelio homogéneo Células elípticas	El blastocelo ocupa todo el volumen del preembrion	4AA	C	Si
14 (D)	D+6		Oval y compactada	<1900 µm ²	Epitelio irregular		2BB	D	No
15 (D)	D+6	Afinada	Oval y compactada	<1900 µm ²	Epitelio irregular Células escasas		4BB	D	Si
17 (C)	D+5	Afinada	Oval y compactada	3800 µm ² -1900 µm ²	Epitelio homogéneo Células elípticas	El blastocelo ocupa todo el volumen del preembrion	4AA	A	No
18 (D)	D+6	Afinada	Oval y compactada	< 1900 µm ²	Epitelio irregular		4BB	D	No
24 (A)	D+6			<1900 µm ²	Epitelio irregular	El blastocelo ocupa todo el volumen del preembrion	4BB	D	Si
27 (D)	D+6			<1900 µm ²	Epitelio irregular		3BB	D	Si
28 (D)	D+6			<1900 µm ²	Epitelio irregular		3BB	D	No
30 (D)	D+6			<1900 µm ²	Epitelio irregular		3CC	D	No
48 (C)	D+6			<1900 µm ²	Epitelio irregular		3CC	D	Si
49 (A)	D+6			<1900 µm ²	Epitelio irregular		3CC	D	Si
50 (C)	D+6			<1900 µm ²	Epitelio irregular		3CC	D	Si

DISCUSIÓN

En este estudio hemos intentado comparar la calidad embrionaria de los preembriones antes y después de la congelación, siguiendo los criterios tradicionales, con la clasificación que tendrían estos preembriones utilizando los nuevos criterios de ASEBIR, con el fin de observar si esta nueva clasificación es extrapolable a los criterios de calidad embrionaria que se deducen serían necesarios para derivar una línea de hESCs. Para poder realizar esta comparación hemos tenido que obviar y transformar algunos términos que sólo son aplicables al campo reproductivo:

- i) Derivación de hESCs en vez de capacidad de implantación
- ii) Día de descongelación en lugar de día de transferencia

Además, hemos observado que en los nuevos criterios de valoración de ASEBIR no se contempla información sobre los preembriones congelados, no atendándose por tanto a la posibilidad de que alguna blastómera resulte lisada durante el proceso de descongelación. Cuando este hecho ha ocurrido en nuestro laboratorio, lo hemos tenido en

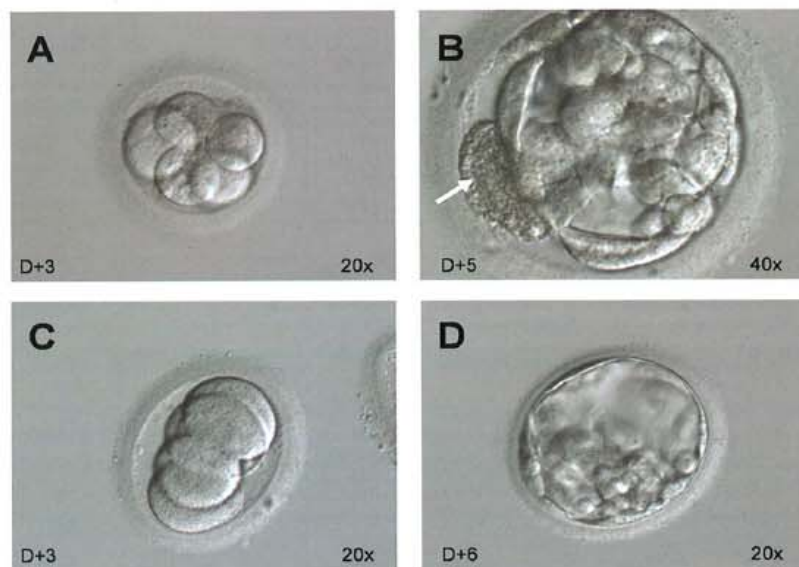
cuenta a la hora de determinar la calidad del preembrión (Tabla 1). De esta manera y según el sistema de graduación de ASEBIR, la categoría A sería para el preembrión de óptima calidad con máxima capacidad de derivar a hESCs, la categoría B de buena calidad con elevada capacidad de derivar a hESCs, la categoría C de calidad regular con una probabilidad de derivar a hESCs media/baja, y la categoría D para el preembrión de mala calidad con una probabilidad de derivar a hESCs baja/nula. Este hecho nos hace sospechar que algunos preembriones que hubieran podido tener categoría A ó B previo a la congelación, pasaron a preembriones de categoría C ó D al ser descongelados, como el preembrión número 28, que habiendo sufrido lisis de dos de sus blastómeras (5 morfológicamente normales+2 lisadas) (Figura 1A), con la consecuente bajada en el criterio de valoración ASEBIR de categoría B a categoría D (Tabla 1), llegó al estadio de blastocisto (Categoría ASEBIR D), aunque después no fuimos capaces de aislar la MCI (Tabla 2). Además, somos conscientes que la presencia de estos restos de lisis celular pueden dificultar, aún más que la presencia de fragmentos citoplasmáticos,

la formación de blastocistos de buena calidad (Figura 1B).

Con respecto a los parámetros morfológicos a evaluar por ASEBIR en el estadio de D+2 y D+3, vimos concordancia entre los diferentes criterios de valoración en todas las variables consideradas, excepto en la que se refiere a número celular y ritmo de división. Aunque la hora de la congelación no es un dato que nos hayan facilitado los Centros de Reproducción, obviamos que estuvo en todos los casos dentro de los intervalos de observación recomendados por ASEBIR, siendo en D+2: 44-47 horas post-inseminación, y en D+3: 67-71 horas post-inseminación. En nuestra experiencia tuvimos el claro ejemplo del preembrión 27, que teniendo calidad 5CI por los criterios tradicionales, se clasificó con categoría D según ASEBIR debido a un ritmo de división algo más lento (Tabla 1), llegó al estadio de blastocisto, y tuvimos éxito en el aislamiento de la MCI para intentar la derivación de hESCs (Tabla 2).

Nos ocurrió lo mismo a la hora de comparar los distintos criterios de

Figura 1 Ejemplos representativos de preembriones descongelados en el BACM.



1A: Preembrión en día +3 inmediatamente después de ser descongelado, y que pasó de ser 7CII a 5CIII, con lo que bajó según los criterios de ASEBIR de categoría B a categoría D.

1B: Ejemplo representativo de un preembrión en día +5 donde se observa que los restos de células lisadas están impidiendo que el blastocele pueda ocupar todo el volumen del preembrión. La flecha blanca indica los restos de la célula lisada.

1C: Preembrión en día +3 inmediatamente después de ser descongelado, y que poseía calidad tipo II debido a la forma elíptica de la zona pelucida. Según los criterios de ASEBIR se trata de un preembrión con categoría D, debido al bajo número de células.

1D: Preembrión en día +6, donde se observó la evolución a un blastocisto de calidad 4AA según Gardner, y que debido a que no llegó a organizarse en blastocisto en día +5 pasó a tener calidad C según los criterios de ASEBIR.

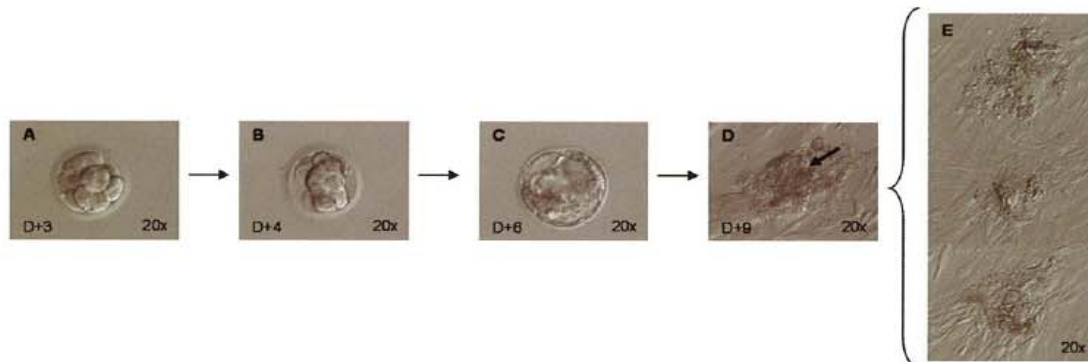
valoración de la calidad cuando observamos el estadio de blastocisto. Mientras que vimos concordancia a la hora de evaluar las variables consideradas por ASEBIR como el aspecto de la zona pelucida, aspecto y tamaño de la MCI y del trofoectodermo, y el grado de expansión, cuando evaluamos el día de organización del blastocisto pudimos comprobar que algún preembrión que alcanza una calidad blastocitaria óptima respecto a las demás variables, pasó a ser categoría C solamente porque se organizó en blastocisto en D+6, en lugar de en D+5. Esto le ha ocurrido en nuestro trabajo al preembrión 13 (Tabla 2). Teniendo en cuenta que procedía de un preembrión ya catalogado como categoría D cuando estaba en D+3, es lógico pensar que iba a llevar acumulado este retardo en su desarrollo (Figura 1C, D). Por tanto la variable de número celular y ritmo de división es para nosotros

independiente de la calidad morfológica que se consiga, ya que al preembrión 13 también pudimos aislarle la MCI. Además, el hecho de que todos los preembriones que llegaron a blastocisto fueran congelados en día +3 corrobora los estudios reproductivos en los que mantener en cultivo los preembriones un día más antes de la criopreservación (Día+2 vs. Día+3) permite seleccionar mejor la calidad de estos (Sifer et al., 2006). Esto puede tener implicaciones importantes para la selección de preembriones congelados destinados a derivar hESCs.

La tasa de éxito en la derivación de hESCs sigue siendo baja actualmente, necesitándose un gran número de preembriones para poder derivar un número bajo de líneas establecidas y caracterizadas, sobre todo cuando los preembriones a los que se puede optar son los sobrantes de las técnicas de reproducción asistida, y que, por tanto,

no fueron prioritarios a la hora de realizar la transferencia. Este hecho ha dado lugar a que muchos grupos de investigación inmersos en la derivación de hESCs utilizando tanto preembriones frescos como congelados, comiencen a tener en cuenta la calidad embrionaria de estos preembriones (Zhang et al., 2006; Lerou et al., 2008). En nuestra experiencia, las colonias que tenemos actualmente han procedido de un preembrión de categoría A, y que evolucionó a un blastocisto de categoría D, en el caso del preembrión 24 (Figura 2), y de un preembrión de calidad D, que evolucionó a un blastocisto de categoría D, en el caso del preembrión 27 (Figura 3), lo que nos hace ver una vez más que el número celular y el ritmo de división en nuestra experiencia puede no ser un factor limitante sobre la posibilidad de éxito en derivación.

Figura 2 Evolución a blastocisto y aislamiento de la MCI del preembrión 24.



1A: Preembrión 24 en día +3 inmediatamente después de ser descongelado, y que pasó de ser 8CI a 7CII, aunque mantuvo la categoría A según los criterios de ASEBIR.

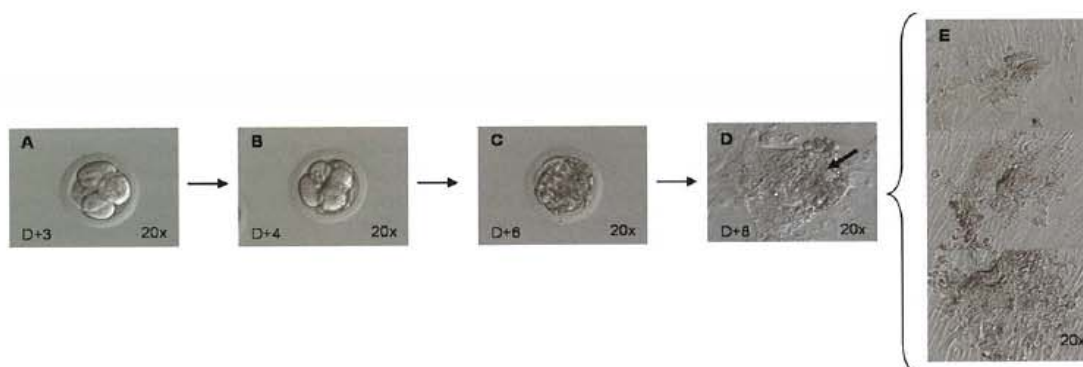
1B: Preembrión 24 en día +4, donde observamos la compactación en mórula.

1C: Preembrión 24 en día +6 donde ha alcanzado el estadio de blastocisto con una calidad 4BB según Gardner, y que debido a que no llegó a organizarse en blastocisto en día +5 pasó a tener calidad D según los criterios de ASEBIR.

1D: Colonia primaria del preembrión 24 en día +9, una vez liberado de la zona pelucida y colocado en "feeders". La flecha negra indica donde estaría situada la MCI.

1E: Colonias con morfología similar a hESCs del preembrión 24 tras pase a "feeders" frescos una vez aislada la MCI.

Figura 3 Evolución a blastocisto y aislamiento de la MCI del preembrión 27.



1A: Preembrión 27 en día +3 inmediatamente después de ser descongelado, y que conservó una calidad de 5CI. Según los criterios de ASEBIR se trata de un preembrión con categoría D, debido al bajo número de células.

1B: Preembrión 27 en día +4, donde observamos división celular.

1C: Preembrión 27 en día +6 donde ha alcanzado el estadio de blastocisto con una calidad 3BB según Gardner, y que debido a que no llegó a organizarse en blastocisto en día +5 pasó a tener calidad D según los criterios de ASEBIR.

1D: Colonia primaria del preembrión 27 en día +8, una vez liberado de la zona pelúcida y colocado en "feeders". La flecha negra indica donde estaría situada la MCI.

1E: Colonias con morfología similar a hESCs del preembrión 27 tras pase a "feeders" frescos una vez aislada la MCI.

Desde el BACM opinamos que la propuesta de ASEBIR para estandarizar los criterios de valoración morfológicos de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos es muy positiva y extrapolable en su mayor parte a la manipulación de estas células para propósitos diferentes de la reproducción, aunque creemos que es necesario publicar un anexo que se refiera concretamente a los preembiones congelados, y que no sea tan exigente con la variable de número de células y ritmo de división. Este anexo específico para estos preembiones sería útil tanto para el propósito de derivación de hESCs, donde la evolución de los preembiones al estadio de blastocisto es necesaria, como para los programas de criotransferencia que se realicen dentro de los Centros de Reproducción Asistida.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por la Consejería de Salud de la Junta de Andalucía (Proyecto 0030/2006 TC y MR). Queremos agradecer al Servicio Andaluz de Salud, a la Fundación Progreso y Salud, a ANACER y al Instituto de Salud Carlos III su continua colaboración.

BIBLIOGRAFÍA

ASEBIR, II. Criterios de valoración morfológicos de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos. Cuadernos de Embriología Clínica. 2007.

Calderón G, Prados N, Caligara C, Mantuana E, Navarro J, Pellicer A, Remohí J. Calidad embrionaria. Indicadores predictivos de vitalidad. En: Remohí J, Pellicer A, Simón C, Navarro J, editors. Reproducción

Humana. 2ª ed. Madrid: McGraw-Hill-Interamericana de España; 2002. p. 463-468.

Cortés JL, Cobo F, Cabrera C, Barnie AH, Catalina P, Nieto A, Montes R, Barroso A, Concha A. Nuevas perspectivas para el embriólogo: papel en el Banco de Líneas Celulares de Andalucía (Nodo Central Banco Nacional de Líneas Celulares). Revista de la Asociación para el Estudio de la Biología de Reproducción (ASEBIR). Vol. 11, nº 2. p 11-14, Diciembre 2006.

Cortés JL, Cobo F, Barnie AH, Catalina P, Cabrera C, Nieto A, Montes R, Concha A. Role of the embryology laboratory in the human embryonic stem cell line derivation process. Cytotechnology 2006;52:1-11.

Cortés JL, Antiñolo G, Martínez L, Cobo F, Barnie A, Zapata A, Menéndez P. Spanish Stem Cell Bank interviews examine the interest of couples in donating surplus

human IVF embryos for stem cell research". *Cell Stem Cell*. 2007;1:17-20.

Gardner DK, Vella P, Lane M, Wagley L, Schlenker T, Schoolcraft WB. Culture and transfer of human blastocyst increases implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfers. *Fertil Steril*. 1998;13:3434-3440.

Lerou PH, Yabuuchi A, Huo H, Takeuchi A, Shea J, Cimini T, Ince TA, Ginsburg E, Racowsky C, Daley GO. Human embryonic stem cell derivation from poor-quality embryos. *Nat Biotechnol*. 2008 ;26:212-214.

Ley 14/2006, de 26 de mayo, sobre Técnicas de Reproducción Humana Asistida. BOE núm 126: 19947-19956.

Ley 14/2007, de 3 de Julio, de investigación biomédica. BOE núm 159: 28826-28848.

Menendez P, Bueno C, Wang L. Human embryonic stem cells: a journey beyond cell replacement therapies. *Cytotherapy* 2006;8:530-541.

Real Decreto 1301/2006, de 10 de noviembre, por el que se establecen las normas de calidad y seguridad para la donación, la obtención, la evaluación, el procesamiento, la preservación, el almacenamiento y la distribución de células y tejidos humanos y se aprueban las normas de coordinación y funcionamiento para su uso en humanos. BOE núm 270: 39475-39502

Sifer C, Sellami A, Poncelet C, Martin-Pont B, Porcher R, Hugues JN, Wolf JP. Day 3 compared with day 2 cryopreservation does not affect embryo survival but improves the outcome of frozen-thawed embryo transfers. *Fertil Steril* 2006;86:1537-1540.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282:1145-1147

Trounson A, Peura A, Freemann L, Kirby C. Ultrarapid freezing of early cleavage stage human embryos and eight-cell mouse embryos. *Fertil Steril*. 1988; 49:822-826. Zhang X, Stojkovic P, Przyborski S, Cooke M, Armstrong L, Lako M, Stojkovic M. Derivation of human embryonic stem cells from developing and arrested embryos. *Stem Cells*. 2006;24:2669-2676.

VII.7.- Mesenchymal stem cells facilitate the derivation of human embryonic stem cells from cryopreserved poor-quality embryos. JL Cortes, L Sánchez, G Ligeró, I Gutierrez-Aranda, P catalina, C Elosua, P Leone, R Montes, C Bueno, V Ramos-Mejia, I Maleno, JL García-Pérez, P Menendez. Human Reproduction (Submitted)

INTRODUCCIÓN: Las hESCs han abierto una nueva área de investigación en biomedicina. La eficiencia en la derivación de hESCs a partir de embriones de mala calidad es muy baja y es dependiente del uso de fibroblastos embrionarios murinos (MEFs) o fibroblastos humanos de prepucio (HFFs).

OBJETIVO: Se pretende optimizar el proceso de derivación de hESCs a partir de embriones de mala calidad.

MATERIAL Y MÉTODOS: En este estudio hemos comparado tres condiciones relacionadas con la supervivencia de los embriones tras su descongelación, así como la mejora en la eficiencia del proceso de derivación de hESCs: i) tratamiento de los embriones con un inhibidor de ROCK Y-27632; ii) el uso de células madre mesenquimales humanas (hMSCs) como superficie de crecimiento; y iii) La tecnología del láser (LD) como método de aislamiento de la ICM. Doscientos diecinueve embriones congelados de mala calidad han sido utilizados en este estudio. La mitad de los embriones descongelados fueron tratados con Y-27632 (n=110), frente a la otra mitad de los embriones que no fueron tratados (n=109). Los embriones supervivientes que consiguieron el estadio de blastocisto (n=50) fueron cultivados sobre HFFs (n=21) o sobre hMSCs (n=29). Las técnicas utilizadas para el aislamiento de la ICM fueron el

método de cultivo directo del blastocisto (WBC), frente a la combinación del WBC y el LD.

RESULTADOS: La supervivencia embrionaria experimentó un incremento del 52% cuando los embriones se trataron con Y-27632. Las hMSCs facilitaron el crecimiento de la colonia primaria y la derivación de hESCs: tres líneas pudieron ser derivadas sobre hMSCs (10,3% de eficiencia) mientras ninguna hESC pudo ser derivada sobre HFFs (0% de eficiencia). Sin embargo, ni la inhibición con iROCK ni el método de aislamiento utilizado mejoró la eficiencia en el establecimiento de nuevas hESCs. Las hESCs derivadas sobre hMSCs, denominadas GRA-1, -2, -3 fueron completamente caracterizadas y mostraron una morfología típica de hESCs, euploidía, expresión de marcadores de superficie y factores de transcripción asociados a ESCs. Además mostraron diferenciación a las tres líneas germinales tanto *in vitro* como *in vivo*. Estas líneas están actualmente mantenidas sobre hMSCs y también se han transferido a superficie de crecimiento libre de feeders, mantenidas con medio suplementado por hMSCs.

CONCLUSIONES: Nuestros datos sugieren que Y-27632 incrementa la supervivencia embrionaria y que las hMSCs facilitan la eficiencia de derivación de hESCs a partir de embriones de mala calidad.

ANEXO 9



Draft Manuscript For Review. Reviewers should submit their review at <http://mc.manuscriptcentral.com/humrep>

Mesenchymal stem cells facilitate the derivation of human embryonic stem cells from cryopreserved poor-quality embryos

Journal:	<i>Human Reproduction</i>
Manuscript ID:	draft
Manuscript Type:	Original Articles
Date Submitted by the Author:	
Complete List of Authors:	Cortes, Jose; Spanish Stem Cell Bank, Stem Cell Derivation Sanches, Laura; Spanish Stem Cell Bank, Stem Cell Derivation Ligeró, Gertrudis; Spanish Stem Cell Bank, Stem Cell Derivation Gutierrez, Ivan; Spanish Stem Cell Bank, Stem Cell Derivation Catalina, Purificacion; Spanish Stem Cell Bank, Stem Cell Derivation Elosua, Carolina; Spanish Stem Cell Bank, Stem Cell Derivation Leone, Paola; Spanish Stem Cell Bank, Stem Cell Derivation Montes, Rosa; Spanish Stem Cell Bank, Stem Cell Derivation Bueno, Clara; Spanish Stem Cell Bank, Stem Cell Derivation Menendez, Pablo; Spanish Stem Cell Bank, Stem Cell Derivation
Keywords:	Mesenchymal Stem Cells, Rock Inhibitor, EMBRYO QUALITY, STEM CELLS
Specialty:	Embryology



<http://humrep.oupjournals.org>

ANEXO 9

Mesenchymal stem cells facilitate the derivation of human embryonic stem cells from cryopreserved poor-quality embryos

J.L. Cortes^{1*}, L. Sanchez¹, G. Liger¹, I. Gutierrez-Aranda¹, P. Catalina¹, C. Elosua¹, P.E. Leone¹, R. Montes¹, C. Bueno¹, V. Ramos-Mejía¹, I. Maleno², J.L. García-Pérez¹ & P. Menendez^{1*}

¹ Andalusian Stem Cell Bank. Centro de Investigación Biomédica. CSJA-UGR. Parque Tecnológico de la Salud, Avda del Conocimiento s/n, Granada, Spain. ² Servicio de Análisis Clínicos. Hospital Virgen de las Nieves. Granada. Spain.

***Correspondence should be addressed to:**

Pablo Menendez Ph.D
Jose Luis Cortés
Andalusian Stem Cell Bank (BACM).
Centro de Investigación Biomédica
Parque Tecnológico de la Salud
Avda del Conocimiento s/n. Granada, Spain
Phone: 00 34 958 894672
Fax: 00 34 958 894652
Email: pablo.menendez@juntadeandalucia.es ; josel.cortes.sspa@juntadeandalucia.es

Running title: Derivation of hESCs in MSCs.

Key words: hESC derivation, hMSC, ROCK inhibitor, Y-27632, laser drilling, poor-quality frozen embryos.

ANEXO 9

ABSTRACT

Background: Human ESCs have opened up a new area of research in biomedicine. The efficiency of hESC derivation from frozen poor-quality embryos is very low and is normally achieved by plating the embryos on mouse (MEFs) or human foreskin (HFFs) feeders. Here, we attempted to optimize the hESC derivation process from frozen poor-quality embryos. **Methods and Results:** Three conditions were compared for improving embryo survival and hESC derivation efficiency: i) embryo treatment with the ROCK inhibitor Y-27632; ii) the use of human mesenchymal stem cells (hMSCs) as feeders; and iii) the laser drilling (LD) technology for ICM isolation. Two hundred and nineteen frozen poor-quality embryos were used. Thawed embryos were randomly treated with (n=110) or without (n=109) Y-27632. Surviving embryos that developed to blastocyst stage (n=50) were randomly co-cultured on HFFs (n=21) or hMSCs (n=29). The technique used for ICM isolation was either whole-blastocyst culture (WBC) or WBC assisted by LD. Embryo survival experienced a 52% increase upon treatment with Y-27632. Human MSCs facilitated ICM outgrowth and hESC derivation: three hESC lines could be derived on hMSCs (10.3% efficiency) whereas no hESC line could be derived on HFFs (0% efficiency). However, neither ROCK inhibition nor the ICM isolation method improved the efficiency of hESC establishment. The hESC lines derived on hMSCs, termed GRA-1,-2, -3 were fully characterized and showed typical hESC morphology, euploidy, expression of ESC-associated surface markers and transcription factors, and displayed *in vitro* and *in vivo* multilineage developmental potential. These hESC lines have now been maintained stable for over 28 passages on hMSCs and have also been successfully transferred to feeder-free culture conditions and maintained in hMSC-conditioned media. **Conclusion:** Our data suggest that Y-27632 increases embryo survival and that hMSCs significantly facilitate the efficiency of hESC derivation from frozen poor-quality embryos.

ANEXO 9

INTRODUCTION

Human embryonic stem cell (hESC) research represents a nascent area of investigation. Human ESCs are pluripotent stem cells derived from the inner cell mass (ICM) of human blastocyst-stage embryos (Thomson et al., 1998; Reubinoff et al., 2000). They are defined by both robust self-renewal capacity and pluripotent developmental potential *in vitro* and *in vivo* (Menendez et al., 2006). Accordingly, cultures of hESCs represent a theoretically inexhaustible source of pluripotent cells that can be differentiated into any cell type and therefore, have been hailed as a unique tool for a range of biomedical applications such as cell replacement therapy, developmental biology, drug discovery and disease modelling (Bueno et al., 2008a; Menendez et al., 2005).

The blastocyst quality, the ICM isolation method used and the culture conditions (feeders) employed are likely the three main factors dictating either ESC derivation failure or success (Cortes et al., 2007a, 2008). Regarding the blastocyst quality, in many countries worldwide only cryopreserved human embryos created during *in vitro* fertilization (IVF) which are in excess of clinical need or deemed clinically useless based on poor morphology may be used for hESC derivation (Cortes et al., 2007b). These frozen supernumerary human embryos are usually of poor-quality (Lerou et al., 2008). The current methods to isolate the ICM are still controversial. The ICM is usually isolated from the expanded blastocysts using a variety of techniques, including immunosurgery (Solter et al., 1975), mechanical processes (Bongso et al., 1994), and whole blastocyst culture (WBC) methods (Kim et al., 2005). These ICM isolation methods are associated with some challenges, including the use of xeno-components, which may prevent the use of hES cell derivatives in potential future therapeutic applications, and the low ES cell establishment efficiency (Cortes et al., 2008). Recently, we and others have developed a laser-assisted system for the isolation of the ICM from mouse and human embryos (Tanaka et al., 2006; Cortes et al., 2007a, 2008; Turetsky et al., 2008). In addition, the derivation and maintenance of hESCs normally

ANEXO 9

require the use of feeder cells (Amit et al., 2003). Up until now, either MEFs, STO fibroblast (Park et al., 2004) or HFFs (Hovatta et al., 2003) were used as supporting feeders for hESC line derivation. Despite that MEFs and HFFs are the most commonly used feeders for hESC co-culture, we and others have recently showed successful hESC maintenance in human mesenchymal stem cells (hMSCs) or hMSC-conditioned media (Cheng et al., 2003; Montes et al., 2009). In line with the mesoderm origin of hMSCs, we hypothesize that hESC lines derived on hMSCs may be more prone to differentiation toward mesodermal lineages (Ledran et al., 2008). Thus, the optimization of hESC line derivation methods is challenging and it is still unclear which approach is the most efficient (Hovatta et al., 2006).

Human ESCs are susceptible to apoptosis upon cell detachment and dissociation (Watanabe et al., 2007). The selective Rho-associated kinase (ROCK) inhibitor Y-27632 has been reported to increase the survival of dissociated hESCs and their cloning efficiency and to improve their survival upon cryopreservation (Watanabe et al., 2007; Martin-Ibañez et al., 2008; Li et al., 2008, 2009). However, whether treatment of cryopreserved human embryos with the ROCK inhibitor Y-27632 facilitates embryo survival and augments the efficiency of hESC establishment still needs to be examined.

In the present study, we attempted to optimize the hESC derivation process from frozen poor-quality embryos. Three experimental conditions were compared for improving embryo survival and hESC derivation efficiency: i) embryo treatment with the selective ROCK inhibitor Y-27632; ii) the use of hMSCs as feeders and, iii) the laser drilling (LD) technology for ICM isolation. Our data suggest that hMSCs significantly increase the efficiency of hESC derivation from frozen poor-quality embryos. In contrast, despite treatment with Y-27632 inhibitor increased embryo survival, neither ROCK inhibition nor the ICM isolation method used seems to enhance the efficiency of hESC establishment.

ANEXO 9

MATERIALS AND METHODS

Cryopreserved Human Embryos

This study was approved by our Local Authorities and the Spanish National Embryo Steering Committee. Cryopreserved human embryos (n=219) were donated to this study upon informed consent by couples that had already undergone an IVF cycle (Cortes et al., 2007b). These human embryos were frozen between 1995 and 2004.

As shown in our experimental design (**Figure 1**), the embryos were initially thawed in the presence or absence of 10 μ M of ROCK inhibitor Y-27632 (Sigma, St Louis, MO) (Narumiya et al., 2000), which has been previously reported to increase the survival of single clones of hESCs, their cloning efficiency, their survival upon cryopreservation (Watanabe et al., 2007; Martin-Ibañez et al., 2008; Li et al., 2008, 2009). Y-27632 inhibitor was added to the human embryo culture media, G-1 v.5 and G-2 v.5 (Vitrolife, Sweden).

Embryo outgrowth co-culture on allogeneic human feeders

Human embryos which survived and developed up to the blastocyst stage were cultured in tissue treated four-well plates (BD Labware, Franklin Lakes, NJ) either on a confluent layer of γ -ray-inactivated (4000 rads) HFFs (Hovatta et al., 2003) or hMSCs (Schaffler and Buchler, 2007; Ucelli et al, 2008; Garcia-Castro et al., 2008). HFFs were purchased from ATCC (SCD-1112SK). Human MSCs were obtained from post-natal adipose tissue from healthy donors upon informed consent as previously described (Cobo et al., 2008; Garcia-Castro et al., 2008). HFFs and hMSCs were grown in IMDM and advanced-DMEM, respectively, supplemented with 10% FCS and 2mM L-glutamine. The four-well plates were seeded with 0.5×10^5 cells/cm² HFFs or hMSCs. Successful embryo outgrowths were routinely maintained in medium consisting of 80% KO-DMEM supplemented with

ANEXO 9

20% KO Serum Replacement, 1% non-essential amino acids, 1mM L-glutamine, 0.1 mM β -mercaptoethanol and 8ng/mL of bFGF (all from Invitrogen, CA), independently of the allogeneic human feeders.

ICM Isolation Methods

Two different experimental approaches were used for ICM isolation and further hESC line establishment depending on the quality of the blastocyst: WBC method alone or WBC assisted by laser (WBC+LD) (Cortes et al., 2008). This latter ICM isolation method has been previously described (Cortes et al., 2008). WBC assisted by LD was employed for blastocysts with a large and distinguishable ICM, while WBC alone was used for those blastocysts with a tiny or indistinguishable ICM (Kim et al., 2005; Cortes et al., 2007a, 2008). Briefly, when WBC was used, the zona pellucida was removed by Tyrode's Acid (Irvine Scientific, CA, USA) for no more than one minute. Then, the whole-blastocyst was cultured in such a way that the trophoectoderm cells and the ICM cells adhered to the feeders (**Figure 2A-D**). Subsequently, the distinguishable ICM was carefully plucked and transferred to a freshly prepared human feeder layer and allowed to expand.

Those blastocysts treated with WBC+LD were initially treated with Tyrode's Acid for no more than one minute, to assure the complete dissolution of zona pellucida, in such a way that the trophoectoderm cells and the ICM adhered to the feeder layer. By day 3 of culture the trophoectoderm cells began to expand leaving the ICM accessible, forming a dome-like structure (Cortes et al., 2008). At this point, the trophoectoderm cells were laser-shot, leaving the ICM free of trophoectoderm cells and reducing the risk of dragging the trophoectoderm cells when the ICM was plucked and transferred to a freshly prepared human feeder layer (Cortes et al., 2008) (**Figure 2A-E**).

ANEXO 9

Characterization of established hESCs

Established hESCs were characterized by indirect immunocytochemistry using antibodies against SSEA-3, SSEA-4 (Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, USA), TRA-1-60 and TRA-1-81 (Chemicon, CA). Briefly, hESC colonies were cultured in chamber slides. Cells were fixed in 4% of paraformaldehyde for 20 minutes followed by 30 minutes incubation in 10% normal goat serum in PBS. Colonies were incubated with primary antibodies (1:100 dilution in PBS) for 1 hour at room temperature (RT). A FITC-conjugated anti-mouse IgM secondary antibody (1:100 dilution in PBS) was used for 30 minutes at RT (Jackson Laboratories Inc). The slides were mounted in Vectashield containing DAPI (Vector Laboratories Inc). As a negative control, the primary antibodies were replaced by PBS. The same markers were assessed by flow cytometry. For flow cytometry analysis, an irrelevant isotype-match was used. Trypsin-dissociated hESC lines were suspended in PBS+3%FBS at a concentration of 2.5×10^4 cells per 100 μL and incubated with the specific primary antibody for 30 minutes at 4° C. After washing with PBS+3%FBS, cells were incubated with 2.5 μL of FITC-conjugated goat anti-mouse IgG antibody (Immunotech, Marseille, France). After 15 minutes at RT, the cells were washed in PBS+3%FBS and finally stained with 7-aminoactinomycin D (7-AAD) (Immunotech) for 5 minutes at RT. Live cells identified by 7-AAD exclusion were analyzed for expression of SSEA-3, SSEA-4, Tra-1-60 and Tra-1-81 using a FACSCanto-II flow cytometer equipped with the FACSDiva software (BDB) (Bueno et al., 2008). Alkaline phosphatase expression was demonstrated using the AP Detection Kit (Chemicon).

Molecular and cytogenetic analysis

The expression of the pluripotency-associated transcription factors Oct3/4, Nanog, Rex-1 and Sox2 was assessed by end-point RT-PCR (Catalina et al., 2008a). GAPDH was used as a housekeeping gene control. The following PCR conditions were used: 5 min at 94°C, 35 cycles of 30 seconds at

ANEXO 9

94°C followed by 50 seconds at 60°C and 50 seconds at 72°C and a final extension of 10 min at 72°C and products were resolved in 1% agarose gel (Catalina et al., 2008a)

Conventional karyotyping analysis was performed as previously described in detail and twenty to thirty metaphase spreads per hESC line were analyzed (Menendez et al., 2005; Catalina et al., 2008a, 2008b).

***In vitro* differentiation analysis**

Near confluent hESCs were treated with collagenase IV for 5 min at 37°C, transferred (2×10^2 cells/cm²) to non-adherent plates and allowed to differentiate spontaneously by embryoid body (EB) formation in DMEM supplemented with 20% FBS, 1% L-glutamine, 0.1 mM non-essential amino acids and 0.1 mM β -mercaptoethanol with media changes every 4 days. After 21 days of EB differentiation, EBs were spun down, fixed with 4% paraformaldehyde for 10 minutes and embedded in paraffin (Catalina et al., 2008a). For each staining, three sections per specimen were used. Then, the cells were incubated (1 hour at RT) with the primary antibodies anti- α -fetoprotein (Santa Cruz Biotechnology; 1:500 dilution in PBS), anti- β -III Tubulin (Chemicon, 1:100 dilution in PBS) and anti-smooth-muscle actin (Chemicon, 1:100 dilution in PBS). Slides were then incubated with a biotinylated secondary antibody (30 minutes at RT) and a streptavidin peroxidase complex (30 minutes at RT) (both from Vector Laboratories Inc). The immunostaining was visualized using diaminobenzidine and counterstained with hematoxylin. All the washing steps were done in PBS.

***In vivo* teratoma formation into NOD/SCID-IL2R γ ^{-/-} mice**

ANEXO 9

During routine passage, 20-50 clumps consisting of about 100 undifferentiated cells each were harvested and injected into the testis of 6 to 8-week-old NOD/SCIDIL2Ry^{-/-} mice. Eight to ten weeks later, the resulting teratomas were fixed in 10% neutral buffered formalin, embedded in paraffin, and examined histologically after hematoxylin and eosin staining as previously described (Cortes et al., 2008; Catalina et al., 2008a).

Short Tandem Repeats (STR) Typing

STR analysis was carried out using the Geneprint® Fluorescent STR Multiplex- 290 GammaSTR® kit (Promega, Madison, WI). Electropherogram data were collected with 292 the ABI PRISM 3100 DNA Sequencer (Applied Biosystems), and analyzed using the 293 Genotyper®3.7 software (Applied Biosystems) as previously described (Catalina et al., 2008a).

RESULTS

Y-27632 Rock inhibitor increases cryopreserved embryo survival

Y-27632 has been reported to increase the survival of dissociated hESCs and their cloning efficiency and to improve their survival upon cryopreservation (Watanabe et al., 2007; Martín-Ibañez et al., 2008; Li et al., 2008, 2009). However, whether the treatment of cryopreserved human embryos with Y-27632 facilitates embryo survival still needs to be examined. As shown in our experimental approach (**Figure 1**), 219 poor-quality human embryos which had been cryopreserved between 1995 and 2004 were thawed to establish hESC lines. Embryos were randomly treated with (n=110) or without (n=109) 10µM of the Y-27632. Treatment with Y-27632 induced a 52% increase in embryo survival: 30 surviving embryos out of 110 thawed embryos

ANEXO 9

(27.3%) and 20 surviving embryos out of 109 thawed embryos (18%) in the presence and absence of Y-27632, respectively. Thus, Y-27632 treatment increases the survival of thawed embryos.

Human MSCs facilitate the derivation of hESC lines from frozen poor-quality embryos regardless the ICM isolation method

Next, we attempted to optimize the hESC derivation process from frozen poor-quality embryos treated with or without Y-27632. We compared the effect of two distinct human feeders (hMSCs *versus* HFFs) and two different ICM isolation methods on the efficiency of hESC establishment. Surviving embryos which reached the blastocyst stage were randomly transferred to a feeder layer composed of hMSCs or HFFs to ascertain which of these allogenic human feeders better support the expansion of the ICM and subsequent establishment of hESC lines. The ICM isolation method consisted of whole blastocyst culture (WBC) alone for blastocysts with indistinguishable ICM or WBC followed by laser drilling (LD) for human blastocysts with a large and distinguishable ICM.

Out of the fifty embryos which survived the cryopreservation procedure and reached the blastocyst stage (**Figure 2A-C**), 29 were plated on hMSCs and 21 on HFFs (**Figure 1**). The ICM was subsequently isolated using either WBC (n=39, **Figure 2D**) or laser-assisted WBC (n=11, **Figure 2E**), depending on the blastocyst quality. ICM outgrowths (**Figure 2F**) were allowed to expand. Expanded ICMs were subsequently transferred to freshly prepared feeders and allowed to grow further to give rise to hESC lines. Human MSCs used as feeders facilitated ICM outgrowth and hESC derivation: three hESC lines could be derived on hMSCs (3 hESC lines out of 29 blastocysts; 10.3% efficiency) whereas no hESC line could be derived on HFFs (0 hESC lines out of 21 blastocysts; 0% efficiency) (**Figure 1**). However, neither ROCK inhibition nor the ICM isolation method contributed to an increased efficiency of hESC establishment (**Figure 1**). The three hESC lines derived on hMSCs termed GRA-1,-2, -3 were fully characterized. The STR typing

ANEXO 9

profile (**Supplementary Figure 1**) clearly differs among GRA-1, GRA-2 and GRA-3 confirming the unique identity of these independently derived hESC lines and lack of cross-contamination among them. Taken together, our data suggest that hMSCs significantly increase the efficiency of hESC derivation from frozen poor-quality embryos while neither ROCK inhibition nor the ICM isolation method seems to enhance the efficiency of hESC establishment.

***In vitro* and *in vivo* full characterization of the hESC lines derived on hMSCs**

GRA-1, GRA-2 and GRA-3 hESC lines have been cultured for over 28 passages so far in either hMSCs and also in feeder-free conditions using matrigel and MSC-conditioned media (MSC-CM). No differences in *in vitro* and *in vivo* pluripotency and culture homeostasis were observed among these hESC lines maintained in hMSCs and those grown in MSC-CM (data not shown). These hESC lines derived on hMSCs retained typical hESC morphology (**Figure 2G,H**) and expression of the pluripotency-associated surface markers AP (**Figure 3A**), Tra-1-60 (**Figure 3B**), Tra-1-81 (**Figure 3C**), SSEA-3 (**Figure 3D**) and SSEA-4 (**Figure 3E**). Immunocytochemistry staining was confirmed by flow cytometry (**Figure 3 right panels**). Similarly, all the three hESC lines expressed the transcription factors Oct3/4, Nanog, Rex-1 and Sox-2 (**Figure 4A**) and remained karyotypically stable (**Figure 4B**). Functionally, these hESC lines successfully differentiated *in vitro* through EB formation (**Figure 5A; left panel**) into tissues representing the three germ layers: ectoderm (β -III-Tubulin+ cells; **Figure 5A**), mesoderm (Actin+ cells; **Figure 5A**) and endoderm (α -fetoprotein+ cells; **Figure 5A**). The gold-standard pluripotency assay relies on the ability to form teratomas *in vivo* upon injection into immune-deficient mice. The three hESC lines derived and maintained in hMSCs formed teratomas 8-10 weeks after inoculation. These complex and disorganized tumours

ANEXO 9

contained a variety of tissues representing the three germ layers (**Figure 5B**), demonstrating the pluripotent features of the hESC lines derived on hMSCs.

DISCUSSION

This study has prospectively examined the use of the Rock inhibitor Y-27632 and hMSC feeders on embryo survival and hESC derivation efficiency from a large cohort of poor-quality human embryos which had been cryopreserved for 4 to 13 years. In addition, two distinct ICM isolation methods (WBC alone *versus* WBC combined with laser-assisted technology) were compared side by side in this cohort of human embryos.

Treatment of cryopreserved embryos with Y-27632 induced a 52% increase in embryo survival. Y-27632 inhibitor has been recently reported to improve the survival of dissociated and cryopreserved hESCs growing in suspension (Watanabe et al., 2007; Martin-Ibañez et al., 2008; Li et al., 2008, 2009). Li *et al* (Li et al., 2009) have very recently proposed through elegant studies a potential mechanism of action for Y-27632. Y-27632 seems to augment survival of hESCs not only by decreasing the level of apoptosis but also through complementary mechanisms such as increasing cellular adhesion by promoting stronger cell-cell interaction between cells (Li et al., 2009). However, to the best of our knowledge, no study has been performed to determine whether Y-27632 inhibitor also improves survival of cryopreserved human embryos. The 52% increase in embryo survival we report, opens up new avenues for investigators and clinicians not only in the field of hESC research but also in human assisted reproduction to explore further potential applications of Y-27632 or analogous compounds in a variety of clinical scenarios. From a more clinical standpoint, whether Y-27632 facilitates IVF, embryo development toward blastocyst stage, improves the efficiency of fertilized eggs achieving the blastocyst stage, enhances embryo survival upon cryopreservation are still unanswered questions. We envision that the previously reported

ANEXO 9

data about the role of Y-27632 on hESCs and our data showing the role of Y-27632 in enhancing human embryo survival upon cryopreservation will encourage further investigations aimed at optimizing protocols in IVF clinics.

We also demonstrate for the first time that hMSCs significantly increase the efficiency of hESC derivation from frozen poor-quality embryos as compared to HFFs (10.5% versus 0%). Three hESC lines (GRA-1, GRA-2 and GRA-3) were successfully derived in hMSCs and have now been maintained genetically stable for over 28 passages on hMSCs and have also been successfully transferred to feeder-free culture and maintained in hMSC-CM. They have been fully characterized and show typical hESC morphology, euploidy, expression of ESC-associated surface markers and transcription factors, and displayed *in vitro* and *in vivo* multilineage developmental potential. The optimization of hESC derivation methods is advisable because all human embryos are a limited resource and, in many countries only cryopreserved human embryos (normally of poor-quality) are legally permitted for research (Cortes et al., 2007b, 2008b). Interestingly, neither the freeze-thaw technique, treatment with Y-27632 nor the ICM isolation method influenced the hESC derivation efficiency. We previously reported with fresh mouse embryos that the efficiency of mESC derivation is superior when the whole-blastocyst culture is combined with laser-assisted technology (Cortes et al., 2008a). However, the laser drilling technology did not offer any improvement over the whole-blastocyst culture when frozen poor-quality human embryos were used instead of fresh mouse embryos which are of better quality. The cellular and molecular mechanisms underlying the role of hMSCs in facilitating embryo development and hESC establishment needs to be elucidated. The signalling pathways that regulate embryo development and promote ESC establishment are largely unknown. However, key developmental pathways including Sonic hedgehog, Notch, Wnt, and bone morphogenic proteins are potential candidates (Bailey et al., 2007; Bueno et al., 2007). In fact, a number of soluble factors produced by supportive

ANEXO 9

stroma/mesenchymal stem cells with novel stem cell expansion activities have been recently identified as part of pathways associated with mesodermal induction (Hutton et al., 2007). It should be mentioned that hESC lines have been successfully derived in HFFs using fresh embryos (Hovatta et al., 2006; Inzunza et al 2003). However, to the best of our knowledge this is the first prospective study comparing two distinct human feeders to improve the derivation of hESC lines from frozen poor-quality embryos.

Culture-expanded hMSCs largely support human hematopoietic stem cells in long-term assays and their differentiation into myeloid, erythroid, megakaryocytic, osteoblastic or B-cell lineages, even in the absence of added cytokines (Cheng et al., 2003). In line with the mesoderm origin of hMSCs, we hypothesize that hESC lines derived on hMSCs may be more prone to differentiation toward mesodermal lineages (Ledran et al., 2008). In fact, preliminary data show that beating hESC colonies and differentiating EBs are much more frequently observed during routine culture in comparison with other hESC lines derived on non-hMSC feeders. Studies are ongoing in our Lab to determine and quantify to what extent these hESC lines derived on hMSCs are predisposed to differentiation into multiple mesodermal tissues.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by the Health Department (0028/2006 & 0030/2006 to P.M) and Innovation Department (P08-CTS-03678 to P.M) of Andalusian Government, The Spanish Ministry of Health (FIS PI070026 to PM and FIS PI08171 to J.L.G-P). Research in J.L.G-P's Laboratory is also supported by the ISCIII-CSJA (EMER07/056) and Marie Curie IRG (FP7-PEOPLE-2007-4-3-IRG). C.B is supported by the FIS-ISCIII (CP07/00059) and the Jose Carreras International Foundation against the Leukemia (FIJC-05/EDThomas 2006). V.R-M is supported by The Marie Curie (FP7-PEOPLE-IIF-2008). We are indebted to ANACER (Spanish Association of IVF clinics) and Dr.

ANEXO 9

Santiago Alvarez (University of Extremadura) for provision of cryopreserved human embryos from couples who voluntarily signed an informed consent. We also thank Teresa de la Cueva, Dr. Sara Sanbonmatsu, Dr. Gema Lucena, Ruth Rubio, Dr. Javier García-Castro and Prof. Francisco Nogales for their outstanding technical assistance.

REFERENCES

Amit M, Margulets V, Segev H, Shakiri K, Laevski I, Coleman R and Itskovitz-Eldor J (2003) Human feeder layers for human embryonic stem cells. *Biol Reprod* 68, 2150-2156.

Bailey JM, Singh PK, Hollingsworth MA (2007) Cancer metastasis facilitated by developmental pathways: Sonic hedgehog, Notch, and bone morphogenic proteins. *J Cell Biochem*, 102:829-839.

Bongso A, Fong CY, Ng SC, Ratnam S (1994) Isolation and culture of inner cell mass cells from human blastocysts. *Hum Reprod* 9,2110-2117.

Bueno C, Lopes LF, Menendez P (2007) Bone marrow stromal cell-derived Wnt signals as a potential underlying mechanism for cyclin D1 deregulation in multiple myeloma lacking t(11;14)(q13;q32). *Blood Cells Mol Dis*, 39:366-368.

Bueno C, Montes R, Garcia-Castro J, Greaves M, Menendez P (2008) Human embryonic stem cells: A potential system for modelling infant leukemia harbouring MLL-AF4 fusion gene. *Drug Discov Today: Dis Models* 4, 53-60.

Bueno C, Montes R, Martin L, Prat I, Hernandez MC, Orfao A, Menendez P (2008) NG2 antigen is expressed in CD34+ HPCs and plasmacytoid dendritic cell precursors: is NG2 expression in leucemia dependent on the target cell where leukemogenesis is triggered?. *Leukemia* 22, 1475-1478.

Catalina P, Bueno C, Montes R, Nieto A, Ligeró G, Sanchez L, Jara M, Rasillo A, Orfao A, Cigudosa J, et al. (2008) Genetic stability of human embryonic stem cells: a first-step toward the

ANEXO 9

development of potencial hESC-based systems for modeling childhood leukaemia. *Leuk Res*. DOI: 10.1016/j.leukres.2008.08.028.

Catalina P, Montes R, Liger G, Sanchez L, de la Cueva T, Bueno C, Leone PE, Menendez P (2008) Human ESC predisposition to karyotypic instability: Is a matter of cell culture adaptation or differential vulnerability among hESC lines due to inherent properties?. *Mol Cancer* 7; 76-82.

Cheng L, Hammond H, Ye Z, Zhan X, Dravid G (2003) Human adult marrow cells support prolonged expansion of human embryonic stem cells in culture. *Stem Cells* 21:131-142.

Cobo F, Navarro JM, Herrera I, Vivo A, Porcel D, Hernández C, Jurado M, García-Castro J, Menendez P (2008) Electron microscopy reveals the presence of viruses in MEFs but neither in HFFs or hMSCs used for hESC maintenance: toward an implementation of microbiological quality assurance program in stem cell banks. *Cloning and Stem Cells* 10, 65-74 .

Cortes JL, Cobo F, Catalina P, Nieto A, Cabrera C, Montes R, Concha A and Menendez P (2007) Evaluation of the laser technique method to isolate the inner cell mass of murine blastocysts. *Biotechnol Appl Biochem* 46, 205-209.

Cortes JL, Antiñolo G, Martinez L, Cobo F, Barnie AH, Zapata A and Menendez P (2007) Spanish stem cell bank interviews examine the interest of couples in donating surplus human IVF embryos for stem cell research. *Cell Stem Cell* 1, 17-20.

Cortes JL, Sánchez L, Catalina P, Cobo F, Bueno C, Martínez-Ramirez A, Barroso A, Cabrera C, Liger G, Montes R et al. (2008) Whole-blastocyst culture followed by laser drilling technology enhances the efficiency of inner cell mass isolation and embryonic stem cell derivation from good- and poor-quality mouse embryos: new insights for derivation of human embryonic stem cell lines. *Stem Cells Dev* 17, 255-267.

ANEXO 9

Cortes JL, Menendez P (2008) Reproductive medicine meets human embryonic stem cell (hESC) research: the need to adjust the regulatory framework to actual expectations and potential detrimental consequences of hESC research. *Fertil Steril*. 10.1016/j.fertnstert.2008.05.041.

Garcia-Castro J, Trigueros C, Madrenas J, Perez-Simon JA, Rodriguez R, Menendez P (2008) Mesenchymal stem cells and their use as cell replacement therapy and disease modeling tool. *J Cell Mol Med* 12, 1-14.

Hovatta O, Mikkola M, Gertow K, Strömberg AM, Inzunza J, Hreinsson J, Rozell B, Blennow E, Andäng M and Ahrlund-Richter L (2003) A culture system using human foreskin fibroblasts as feeder cells allows production of human embryonic stem cells. *Hum Reprod* 18, 1404-1409.

Hovatta O (2006). Derivation of human embryonic stem cells: towards clinical quality. *Reprod Fertil Dev* 16: 823-828.

Hutton JF, D'Andrea RJ, Lewis ID (2007) Potential for clinical ex vivo expansion of cord blood haemopoietic stem cells using non-haemopoietic factor supplements. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2:229-37.

Inzunza J, Gertow K, Strömberg MA, Matilainen E, Blennow E, Skottman H, Wolbank S, Ahrlund-Richter L, Hovatta O (2005) Derivation of human embryonic stem cell lines in serum replacement medium using postnatal human fibroblasts as feeder cells. *Stem Cells*, 23: 544-549.

Kim HS, Oh SK, Park YB, Anh HJ, Sung KC, Kang MJ, Lee LA, Suh CS, Kim SH, Kim DW et al. (2005) Methods for derivation of human embryonic stem cells. *Stem Cells* 23:1228-1233.

Ledran MH, Krassowska A, Armstrong L, Dimmick I, Renström J, Lang R, Yung S, Santibanez-Coref M, Dzierzak E, Stojkovic M et al. (2008) Efficient hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells on stromal cells derived from hematopoietic niches *Cell Stem Cell* 3, 85-98.

ANEXO 9

Lerou PH, Yabuuchi A, Huo H, Takeuchi A, Shea J, Cimini T, Ince TA, Ginsburg E, Racowsky C and Daley GQ (2008) Human embryonic stem cell derivation from poor-quality embryos *Nat Biotechnol* 26, 212-214.

Li X, Meng G, Krawetz R, Liu S and Rancourt DE (2008) The ROCK inhibitor Y-27632 enhances the survival rate of human embryonic stem cells following cryopreservation. *Stem Cells Dev* 17, 1079-1085.

Li X, Krawetz R, Liu S, Meng G and Rancourt DE (2009) ROCK inhibitor improves survival of cryopreserved serum/feeder-free single human embryonic stem cells. *Hum Reprod* (in press).

Martin-Ibañez R, Unger C, Strömberg A, Baker D, Canals JM and Hovatta O (2008) Novel cryopreservation method for dissociated human embryonic stem cells in the presence of a ROCK inhibitor. *Hum Reprod* 23, 2744-2754.

Menendez P, Wang L and Bhatia M (2005) Genetic manipulation of human embryonic stem cells: a system to study early human development and potential therapeutic applications. *Current Gene Therapy* 5, 375-385.

Menendez P, Bueno C, Wang L (2006). Human embryonic stem cells: A journey beyond cell replacement therapies. *Cytotherapy* 8, 530-541.

Montes R, Ligeró G, Sanchez L, Catalina P, de la Cueva T, Nieto A, Melen G, Rubio R, García-Castro J, Bueno C, Menendez P (2009) Feeder-free maintenance of hESCs in mesenchymal stem cell-conditioned media: distinct requirements for TGF- β and IGF-II. *Cell Res* (in press).

Narumiya S, Ishizaki T and Uehata M (2000) Use and properties of ROCK-specific inhibitor Y-27632. *Methods Enzymol* 325, 273-284.

ANEXO 9

Park SP, Lee KS, Ah Shin H, Cho HY, Chung KS, Kim EY and Lim JH (2004) Establishment of human embryonic stem cell lines from frozen-thawed blastocysts using STO cell feeder layers. *Hum Reprod* 19, 676-684.

Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A and Bongso A (2000) Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol* 18, 399-404.

Schäffler A and Büchler C (2007) Concise review: adipose tissue-derived stromal cells-basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells* 25, 818-827.

Solter D and Knowles BB (1975) Immunosurgery of mouse blastocysts. *Proc Natl Acad Sci USA* 72, 5099-5102.

Tanaka N, Takeuchi T, Neri QV, Sills ES and Palermo GD (2006) Laser-assisted blastocyst dissection and subsequent cultivation of embryonic stem cells in a serum/cell free culture system: applications and preliminary results in a murine model. *J Transl Med* 4, 20-32.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshal VS and Jones JM (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145-1147.

Turetsky T, Aizenman E, Gil Y, Weinberg N, Shufaro Y, Revel A, Laufer N, Simon A, Abeliovich D, Reubinoff BE (2008) Laser-assisted derivation of human embryonic stem cell lines from IVF embryos after preimplantation genetic diagnosis. *Hum Reprod* 3:46-53.

Uccelli A, Moretta L and Pistoia V (2008) Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol* 8, 726-736.

Watanabe K, Ueno M, Kamiya D, Nishiyama A, Matsumura M, Wataya T, Takahashi JB, Nishikawa S, Nishikawa S, Muguruma K et al. (2007) A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 25,681-686.

ANEXO 9

LEGEND TO FIGURES:

Figure 1. Experimental strategy used for the derivation of hESC lines from poor-quality frozen embryos using hMSCs. Two hundred and nineteen frozen poor-quality human embryos were used in the present study. Embryos were randomly treated with (n=110) or without (n=109) a chemical ROCK inhibitor (Y-27632). Surviving embryos which reached the blastocyst stage were transferred to a feeder layer of hMSCs or HFFs to ascertain which of these allogenic human feeders better support the expansion of the ICM and subsequent establishment of hESC lines. The ICM isolation method consisted of whole blastocyst culture (WBC) followed by laser drilling (LD) for human blastocysts with a large and distinguishable ICM. For blastocysts with very small or indistinguishable ICM, WBC was used for ICM isolation. Established hESC lines were fully characterized by morphology, immunocytochemistry, flow cytometry, karyotyping, STR analysis and *in vitro* and *in vivo* differentiation potential into the three germ layers.

Figure 2. Representative pictures depicting the hESC derivation process from frozen-thawed human embryos. **A)** Representative day-3 poor-quality embryos immediately after thawing. **B)** Blastocyst in the cavitation stage. **C)** Poor-quality expanded blastocyst. **D)** Outgrowth of a representative blastocyst adhered to hMSCs 3 days after ICM isolation (WBC technique). The asterisk indicates the ICM. **E)** Outgrowth of a representative blastocyst adhered to hMSCs 3 days after isolation method (WBC+LD). The asterisk shows the ICM. The black arrows depict the exact laser shots (white dots). **F)** Replating of the expanded ICM onto hMSCs on passage 1 of culture. **G)** Typical morphology of a hESC colony growing on hMSCs after >30 passages. **H)** A T25-flask phase-contrast image showing multiple hESC colonies growing on MSCs for >30 passages.

ANEXO 9

Figure 3. Phenotypic characterization of the hESCs derived on hMSCs. **A)** Phase-contrast image (left panel) and representative alkaline phosphatase (AP, right panel) staining. **B)** Immunocytochemistry staining against Tra-1-60. **C)** Immunocytochemistry staining against Tra-1-81. **D)** Immunocytochemistry staining against SSEA-3. **E)** Immunocytochemistry staining against SSEA-4. Nuclei were counterstained with 4,6-diamino-2-phenylindole (DAPI, blue). The right panels confirm the expression of Tra-1-60, Tra-1-81, SSEA-3 and SSEA-4 by flow cytometry. Isotypes are shown as insets.

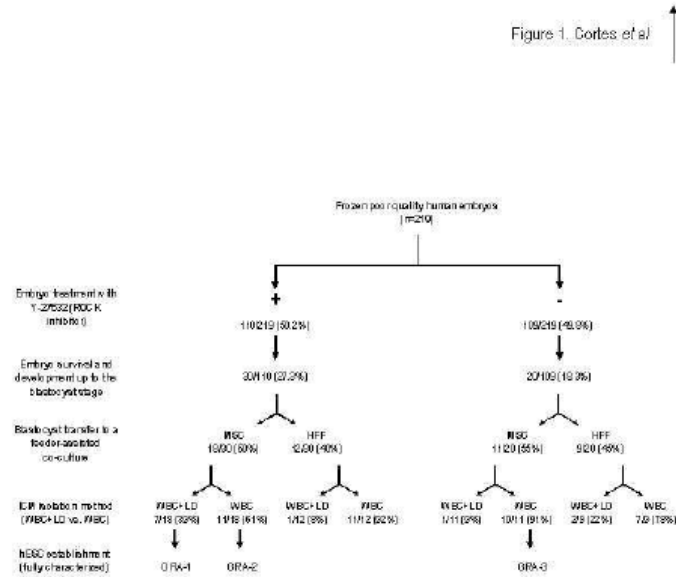
Figure 4. Molecular and cytogenetic characterization of the hESCs derived on hMSCs. **A)** RT-PCR analysis showing expression of Oct 3/4, Nanog, Rex1 and Sox2 in undifferentiated hESC cultures. GAPDH was used as housekeeping gene. **B)** A representative G-banding analysis depicting euploid karyotype.

Figure 5. hESC lines derived on hMSCs and maintained in hMSCs or hMSC-CM retain potential for three germ layer differentiation. **A)** Histological analysis of EBs showing spontaneous *in vitro* differentiation into ectoderm (β -III Tubulin +), mesoderm (Actin +) and endoderm (α -fetoprotein +). **B)** Teratomas developed 6-10 weeks after inoculation of hESCs under the testicular capsule. Histological studies revealed the presence of tissues representing the three germ layers: ectoderm (left panels), mesoderm (middle panels) and endoderm (right panels). Representative image of a control testicle non-injected with hESCs showing normal seminiferous tubules is shown.

Suppl Figure 1. STR Analyses of the newly derived hESC lines. Distinct STR profiles for GRA-1, GRA-2 and GRA-3 hESC lines.

ANEXO 9

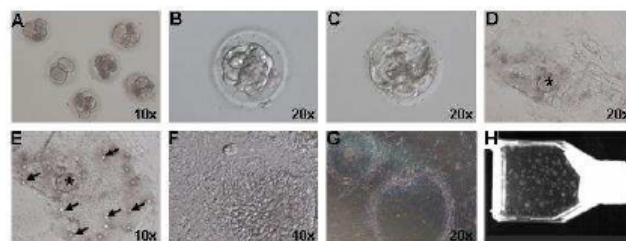
Figure 1. Cortes et al



190x254mm (96 x 96 DPI)

ANEXO 9

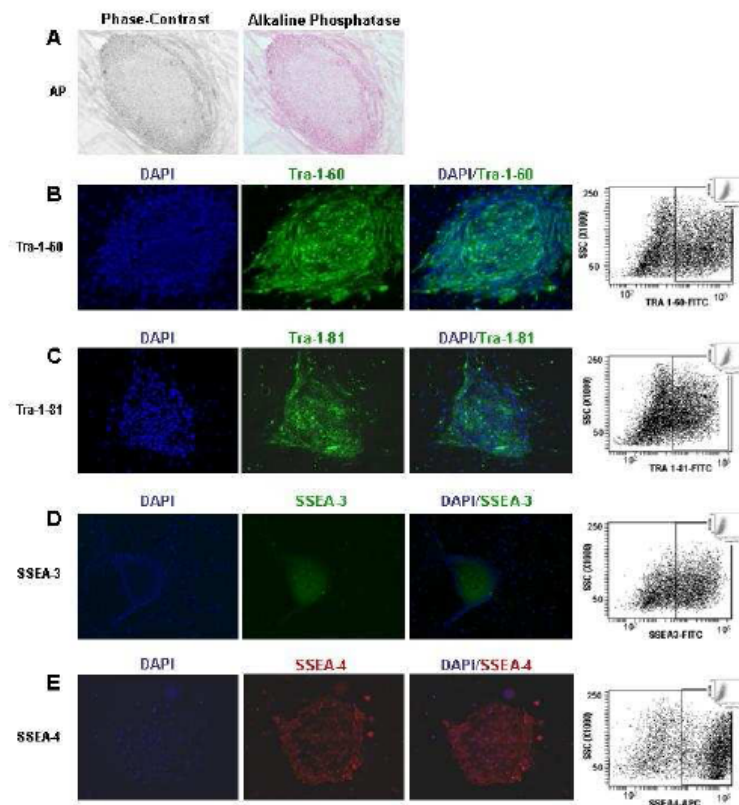
Figure 2. Cortes *et al*



190x254mm (96 x 96 DPI)

ANEXO 9

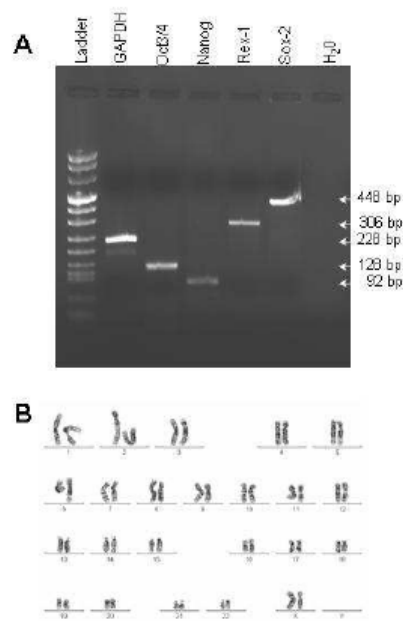
Figure 3. Cortes et al



190x254mm (96 x 96 DPI)

ANEXO 9

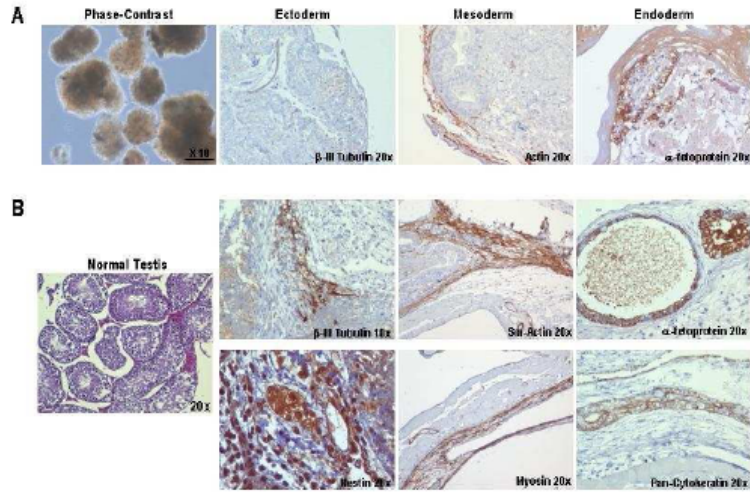
Figure 4. Cortes et al



190x254mm (96 x 96 DPI)

ANEXO 9

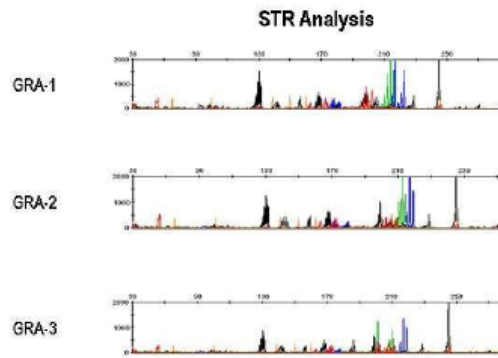
Figure 5. Cortex of *M*



254x190mm (96 x 96 DPI)

ANEXO 9

Suppl Figure 1. Cortes *et al* ↑



254x190mm (96 x 96 DPI)

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN

Importancia de un laboratorio de embriología y la presencia de un embriólogo en el proceso de derivación de hESCs.

Tradicionalmente, el laboratorio de embriología ha estado enfocado siempre para realizar técnicas de reproducción asistida, concretamente dentro del campo de FIV. Sin embargo, tras el descubrimiento de las hESCs y su contribución en futuras aplicaciones en medicina regenerativa, existen numerosos centros de investigación y bancos de tejidos que han introducido programas de derivación de hESCs usando embriones congelados sobrantes de ciclos de FIV, dando al laboratorio de embriología una nueva perspectiva.

La derivación de hESCs y el mantenimiento de su viabilidad requieren técnicas meticulosas y procesos libres de cualquier contaminación. Este último aspecto es crucial en el proceso de derivación de hESCs debido al limitado número de embriones disponibles y a la tasa de éxito que se está consiguiendo actualmente (Hoffman et al., 2005).

Las hESCs son obtenidas principalmente de la ICM de los blastocistos. En este proceso, las colonias conseguidas con morfología indiferenciada son seleccionadas y subcultivadas buscando obtener líneas celulares estables fenotípica y genotípicamente, además de estar libres de contaminación.

Para poder realizar este proceso es importante la figura de un embriólogo experto en la manipulación de embriones. Además, se necesitan también unas infraestructuras y equipamiento adecuados para poder realizar con garantías la derivación de hESCs. Este laboratorio de embriología debe ser una estructura organizativa dinámica basada en la aplicación tanto de programas de calidad como de bioseguridad. Por lo tanto, el proceso de derivación de hESCs debería ser llevado a cabo en un área específica por personal cualificado en la descongelación de embriones y posterior evolución al estadio de blastocisto. Este propósito es muy similar al realizado en un laboratorio de FIV, aunque existen diferencias claras en el destino final de los embriones, si lo comparamos con el laboratorio de embriología propuesto para un centro de investigación dedicado a derivar hESCs. Además, para realizar la manipulación de embriones destinados a derivar hESCs para una futura aplicación terapéutica se necesitarían salas blancas procurando una manipulación del material biológico aséptica, trabajando además con un

sistema de monitorización ambiental que reduzca el riesgo de contaminación (Cobo et al., 2005, 2006a, 2006b). Estas diferencias impiden la extrapolación de los consejos propuestos por las diferentes guías, publicadas por las principales Asociaciones Internacionales de Reproducción Asistida, al laboratorio de embriología propuesto para la derivación de hESCs.

Recuperación de embriones sobrantes de ciclos de FIV para investigación con células madre: experiencia en el Banco Andaluz de Células Madre.

Actualmente, existe una discusión extensa acerca de los aspectos éticos del uso de los embriones humanos para investigación con células madre (Edwards, 2005; ESHRE Taskforce on Ethics and Law, 2002; McLaren, 2001). Parte de esta discusión expresa el intenso debate público que existe sobre los aspectos éticos y demás implicaciones que ofrecen las técnicas de FIV y los procesos derivados de las mismas (Edwards y Beard, 1997). En los tratamientos de FIV, el número de embriones generado excede la mayoría de las veces del necesario para satisfacer el deseo de maternidad de una pareja, haciendo de los embriones sobrantes de estos ciclos, una fuente de material biológico sin precedentes para poder llevar a cabo investigaciones con células madre. En el año 2003, la Asociación Norteamericana SART-RAND estimó en 400.000 los embriones congelados en Estados Unidos tras consultar a 430 clínicas de reproducción (Hoffman et al., 2003; Kaiser Network, 2007). En el mismo año, se estimó que en España había 100.000 embriones congelados tras consultar a 203 clínicas de reproducción. Aún siendo un país de gran tradición católica, España actualmente disfruta de una legislación permisiva y un buen ambiente ético respecto al uso de embriones sobrantes de ciclos de FIV para su destino a investigación con células madre (Ley 14/2006, Ley 14/2007).

Los bancos de líneas celulares necesitan derivar nuevas hESCs para la distribución internacional de las mismas, y como material para sus proyectos de investigación propios.

Hemos examinado el interés de 97 parejas sometidas a una entrevista donde se buscaba que tomaran una decisión acerca del destino de sus embriones congelados. En este estudio, casi la mitad de las parejas

entrevistadas optaron por la donación de sus embriones a investigación, frente a un 2.8% en el estudio realizado por SART-RAND.

Aunque nuestro objetivo y el de SART-RAND publicado en 2003 han sido claramente diferentes, nuestros resultados han contrastado en gran medida con los que obtuvo esta Asociación Norteamericana. En nuestra opinión, existen razones que explicarían estas diferencias (Tabla 6).

- a) El objetivo principal del estudio realizado por SART-RAND fue determinar, mediante un cuestionario, el número de embriones que serían destinados a investigación. En cambio, nuestro objetivo fue conocer el número de embriones congelados durante más de 3 años y la tasa de embarazo conseguida.
- b) El estudio de SART-RAND se llevó a cabo mediante el envío postal de un cuestionario. En vez de eso, nuestro estudio se llevó a cabo mediante una entrevista personal formal. Encontramos que esta estrategia ayudó a las parejas a resolver sus dudas tanto en los aspectos éticos como científicos. Estas entrevistas se realizaron de manera objetiva, evitando el riesgo de ser persuasivos para facilitar la donación a la investigación.
- c) La encuesta realizada por SART-RAND incluyó a parejas en diferentes pasos dentro del proceso de FIV, incluyendo parejas que aún no se habían sometido a la intervención, así como parejas en pleno proceso de tratamiento. Este hecho se tradujo en que la mayoría de las parejas optaron por seguir conservando sus embriones congelados para poder disponer de ellos en un futuro. Sin embargo, en nuestro estudio, las 97 parejas llevaban con los embriones congelados más de 3 años. Llegados a este punto, aproximadamente el 35% de las parejas tenían niños, y cerca del 30% de ellas obtuvieron gemelos, mientras que sólo unas pocas tuvieron trillizos.

Tabla 6: Razones potenciales que explican las diferencias en el programa de donación de embriones a investigación con hESCs entre nuestro estudio y el publicado por SART-RAND.

Razones posibles para la diferencia entre estudios	Hoffman et al. (2003)	Estudio del BACM
Porcentaje de embriones donados a investigación	2.8%	45%
Propósito del estudio	1.-Determinar el número de embriones almacenados en las clínicas de EEUU 2.-Determinar posteriormente el porcentaje de parejas que donarían sus embriones a investigación con hESCs	Determinar el número de parejas que donarían sus embriones a investigación con hESCs partiendo de una cohorte de pacientes con embriones congelados durante más de 3 años conociendo la tasa de embarazo.
Tipo de comunicación entre las clínicas de FIV y las parejas	Cuestionario enviado a las parejas	Entrevista personal
Estrategia para reducir la confusión sobre aspectos éticos y científicos	No evaluado	Presencia durante la entrevista de un embriólogo experto supervisado por el responsable de la clínica de reproducción
Tiempo transcurrido para el reestablecimiento del contacto con las parejas	Antes o justamente después de haberse realizado el ciclo FIV	3-4 años después de la congelación de los embriones sabiendo que la tasa de embarazo rondaba el 40%

Como fue lógico, estas circunstancias hicieron que la donación de los embriones sobrantes a investigación fuera más factible. De hecho, nosotros sospechamos que si en el estudio llevado a cabo por SART-RAND se hubiera optado por una entrevista personal, habrían aparecido parejas con embriones de más de 3 años de congelación, que habrían donado sus embriones a investigación, y los resultados habrían sido más próximos a los obtenidos en nuestro estudio. Además, aunque la donación de embriones frescos a investigación está prohibida en muchos países, un estudio realizado en Suecia, donde este proceso sí está permitido, encontró una gran proporción de parejas (92%) que prefirieron donar los embriones que carecían de calidad necesaria para ser transferidos o congelados a investigación antes de que fueran destruidos (Bjuresten y Hovatta, 2003). Por esta razón, si hubiera un cambio de legislación en España, sería posible acceder a embriones frescos descartados por su mala calidad como fuente de material biológico para investigación.

Conexión entre la medicina reproductiva y la investigación con hESCs: necesidad de ajustar el marco legislativo a las actuales expectativas y a las posibles consecuencias perjudiciales que la investigación con hESCs podría conllevar.

Como hemos mencionado en el apartado 1 de esta discusión, la presencia de un embriólogo en un centro de investigación o banco de líneas celulares es importante para derivar hESCs. En nuestra experiencia, los embriólogos expertos con muchos años de experiencia en reproducción asistida, y que han cambiado su carrera profesional para realizar investigación básica/terapéutica con hESCs van a necesitar un periodo de adaptación a nivel legislativo. Desafortunadamente, en muchas circunstancias, estos embriólogos que han trabajado bajo un ambiente clínico pierden su motivación científica al comenzar a trabajar en investigación básica y se formulan preguntas concernientes a lo que ellos piensan que es una extremadamente rigurosa legislación al respecto para poder realizar diariamente su trabajo. Brevemente, desde una perspectiva ética y moral, el embriólogo clínico destaca que ellos son capaces de realizar su trabajo de reproducción asistida sin necesidad de utilizar salas GMP y con menos regulación a nivel legislativo, consiguiendo el nacimiento de niños sanos. Estos embriólogos consideran que debido a vacíos éticos y legales, la investigación con hESCs está regulada de manera muy estricta y que están obligados a trabajar bajo rigurosas y exhaustivas regulaciones con los mismos requerimientos aplicados a todo el tejido embrionario.

La Directiva 2004/23/EC cubre tanto a las clínicas de FIV como a los bancos de tejidos. En los primeros borradores de la Directiva se observaron unos requisitos de calidad muy exigentes, sobre todo con respecto a la calidad del aire tipo A de las salas GMP donde se iban a manipular estos tejidos y células. Esta Directiva ha sido evaluada por profesionales envueltos en reproducción asistida, criticando el impacto que sufrirían las clínicas de reproducción si tuvieran que cumplir todas las exigencias de la Directiva (Mortimer, 2005). Estas críticas son, en nuestra opinión, pragmáticas tanto desde un punto de vista financiero como político, ya que este tipo de requerimientos se traduciría en una gran inversión de adaptación de los

laboratorios, que conllevaría el encarecimiento de los ciclos de FIV. Muchas parejas no podrían permitirse el gasto monetario para realizarse el ciclo, con lo que disminuiría la demanda, y muchas clínicas de reproducción tendrían la obligación incluso de cerrar.

Las hESCs están llegando a ser una herramienta biológica sin precedentes, no sólo para terapia celular, sino en investigación básica en el campo de la embriología humana, modelos de enfermedad, efectividad de drogas e investigación con cáncer (Bueno et al., 2008). La Directiva Europea sólo cubre la investigación cuando va a tener una aplicación directa en humanos, y no regula los tipos de investigación básica descritos arriba. Esto sugiere que hay una necesidad urgente de establecer comités que regulen el desarrollo de políticas de responsabilidad.

En el momento que la investigación con hESCs tenga una aplicación terapéutica para trasplante alogénico, decenas e incluso miles de pacientes van a estar expuestos a riesgo de contaminación cruzada debido al trasplante con este tipo de células (Braude et al., 2005), lo que sugiere que la seguridad y calidad del proceso tiene que ser demostrada antes de iniciarse, para que se produzca un verdadero beneficio en el paciente. Por el contrario, en una clínica de reproducción asistida que tiene puesto a punto un programa de donación de embriones, esta donación sería para un número mucho menor de pacientes. Por ello, existen algunas cuestiones que deberían ser analizadas minuciosamente para confirmar si estas regulaciones pueden ser usadas para medicina reproductiva, para investigación con hESCs, o para ambas.

Aunque el número de hESCs se ha incrementado considerablemente en los dos últimos años, pocas líneas han sido completamente caracterizadas, lo que hace que no tengan la seguridad y eficacia necesarias para poder ser utilizadas (Braude et al., 2005). Hasta ahora, la mayoría de las hESCs establecidas no han sido cultivadas en condiciones para ser utilizadas en aplicación en humanos. Incluso los embriones de los que provienen estas hESCs carecen de condiciones de cultivo adecuadas para trasplante en muchas ocasiones. Nosotros pensamos que el uso prematuro de una terapia celular utilizando hESCs pondría a muchos pacientes en riesgo de sufrir enfermedades virales y priónicas (Cobo et al., 2005, 2008).

En nuestra opinión, debe existir un periodo de adaptación en aquellos embriólogos expertos en reproducción que ahora están envueltos en investigación con hESCs. En esta adaptación, estos embriólogos deben comportarse como auténticos manipuladores de tejido destinado a ser transplantado, y este hecho es el que conlleva que operen según unas reglas legales más estrictas. Sin embargo, aunque deben existir unas mínimas reglas para la investigación básica con hESCs, no deben ser tan estrictas en este campo, ya que harían el proceso más lento y dificultoso, además de provocar que muchos laboratorios no puedan realizar este tipo de estudios, al no poder hacerse cargo de la inversión que exige la Directiva.

Evaluación de una técnica láser para el aislamiento de la ICM de blastocistos de ratón.

Tras los resultados obtenidos en este primer estudio piloto, donde hemos evaluado la utilización de un nuevo modelo de derivación de ESCs en modelo murino utilizando la técnica láser, publicada por primera vez por el grupo de Palermo (Tanaka et al., 2006), observamos que el método de cultivo directo del blastocisto propuesto por Kim (Kim et al., 2005) fue más efectivo que la técnica láser respecto al grado de adhesión y aislamiento de la ICM (70% versus 52,4%). Teniendo en cuenta que para este estudio utilizamos la técnica láser solamente para los blastocistos de buena calidad, y que la única desventaja del método de cultivo directo es el riesgo de que las células del trofoectodermo enmascaren a las de la ICM (Bongso et al., 1994), somos de la opinión de que la técnica láser es aún susceptible de ser mejorada. Además, pensamos que es importante tener en cuenta la calidad de los blastocistos murinos para seleccionar el método de derivación más adecuado para poder extrapolarlo en un futuro al modelo humano.

Por otra parte, independientemente del método de aislamiento de la ICM utilizado, es una opinión generalizada que las hESCs derivadas sobre MEFs no deben ser utilizadas para una futura aplicación terapéutica. Este hecho ha animado a diversos grupos de investigación a crecer las células sobre células alimentadoras humanas (Genbacev et al., 2005), células inmortalizadas (Park et al., 2004), células alimentadoras que provienen de hESCs (Stojkovic et al.,

2005) y el cultivo en Matrigel™ (Amit et al., 2003). En este estudio piloto nosotros encontramos mejor tasa de adhesión cuando usamos MEFs frente al uso de gelatina utilizando al técnica de láser (80% versus 27,3%). Usando el método de cultivo directo del blastocisto obtuvimos mejor tasa de adhesión usando gelatina, pero con una diferencia muy pequeña respecto al uso de MEFs (66,7% versus 75%). Si uno de nuestros propósitos es no tener que depender del cultivo e inactivación de células alimentadoras para mantener los cultivos de células madre, debemos incrementar nuestros esfuerzos en conseguir un cultivo de calidad sobre superficies de crecimiento libres de células. Además, el uso de MEFs puede presentar riesgos especiales de contaminación microbiológica en el cultivo de hESCs (Ej. micoplasmas, bacterias, levaduras y hongos) (Stacey et al., 2006). Del mismo modo, la contaminación viral de células alimentadoras es un riesgo común en todos los productos biotecnológicos derivados de líneas celulares, independientemente del origen de las especies (Cobo et al., 2006b).

El cultivo directo del blastocisto seguido de tecnología láser mejora la eficiencia en el aislamiento de la masa celular interna y en el establecimiento de una línea celular a partir de embriones de buena y mala calidad.

Profundizando en los resultados preliminares obtenidos en el experimento piloto discutido en el apartado anterior, el Banco Andaluz de Células Madre ha seguido aunando esfuerzos con el objetivo de optimizar nuevos métodos de derivación de hESCs que aumenten la eficiencia de derivación. La mejor manera teórica de realizar estas innovaciones sería utilizando embriones humanos. Sin embargo, esto representa un reto científico y logístico por diversas razones:

- a) Muchos países europeos, así como Estados Unidos tienen regulaciones estrictas respecto al uso de embriones para investigación, y que les impiden desarrollar proyectos de investigación (Ej. derivación de hESCs utilizando tecnologías innovadoras).
- b) Muchos laboratorios no tienen acceso a embriones sobrantes de ciclos de FIV.

- c) El uso de embriones humanos implicaría una gran pérdida de material biológico muypreciado cuando aún no se sabe la eficiencia de las nuevas estrategias de derivación.

Aunque existen diferencias entre la embriogénesis de ratones y humanos, los experimentos en modelo murino podrían ser extrapolados al modelo humano. En nuestro caso podrían dar respuesta a nuevas estrategias para derivar hESCs.

En este experimento desarrollamos una nueva estrategia basada en la combinación del cultivo directo de los blastocistos seguida de la destrucción de las células del trofoectodermo mejorando la eficiencia de aislamiento de la ICM y derivación de ESCs. Hemos demostrado que estos dos parámetros son significativamente superiores utilizando esta técnica que utilizando el cultivo directo del blastocisto y la tecnología láser como métodos aislados. Debemos apuntar que nuestra eficiencia de derivación no es la más alta del panorama científico, superada por los estudios de otro grupo (Bryja et al., 2006a, 2006b). Aparte de que nuestro estudio difiere del de Bryja en el uso de distintas cepas de ratón, nuestra menor tasa de derivación también es debida al uso de distintos enfoques técnicos. Nuestro objetivo fue innovar con un nuevo método físico basado en la utilización del láser y no evaluar medios y condiciones de cultivo diferentes. Además, en este experimento hemos querido tener en cuenta la calidad de los blastocistos para plicar la técnica del láser. Hemos querido optimizar y comparar nuestra nueva tecnología en blastocistos de buena y mala calidad, buscando si en blastocistos de mala calidad se podría aumentar la eficacia en el aislamiento de la ICM y derivación de ESCs, teniendo en cuenta que estos blastocistos no pueden ser utilizados con otros métodos de derivación.

Nosotros pensamos que además del método de aislamiento de la ICM, la calidad del blastocisto representa un factor clave en la tasa de derivación de ESCs. Somos además conscientes de que los blastocistos humanos disponibles para derivación de hESCs son de mucha peor calidad que los blastocistos de ratón, lo que explica que las tasas de derivación de hESCs publicadas por distintos grupos sean extremadamente bajas (Findikli et al., 2006), pero también tenemos que tener en cuenta que en muchos países estos embriones sobrantes de ciclos de FIV tienen que ser congelados o

directamente descartados sin que puedan ser usados para derivación de hESCs (Jones et al., 2006, Cortes et al. 2007). Todo lo dicho hasta ahora indica que en raras ocasiones se tiene en cuenta la calidad de los blastocistos antes de tomar la decisión de que método de derivación es el más adecuado (Kim et al., 2005).

Independientemente de la calidad del blastocisto y del método de derivación usado, el establecimiento y mantenimiento de ESCs parece ser dependiente del uso de células alimentadoras como superficie de crecimiento (Bryja et al., 2006a, 2006b). La necesidad de células alimentadoras para la derivación de ESCs ha sido previamente documentada. Sin embargo, muchas ESCs pueden ser mantenidas en ausencia de cualquier clase de células alimentadoras. En un intento de ganar conocimientos en la pregunta de por que las ESCs no pueden ser derivadas sin MEFs (Bryja et al., 2006a, 2006b), quisimos comprobar si era posible crecer la células en una superficie libre de células. Nuestros datos sugirieron que, independientemente del método de derivación utilizado y la calidad de los blastocistos, la proporción de blastocistos que se adhieren a la superficie fue del 74% en MEFs frente al 66% en gelatina, consiguiendo destrucción del trofoectodermo, aislamiento de la ICM, siendo capaces de crecer durante 1-3 pases. Debido a que no hubo diferencias significativas, proponemos que la gelatina puede ser una superficie adecuada para la adhesión inicial y desarrollo temprano de las colonias primarias. Sin embargo, tras 1-3 pases, las colonias siguen creciendo sobre MEFs consiguiéndose en los casos descritos colonias de hESCs. Sin embargo, en gelatina las ICM interrumpen su crecimiento y comienzan a degenerar tras 1-3 pases. Teniendo esto en cuenta, parece que el cultivo en MEFs es requerido para la expansión y mantenimiento de las colonias de hESCs, aunque respecto a la adhesión de la ICM sí que es independiente de la superficie de crecimiento utilizada. Esto ha sido demostrado recientemente (Bendall et al., 2007). Este trabajo muestra que el mantenimiento de hESCs sobre superficies libres de células alimentadoras depende de una interrelación dinámica entre estas células y otras derivadas de ellas con aspecto fibroblástico, estableciendo lo que se ha denominado como nicho de células madre.

Desde nuestro punto de vista, la contribución mayor de este estudio es el hecho de que esta nueva técnica de combinación del cultivo directo del blastocisto con la tecnología láser puede ser aplicada equitativamente con éxito tanto para embriones de buena y mala calidad. Estos últimos no pueden ser usados solamente con la técnica de disparo láser debido a la imposibilidad de distinguir la ICM. Este avance tecnológico permitiría el aprovechamiento de blastocistos humanos de mala calidad para derivación de hESCs, y que en la actualidad son descartados para este fin.

Finalmente, el cultivo prolongado de mESCs (Liu et al., 1997) y de hESCs (Draper et al., 2004; Menendez et al., 2005; Cowan et al., 2004; Inzunza et al., 2004, Imreh et al., 2006) está asociado con cambios en el cariotipo, aunque queda dilucidar si estos cambios de estabilidad genética son dependientes del método de derivación utilizado. En este estudio hemos analizado si el cultivo directo del blastocisto y la tecnología láser hacen a las ESCs más vulnerables a cambios cariotípicos tras cultivo prolongado. Todas las líneas derivadas en este estudio obtuvieron un cariotipo aneuploide tras un periodo de cultivo prolongado, independientemente del método de derivación utilizado, sugiriendo que este no parece influenciar la estabilidad genética. Como ha sido descrito por otros grupos (Liu et al., 1997), la trisomía 8 es la anomalía más frecuente que hemos encontrado en nuestras líneas derivadas utilizando cultivo directo del blastocisto. Sin embargo, utilizando la tecnología láser las líneas derivadas mostraron ganancias en los cromosomas 1 y 2, pero nunca mostraron trisomía del cromosoma 8. Futuros estudios podrán dar explicación a estas diferencias.

Criterios de Valoración Morfológicos de Oocitos, Preembriones tempranos y Blastocistos Humanos propuestos por ASEBIR: aplicabilidad en preembriones crioconservados donados para investigación con células madre.

La calidad embrionaria ha sido un factor muy a tener en cuenta en el BACM. En este estudio hemos intentado comparar la calidad embrionaria de los embriones antes y después de la congelación, siguiendo los criterios tradicionales, con la clasificación que tendrían estos embriones utilizando los

nuevos criterios de ASEBIR, con el fin de observar si esta nueva clasificación es extrapolable a los criterios de calidad embrionaria que se deducen serían necesarios para derivar una línea de hESCs. Para poder realizar esta comparación hemos tenido que obviar y transformar algunos términos que sólo son aplicables al campo reproductivo:

- i) Derivación de hESCs en vez de capacidad de implantación
- ii) Día de descongelación en lugar de día de transferencia

Además, hemos observado que en los nuevos criterios de valoración de ASEBIR no se contempla información sobre los embriones congelados, no atendándose por tanto a la posibilidad de que alguna blastómera resulte lisada durante el proceso de descongelación. De esta manera y según el sistema de graduación de ASEBIR, la categoría A sería para el embrión de óptima calidad con máxima capacidad de derivar a hESCs, la categoría B de buena calidad con elevada capacidad de derivar a hESCs, la categoría C de calidad regular con una probabilidad de derivar a hESCs media/baja, y la categoría D para el embrión de mala calidad con una probabilidad de derivar a hESCs baja/nula. Este hecho nos hace sospechar que algunos embriones que hubieran podido tener categoría A ó B previo a la congelación, pasaron a embriones de categoría C ó D al ser descongelados.

Con respecto a los parámetros morfológicos a evaluar por ASEBIR en el estadio de D+2 y D+3, vimos concordancia entre los diferentes criterios de valoración en todas las variables consideradas, excepto en la que se refiere a número celular y ritmo de división. Aunque la hora de la congelación no es un dato que nos hayan facilitado los Centros de Reproducción, obviamos que estuvo en todos los casos dentro de los intervalos de observación recomendados por ASEBIR, siendo en D+2: 44-47 horas post-inseminación, y en D+3: 67-71 horas post-inseminación.

Nos ocurrió lo mismo a la hora de comparar los distintos criterios de valoración de la calidad cuando observamos el estadio de blastocisto. Mientras que vimos concordancia a la hora de evaluar las variables consideradas por ASEBIR como el aspecto de la zona pelucida, aspecto y tamaño de la ICM y del trofoectodermo, y el grado de expansión, cuando evaluamos el día de organización del blastocisto pudimos comprobar que algún embrión que alcanza una calidad blastocitaria óptima respecto a las demás variables, pasó a

ser categoría C solamente porque se organizó en blastocisto en D+6, en lugar de en D+5.

Además, el hecho de que todos los embriones que llegaron a blastocisto fueran congelados en día +3 corrobora los estudios reproductivos en los que mantener en cultivo los embriones un día más antes de la crioconservación (Día+2 vs. Día+3) permite seleccionar mejor la calidad de estos (Sifer et al., 2006). Esto puede tener implicaciones importantes para la selección de embriones congelados destinados a derivar hESCs.

La tasa de éxito en la derivación de hESCs sigue siendo baja actualmente, necesitándose un gran número de embriones para poder derivar un número bajo de líneas establecidas y caracterizadas, sobre todo cuando los embriones a los que se puede optar son los sobrantes de las técnicas de reproducción asistida, y que, por tanto, no fueron prioritarios a la hora de realizar la transferencia. Este hecho ha dado lugar a que muchos grupos de investigación inmersos en la derivación de hESCs utilizando tanto embriones frescos como congelados, comiencen a tener en cuenta la calidad embrionaria de estos embriones (Zhang et al., 2006; Lerou et al., 2008).

Las células madre mesenquimales humanas facilitan la derivación de células madre embrionarias humanas a partir de embriones congelados de mala calidad

Este estudio ha examinado el uso de inhibidor de ROCK Y-27632 y de hMSCs como feeders respecto a la supervivencia embrionaria post-descongelación y la eficiencia en la derivación de hESCs utilizando un amplio número de embriones humanos de mala calidad que llevaban congelados desde 4 a 13 años. Además, dos métodos de aislamiento de la ICM (WBC solo frente una técnica combinada de WBC seguida de LD) fueron comparados utilizando la cohorte de embriones humanos.

El tratamiento de embriones congelados con Y-27632 incrementó un 52% la supervivencia embrionaria. El inhibidor Y-27632 ha sido recientemente utilizado para mejorar la supervivencia de hESCs en suspensión, tanto disociadas y como congeladas (Watanabe et al., 2007; Martin-Ibañez et al., 2008; Li et al., 2008, 2009). El grupo de Li ha propuesto recientemente un

mecanismo de acción para Y-27632, donde parece aumentar la supervivencia de hESCs no sólo por decrecer el nivel de apoptosis, sino porque parece estar relacionado con el incremento de la adhesión celular. Sin embargo, hasta donde llega nuestro conocimiento, no existen estudios determinados si Y-27632 también mejora la supervivencia de embriones humanos congelados. Nosotros observamos un 52% de incremento en la supervivencia, lo que abre nuevas vías de investigación a investigadores no solo en el campo de las hESCs, sino también en el campo de la medicina reproductiva, donde el uso de Y-27632 podría utilizarse en los protocolos de cultivo embrionario en las clínicas de reproducción.

En este estudio también demostramos por primera vez que el uso de hMSCs mejora la eficiencia de derivación de hESCs a partir de embriones de mala calidad comparándolo con el uso de HFFs (10,5% frente a 0%). Tres líneas de hESCs (GRA-1, GRA-2 y GRA-3) fueron derivadas sobre hMSCs. Estas líneas han sido completamente caracterizadas y mostraron una morfología típica de hESCs, euploidía, expresión de marcadores de superficie y factores de transcripción asociados a ESCs. Además sufrieron diferenciación a las tres líneas germinales tanto *in vitro* como *in vivo*.

La optimización de los métodos de derivación de hESCs es conveniente debido a que existe un número limitado de embriones humanos disponibles y, en muchos países sólo se puede disponer de embriones congelados sobrantes de ciclos de IVF (normalmente con una calidad subóptima). En nuestros experimentos, ni la técnica de descongelación, ni el tratamiento con Y-27632, ni el aislamiento de la ICM ha influenciado en la eficiencia de derivación de hESCs. Al contrario de los anteriores experimentos realizados en modelo murino, la tecnología láser no ofrece ninguna ventaja sobre el método de WBC cuando utilizamos embriones congelados humanos de mala calidad.

Los mecanismos celulares y moleculares relacionados con el papel de las hMSCs en la mejora de la eficiencia de derivación de hESCs necesitan ser investigadas. Las vías de señalización que regulan el desarrollo embrionario y promueven el establecimiento de ESCs son aún desconocidas. Sin embargo, existen vías de desarrollo que incluyen Sonic Hedgehog, Notch, Wnt y BMP que podrían ser buenas candidatas (Bailey et al., 2007; Bueno et al., 2007). De hecho, un número de factores solubles producidos por células

madre mesenquimales estromales junto con nuevas actividades de expansión de células madre ha sido recientemente identificado como parte de las vías asociadas con la inducción a mesodermo (Hutton et al., 2007).

Anteriormente, nuevas hESCs habían sido establecidas a partir de embriones frescos sobre HFFs (Hovatta et al., 2006; Inzunza et al., 2003). Sin embargo, creemos que este ha sido el primer estudio prospectivo comparando dos tipos distintos de feeders buscando mejorar la tasa de derivación de hESCs a partir de embriones congelados de mala calidad.

El cultivo expandido de hMSCs soporta de manera muy efectiva a las células madre hematopoyéticas en ensayos de larga duración, así como facilita su diferenciación a línea mieloide, eritroide, megacariocítica, osteoblástica, o de líneas B-celulares, incluso en la ausencia de citoquinas añadidas (Cheng et al., 2003). En relación con el origen mesodérmico de las hMSCs, nosotros pensamos que las hESCs derivadas sobre hMSCs pueden ser más susceptibles a diferenciación hacia tejidos de la línea germinal mesodérmica (Ledran et al., 2008). De hecho, datos preliminares muestran una mayor frecuencia de latido en colonias de hESCs destinadas a formación de EBs, en comparación con otras líneas establecidas en otra superficie de crecimiento distinta a las hMSCs. Estudios más profundos se están realizando actualmente en nuestro laboratorio.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES

1. Para realizar las campañas de captación de embriones destinados a investigación, pensamos que una entrevista personal con las parejas es mucho más eficaz que la cumplimentación de un cuestionario. Con esta medida se encuentra una solución a las posibles dudas tanto científicas como éticas que les puedan surgir a dichas parejas.
2. Nuestra tasa de donación de embriones a investigación se ha aproximado mucho al 50% de las parejas consultadas, muy por encima de la encontrada en Estados Unidos, que no ha llegado al 3%.
3. Deben existir distintas regulaciones legislativas de acuerdo al tipo de manipulación embrionaria realizada, siendo muy restrictiva sólo cuando la aplicación del material biológico sea una futura terapia celular.
4. Un embriólogo que ha adquirido su experiencia en un centro de reproducción asistida tiene que sufrir un cambio de actitud al entrar a formar parte de un centro de investigación básica. Este cambio es más acusado cuando se habla de manipulación de embriones humanos para obtención de hESCs, debido a mayores restricciones éticas y legales, así como al compromiso de seguridad biológica estipulado para una futura aplicación clínica.
5. En la búsqueda de nuevas metodologías de derivación de hESCs, hemos puesto a punto la técnica láser para aislamiento de las células de la ICM en blastocistos de ratón. Esta técnica depende estrechamente de la calidad blastocitaria, por lo que no sería aplicable a blastocistos murinos de mala calidad.
6. Hemos descubierto una nueva técnica de combinación del método de cultivo directo del blastocisto ayudado de la tecnología láser. Esta combinación de métodos, demostrada en un modelo murino, permite conseguir líneas de mESCs a partir de blastocistos de mala calidad, donde la ICM es muy pequeña o prácticamente indistinguible.

7. Hemos observado que el establecimiento de las mESCs es dependiente de la superficie de crecimiento utilizada, siendo solamente eficaz el cultivo sobre MEFs, al compararlo con el cultivo sobre gelatina.
8. La caracterización de todas las líneas establecidas mediante este método mostró que, tras cultivo prolongado, las mESCs derivadas con este método presentan anomalías cromosómicas que no son típicas de otras mESCs derivadas por otros métodos.
9. Respecto a la derivación de nuevas hESCs a partir de embriones humanos congelados de mala calidad, hemos observado que la derivación sobre hMSCs es más eficiente que cuando se utilizan HFFs.
10. El uso de un inhibidor de ROCK (Y-27632) mejora la tasa de supervivencia de los embriones humanos congelados de mala calidad, pero no influye en la eficiencia de derivación de hESCs.
11. El método de aislamiento de la ICM utilizando la tecnología láser no mejora la eficiencia de derivación de hESCs utilizando embriones humanos congelados de mala calidad.
12. Se han derivado tres líneas hESCs, denominadas GRA-1, -2 y -3, que han sido completamente caracterizadas, y que han sido depositadas en el Banco Nacional de Líneas Celulares.

CAPÍTULO VII

BIBLIOGRAFÍA

- Alonso-Bedate C. Células troncales embrionarias (ES). Derivación, propiedades y capacidades funcionales. In: Investigación en células madre. Fundación Medicina y Humanidades Médicas. 2005, 23-40.
- Amano M, Chihara K, Kimura K, Fukata Y, Nakamura N, Matsuura Y, Kaibuchi K. Formation of actin stress fibers and focal adhesions enhanced by Rho-kinase. *Science*. 1997; 275: 1308-1311.
- Amit M, Carpenter MK, Inokuma MS, Chiu CP, Harris CP, Waknitz MA, Itskovitz-Eldor J, Thomson JA. Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev Biol*. 2000; 227: 271-278.
- Amit M, Margulets V, Segev H, Shariki K, Laevsky I, Coleman R, Itskovitz-Eldor J. Human feeder layers for human embryonic stem cells. *Biol Reprod*. 2003; 68: 2150-2156.
- Amit M, Shariki C, Margulets V, Itskovitz-Eldor J. Feeder layer- and serum-free culture of human embryonic stem cells. *Biol Reprod*. 2004; 70: 837-845.
- Andrews PW, Banting G, Damjanov I, Arnaud D, Avner P. Three monoclonal antibodies defining distinct differentiation antigens associated with different high molecular weight polypeptides on the surface of human embryonal carcinoma cells. *Hybridoma*. 1984; 3: 347-361.
- ASEBIR, II. Criterios de valoración morfológicos de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos. Cuadernos de Embriología Clínica. 2007.
- Bailey JM, Singh PK, Hollingsworth MA. Cancer metastasis facilitated by developmental pathways: Sonic hedgehog, Notch, and bone morphogenic proteins. *J Cell Biochem*. 2007; 102: 829-839.

- Beattie GM, Lopez AD, Bucay N, Hinton A, Firpo MT, King CC, Hayek A. Activin A maintains pluripotency of human embryonic stem cells in the absence of feeder layers. *Stem Cells*. 2005; 23: 489-495.
- Bendall SC, Stewart MH, Menendez P, George D, Vijayaragavan K, Werbowetski-Ogilvie T, Ramos-Mejia V, Rouleau A, Yang J, Bossé M, Lajoie G, Bhatia M. IGF and FGF cooperatively establish the regulatory stem cell niche of pluripotent human cells in vitro. *Nature*. 2007; 448: 1015-1021.
- Bjuresten K, Hovatta O. Donation of embryos for stem cell research. How many couples consent?. *Fertil Steril*. 2007; 87: 603-606.
- Bongso A, Fong CY, Ng SC, Ratnam, S. Isolation and culture of inner cell mass cells from human blastocysts. *Hum Reprod*. 1994; 9: 2110-2117.
- Braude P, Minger SM, Warwick RM. Stem cell therapy: hope or hype?. *BMJ*. 2005; 330: 1159-1160.
- Bryja V, Bonilla S, Cajánek L, Parish CL, Schwartz CM, Luo Y, Rao MS, Arenas E. An efficient method for the derivation of mouse embryonic stem cells. *Stem Cells*. 2006; 24: 844-849.
- Bryja V, Bonilla S, Arenas E. Derivation of mouse embryonic stem cells. *Nat Protoc*. 2006;1: 2082-2087.
- Bueno C, Montes R, Garcia-Castro J, Greaves M, Menedez P. Bone marrow cell-derived Wnt signals as a potencial underlying mechanism for cyclin D1 deregulation in multiple myeloma lacking t(11;14)(q13;q32). *Blood Cells Mol Dis*. 2007; 39: 366-368.

- Bueno C, Montes R, García-Castro J, Menendez P. Human embryonic stem cells: a potential system for modelling infant leukaemia harbouring the MLL-AF4 fusion gene. *Drug Discov Today: Dis Models*. 2008; 4: 54-60.
- Carpenter MK, Rosler ES, Fisk GJ, Brandenberger R, Ares X, Miura T, Lucero M, Rao MS. Properties of four human embryonic stem cell lines maintained in a feeder-free culture system. *Dev Dyn*. 2004; 229: 243-58.
- Catalina P, Cobo F, Cortes JL, Nieto A, Cabrera C, Montes R, Concha A, Menéndez P. Conventional and molecular cytogenetic diagnostic methods in stem cell research: a concise review. *Cell Biol Int*. 2007; 31: 861-869.
- Catalina P, Bueno C, Montes R, Nieto A, Ligeró G, Sanchez L, Jara M, Rasillo A, Orfao A, Cigudosa J, et al. Genetic stability of human embryonic stem cells: a first-step toward the development of potential hESC-based systems for modeling childhood leukaemia. *Leuk Res*. 2008; DOI: 10.1016/j.leukres.2008.08.028.
- Catalina P, Montes R, Ligeró G, Sanchez L, de la Cueva T, Bueno C, Leone PE, Menendez P. Human ESC predisposition to karyotypic instability: Is a matter of cell culture adaptation or differential vulnerability among hESC lines due to inherent properties?. *Mol Cancer* 2008; 7; 76-82.
- Cheng L, Hammond H, Ye Z, Zhan X, Dravid G. Human adult marrow cells support prolonged expansion of human embryonic stem cells in culture. *Stem Cells*. 2003; 21: 131-142.
- Cheng I, Hammond H, Ye Z, Zhan X, Dravid G. Human adult marrow cells support prolonged expansion of human embryonic stem cells in culture. *Stem Cells*. 2003; 21: 131-142.

- Chung Y, Klimanskaya I, Becker S, Marh J, Lu SJ, Johnson J, Meisner L, Lanza R. Embryonic and extraembryonic stem cell lines derived from single mouse blastomeres. *Nature*. 2006 ; 439: 216-219.
- Cobo F, Stacey GN, Hunt C, Cabrera C, Nieto A, Montes R, Cortes JL, Catalina P, Barnie A, Concha A. Microbiological control in stem cell banks: approaches to standarization. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2005; 68: 456-466.
- Cobo F, Cabrera C, Catalina P, Concha A. General safety guidances in stem cell bank installations. *Cytotherapy*. 2006; 8: 47-56.
- Cobo F, Stacey GN, Cortes JL, Concha A. Enviromental monitoring in stem cell banks. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2006; 70: 651-662.
- Cobo F, Talavera P, Concha A. Diagnostic approaches for viruses and prions in stem cell banks. *Virology*. 2006; 347: 1-10.
- Cobo F, Navarro JM, Herrera MI, Vivo A, Porcel D, Hernández C, Jurado M, García-Castro J, Menendez P. Electron microscopy reveals the presence of viruses in mouse embryonic fibroblasts but neither in human embryonic fibroblasts nor in human mesenchymal cells used for hESC maintenance: toward an implementation of microbiological quality assurance program in stem cell banks. *Cloning Stem Cells*. 2008; 10: 65-74.
- Conner DA. Mouse embryonic stem (ES) cell culture. *Curr Protoc Mol Biol*. 2001 May; Chapter 23: Unit 23.3.
- Cowan CA, Klimanskaya I, McMahon J, Atienza J, Witmyer J, Zucker JP, Wang S, Morton CC, McMahon AP, Powers D, Melton DA. Derivation of embryonic stem cell lines from human blastocysts. *N Eng J Med*. 2004; 13: 1353-1356.

- Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen CW, Corselli M, Park TS, Andriolo G, Sun B, Zheng B, Zhang L, Norotte C, Teng PN, Traas J, Schugar R, Deasy BM, Badylak S, Buhring HJ, Giacobino JP, Lazzari L, Huard J, Péault B. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell*. 2008; 3: 301-13.
- Dokras A, Sargent IL, Barlow DH. Human blastocyst grading: an indicator of developmental potential? *Hum Reprod*. 1993; 8: 2119-2127.
- Draper JS, Smith K, Gokhale P, Moore HD, Maltby E, Johnson J, Meisner L, Zwaka TP, Thomson JA, Andrews PW. Recurrent gain of chromosomes 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells. *Nat Biotech*. 2004; 22: 53-54.
- Edwards RG. Ethics and moral philosophy in the initiation of IVF, preimplantation diagnosis and stem cells. *RBM online*. 2005; 10: 1-8.
- Edwards RG, Beard HK. Destruction of cryopreserved embryos. UK law dictated the destruction of 3000 cryopreserved human embryos. *Hum Reprod*. 1997; 12: 3-5.
- ESHRE Taskforce on Ethics and Law. *Hum Reprod*. 2001; 16: 1446-1448.
- ESHRE Taskforce on Ethics and Law. IV. Stem cells. *Hum. Reprod*. 2002; 17: 1409-1410.
- European Union 2004. Directive 2004/23/EC of the European Parliament and of the Council of 31 March 2004 on setting standards of quality and safety for the donation, procurement, testing, processing, preservation, storage, and distribution of human tissues and cells. *Official Journal of the European Union*. 2004; L 102/48.

- European Directive 2006/17/CE, February 8th, implementing Directive 2004/23/EC of the European Parliament and of the Council as regards certain technical requirements for the donation, procurement and testing of human tissues and cells. 2006; L 38/40.
- Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981; 292: 154-156.
- Findikli N, Candan NZ, Kahraman S. Human embryonic stem cell culture: current limitations and novel strategies. *RBM online*. 2006; 13: 581-590.
- García-Castro J, Bueno C, Cortés JL, Nieto A, Menendez P. Células Madre y Terapia Celular. In: *Biotecnología y Salud*. Editorial Ephemera, Madrid. 2008 (En prensa).
- Gardner DK, Vella P, Lane M, Wagley L, Schlenker T, Schoolcraft WB. Culture and transfer of human blastocyst increases implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfers. *Fertil Steril*. 1998; 13: 3434-3440.
- Genbacev O, Krtolica A, Zdravkovic T, Brunette E, Powell S, Nath A, Caceres E, McMaster M, McDonagh S, Li Y, Mandalam R, Lebkowski J, Fisher SJ. Serum-free derivation of human embryonic stem cell lines on human placental fibroblast feeders. *Fertil Steril*. 2005; 83: 1517-1529.
- Hoffman DI, Zellman GL, Fair C, Mayer JF, Zeitz JG, Gibbons WE, Turner TG. Cryopreserved embryos in the United States and their availability for research. *Fertil Steril*. 2003; 79: 1063-1069.
- Hoffman LM, Carpenter MK. Characterization and culture of human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*. 2005 ; 23: 699-708.
- Hovatta O, Mikkola M, Gertow K, Strömberg AM, Inzunza J, Hreinsson J, Rozell B, Blennow E, Andäng M, Ahrlund-Richter L. A culture system

- using human foreskin fibroblasts as feeder cells allows production of human embryonic stem cells. *Hum Reprod.* 2003; 18: 1404-1409.
- Hovatta O. Derivation of human embryonic stem cells: towards clinical quality. *Reprod Fertil Dev.* 2006; 16: 823-828.
 - Hutton Jf, D'Andrea RJ, Lewis ID. Potential for clinical ex vivo expansion of cord blood haematopoietic stem cells using non-hematopoietic factor supplements. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2007; 2: 229-237.
 - Hyslop LA, Armstrong L, Stojkovic M, Lako M. Human embryonic stem cells: biology and clinical implications. *Expert Rev Mol Med.* 2005; 7: 1-21.
 - International Stem Cell Initiative, Adewumi O, Aflatoonian B, Ahrlund-Richter L, Amit M, Andrews PW, Beighton G, Bello PA, Benvenisty N, Berry LS, Bevan S, Blum B, Brooking J, Chen KG, Choo AB, Churchill GA, Corbel M, Damjanov I, Draper JS, Dvorak P, Emanuelsson K, Fleck RA, Ford A, Gertow K, Gertsenstein M, Gokhale PJ, Hamilton RS, Hampl A, Healy LE, Hovatta O, Hyllner J, Imreh MP, Itskovitz-Eldor J, Jackson J, Johnson JL, Jones M, Kee K, King BL, Knowles BB, Lako M, Lebrin F, Mallon BS, Manning D, Mayshar Y, McKay RD, Michalska AE, Mikkola M, Mileikovsky M, Minger SL, Moore HD, Mummery CL, Nagy A, Nakatsuji N, O'Brien CM, Oh SK, Olsson C, Otonkoski T, Park KY, Passier R, Patel H, Patel M, Pedersen R, Pera MF, Piekarczyk MS, Pera RA, Reubinoff BE, Robins AJ, Rossant J, Rugg-Gunn P, Schulz TC, Semb H, Sherrer ES, Siemen H, Stacey GN, Stojkovic M, Suemori H, Szatkiewicz J, Turetsky T, Tuuri T, van den Brink S, Vintersten K, Vuoristo S, Ward D, Weaver TA, Young LA, Zhang W. Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. *Nat Biotechnol.* 2007; 25: 803-816.
 - Inzunza J, Gertow K, Strömberg MA, Matilainen E, Blennow E, Skottman H, Wolbank S, Ahrlund-Richter L, Hovatta O. Derivation of human

- embryonic stem cell lines in serum replacement medium using postnatal human fibroblasts as feeder cells. *Stem Cells*. 2005; 23: 544-549.
- Imreh MP, Gertow K, Cedervall J, Unger C, Holmberg K, Szöke K, Csöregi L, Fried G, Dilber S, Blennow E, Ahrlund-Richter L. In vitro culture conditions favoring selection of chromosomal abnormalities in human ES cells. *J Cell Biochem*. 2006; 99: 508-516.
 - Inzunza J, Sahlén S, Holmberg K, Strömberg AM, Teerijoki H, Blennow E, Hovatta O, Malmgren H. Comparative genomic hybridization and karyotyping of human embryonic stem cells reveals the occurrence of an isodicentric X chromosome after long-term cultivation. *Mol Hum Reprod*. 2004; 10: 461-466.
 - Ishizaki T, Naito M, Fujisawa K, Maekawa M, Watanabe N, Saito Y, Narumiya S. p160ROCK, a Rho-associated coiled-coil forming protein kinase, works downstream of Rho and induces focal adhesions. *FEBS Lett*. 1997; 404:118-124.
 - Ishizaki T, Uehata M, Tamechika I, Keel J, Nonomura K, Maekawa M, Narumiya S. Pharmacological properties of Y-27632, a specific inhibitor of rho-associated kinases. *Mol Pharmacol*. 2000; 57: 976-983.
 - Jones DG, Towns CR. Navigating the quagmire: the regulation of human embryonic stem cell research. *Hum Reprod*. 2006; 21: 1113-1116.
 - Kaiser Network, 2007.
http://www.kaisernetwork.org/daily_reports/rep_index.cfm?DR_ID=42571
 - Kaufman DS, Hanson ET, Lewis RL, Auerbach R, Thomson JA. Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98:10716- 10721.
 - Kauma SW. Cytokines in implantation. *J Reprod Fertil*. 2000; Suppl 55: 31-42.

- Kim HS, Oh SK, Park YB, Ahn HJ, Sung KC, Kang MJ, Lee LA, Suh CS, Kim SH, Kim DW, Moon SY. Methods for derivation of human embryonic stem cells. *Stem Cells*. 2005; 23: 1228-1233.
- Kimura K, Ito M, Amano M, Chihara K, Fukata Y, Nakafuku M, Yamamori B, Feng J, Nakano T, Okawa K, Iwamatsu A, Kaibuchi K. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science*. 1996; 273: 245-248.
- Klimanskaya I, Chung Y, Becker S, Lu SJ, Lanza R. Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres. *Nature*. 2006 ; 444: 481-485.
- Kovacic B, Vlasisavljevic V, Reljic M, Cizek-Sajko M. Developmental capacity of different morphological types of day 5 human morulae and blastocysts. *Reprod Biomed Online*. 2004 ; 8: 687-694.
- Lee JB, Song JM, Lee JE, Park JH, Kim SJ, Kang SM, Kwon JN, Kim MK, Roh SI, Yoon HS. Available human feeder cells for the maintenance of human embryonic stem cells. *Reproduction*. 2004; 128: 727-735.
- Ledran MH, Krassowska A, Armstrong L, Dimmick I, Renström J, Lang R, Yung S, Santibanez-Coref M, Dzierzak E, Stojkovic M, Oostendorp RA, Forrester L, Lako M. Efficient hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells on stromal cells derived from hematopoietic niches. *Cell Stem Cell*. 2008; 3: 85-98.
- Lerou PH, Yabuuchi A, Huo H, Takeuchi A, Shea J, Cimini T, Ince TA, Ginsburg E, Racowsky C, Daley GQ. Human embryonic stem cell derivation from poor-quality embryos. *Nat Biotechnol*. 2008 ; 26: 212-214.

- Leung T, Chen XQ, Manser E, Lim L. The p160 RhoA-binding kinase ROK alpha is a member of a kinase family and is involved in the reorganization of the cytoskeleton. *Mol Cell Biol.* 1996; 16: 5313-5327.
- Ley 42/1988, del 28 de diciembre, sobre donación y utilización de embriones y fetos humanos o de sus células, tejidos u órganos. BOE núm 314.
- Ley Orgánica 15/1999, del 13 de diciembre, de protección de datos de carácter personal. BOE núm 298.
- Ley 41/2002, del 14 de noviembre, reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica. BOE núm 274.
- Ley 7/2003, del 20 de octubre, por la que se regula la investigación con preembriones humanos no viables para la fecundación *in vitro*. BOJA núm 210.
- Ley 14/2006, de 26 de mayo, sobre Técnicas de Reproducción Humana Asistida. BOE núm 126.
- Ley 14/2007, de 3 de Julio, de investigación biomédica. BOE núm 159.
- Li L, Baroja ML, Majumdar A, Chadwick K, Rouleau A, Gallacher L, Ferber I, Lebkowski J, Martin T, Madrenas J, Bhatia M. Human embryonic stem cells possess immune-privileged properties. *Stem Cells.* 2004; 22: 448-456.
- Li X, Meng G, Krawetz R, Liu S and Rancourt DE (2008) The ROCK inhibitor Y-27632 enhances the survival rate of human embryonic stem cells following cryopreservation. *Stem Cells Dev* 17, 1079-1085.

- Li X, Krawetz R, Liu S, Meng G and Rancourt DE (2009) ROCK inhibitor improves survival of cryopreserved serum/feeder-free single human embryonic stem cells. *Hum Reprod* (in press).
- Liew CG, Moore H, Ruban L, Shah N, Cosgrove K, Dunne M, Andrews P. Human embryonic stem cells: possibilities for human cell transplantation. *Ann Med*. 2005; 37: 521-532.
- Liu X, Wu H, Loring J, Hormuzdi S, Disteché CM, Bornstein P, Jaenisch R. Trisomy eight in ES cells is a common potential problem in gene targeting and interferes with germ line transmission. *Dev Dyn*. 1997; 209: 85-91.
- Lopez Guerrero JA. Células Madre. La madre de todas las células. Editorial Hélice. Madrid. 2003.
- Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1981; 78: 7634-7638.
- Martin M, Menendez P. El impacto biológico de las células madre embrionarias. In: *Fronteras en Medicina*. Editorial McGraw-Hill. 2008.
- Martin-Ibañez R, Unger C, Strömberg A, Baker D, Canals JM and Hovatta O (2008) Novel cryopreservation method for dissociated human embryonic stem cells in the presence of a ROCK inhibitor. *Hum Reprod* 23, 2744-2754.
- McLaren A. Ethical and social considerations of stem cell research. *Nature*. 2001; 414: 129-131.
- Menendez P, Perez-Simon JA, Mateos MV, Caballero MD, Gonzalez M, San Miguel JF, Orfao A. Influence of the different CD34+ and CD34- cell subsets infused on clinical outcome after non-myeloablative allogeneic

- peripheral blood transplantation from human leucocyte antigen-identical sibling donors. *BR. J. Haematol.* 2002; 119: 135-143.
- Menendez P, Bueno C, Wang L, Bhatia M. Human embryonic stem cells: Potential tool for achieving immunotolerance?. *Stem Cell Rev.* 2005; 1: 151-158.
 - Menendez P, Bueno C, Wang L. Human embryonic stem cells: A journey beyond cell replacement therapies. *Cytotherapy.* 2006; 8: 530-541.
 - Merok JR, Sherley JL. Breaching the kinetic barrier to in Vitro somatic stem cell propagation. *J Biomed Biotech.* 2001; 1: 25-27.
 - Mínguez Y, Aragonés M, Zulategui J, Romero JL, Rubio C, Remohi J. Preparación de los ovocitos para la microinyección. In: *Manual práctico de esterilidad y reproducción humana 2000*; Ed: Mc Graw-Hill pg. 279-286.
 - Moore H, Udayashankar R, Aflatoonian B. Stem cells for reproductive medicine. *Mol Cell Endocrinol.* 2008; 288: 104-110.
 - Moriwaki T, Suganuma N, Hayakawa M, Hibi H, Katsumata Y, Oguchi H, Furuhashi M. Embryo evaluation by analysing blastomere nuclei. *Hum Reprod.* 2004 ; 19: 152-156.
 - Mortimer D. A critical assessment of the impact of the European Union Tissues and Cells Directive (2004) on laboratory practices in assisted conception. *RBM online.* 2005; 11: 162-176.
 - Narumiya S. The small GTPase Rho: cellular functions and signal transduction. *J Biochem.* 1996; 120: 215-228.
 - Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, Schöler H, Smith A. Formation of pluripotent stem cells in

the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell*. 1998; 95: 379-91.

- Nieto A, Cobo F, Barroso-delJesús A, Barnie AH, Catalina P, Cabrera CM, Cortes JL, Montes RM, Concha A. Embryonic stem cell bank: a work proposal. *Stem Cell Rev*. 2006; 2: 117-126.
- Odorico JS, Kaufman DS, Thomson JA. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells*. 2001; 19: 193-204.
- Park SP, Lee YJ, Lee KS, Ah Shin H, Cho HY, Chung KS, Kim EY, Lim JH. Establishment of human embryonic stem cell lines from frozen-thawed blastocysts using STO cell feeder layers. *Hum Reprod*. 2004; 19: 676-684.
- Price PJ, Goldsborough MD, Tilkins ML. Embryonic stem cell serum replacement. International Patent Application WO 98/30679.
- Rao BM, Zandstra PW. Culture development for human embryonic stem cell propagation: molecular aspects and challenges. *Curr Opin Biotechnol*. 2005 ;16: 568-576
- Real Decreto 1301/2006, de 10 de noviembre, por el que se establecen las normas de calidad y seguridad para la donación, la obtención, la evaluación, el procesamiento, la preservación, el almacenamiento y la distribución de células y tejidos humanos y se aprueban las normas de coordinación y funcionamiento para su uso en humanos. BOE núm 270.
- Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol*. 2000; 18: 399-404.

- Richards M, Fong CY, Chan WK, Wong PC, Bongso A. Human feeders support prolonged undifferentiated growth of human inner cell masses and embryonic stem cells. *Nat Biotechnol.* 2002; 20: 933-936.
- Richards M, Tan S, Fong CY, Biswas A, Chan WK, Bongso A. Comparative evaluation of various human feeders for prolonged undifferentiated growth of human embryonic stem cells. *Stem Cells.* 2003; 21: 546-556.
- Richter KS, Harris DC, Daneshmand ST, Shapiro BS. Quantitative grading of a human blastocyst: optimal inner cell mass size and shape. *Fertil Steril.* 2001 ;76: 1157-1167.
- Riento K, Ridley AJ. Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003; 4: 446-456.
- Rosler ES, Fisk GJ, Ares X, Irving J, Miura T, Rao MS, Carpenter MK. Long-term culture of human embryonic stem cells in feeder-free conditions. *Dev Dyn.* 2004; 229: 259-274.
- Sadler TW. *Langman Embriología Médica.* Editorial médica Panamericana. Madrid. 2004.
- Scadden DT. The stem-cell niche as an entity of action. *Nature.* 2006; 441: 1075-1079.
- Schäffler A, Büchler C. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells--basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells* 2007; 25: 818-827.
- Schuldiner M, Itskovitz-Eldor J, Benvenisty N. Selective ablation of human embryonic stem cells expressing a "suicide" gene. *Stem Cells.* 2003; 21: 257-265.

- Sell S. Stem Cells. In: Stem Cells Hand Book. 2004. Humana Press, pg. 1-18.
- Siena S, Schiavo R, Pedrazzoli P, Carlo-Stella C. Therapeutic relevance of CD34 cell dose in blood cell transplantation for cancer therapy. *J Clin Oncol.* 2000; 113:1161-1166.
- Sifer C, Sellami A, Poncelet C, Martin-Pont B, Porcher R, Hugues JN, Wolf JP. Day 3 compared with day 2 cryopreservation does not affect embryo survival but improves the outcome of frozen-thawed embryo transfers. *Fertil Steril.* 2006; 86: 1537-1540.
- Solter D, Knowles BB. Immunosurgery of mouse blastocysts. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1975; 72: 5099-5102.
- Stacey GN, Cobo F, Nieto A, Talavera P, Healy L, Concha A. The development of 'feeder' cells for the preparation of clinical grade hES cell lines: challenges and solutions. *J Biotechnol.* 2006; 125: 583-588.
- Steigman SA, Fauza DO. Isolation of mesenchymal stem cells from amniotic fluid and placenta. *Curr Protoc Stem Cell Biol.* 2007 Jun;Chapter 1:Unit 1E.2.
- Steptoe PC, Edwards RG. Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet.* 1978; 2: 366.
- Stojkovic M, Lako M, Strachan T, Murdoch A. Derivation, growth and application of human embryonic stem cells. *Reproduction.* 2004; 128: 259-267.
- Stojkovic P, Lako M, Stewart R, Przyborski S, Armstrong L, Evans J, Murdoch A, Strachan T, Stojkovic M. An autogeneic feeder cell system that efficiently supports growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Stem Cells.* 2005; 23: 306-314.

- Tanaka N, Takeuchi T, Neri QV, Sills ES, Palermo GD. Laser-assisted blastocyst dissection and subsequent cultivation of embryonic stem cells in a serum/cell free culture system: applications and preliminary results in a murine model. *J Transl Med.* 2006; 4: 20-32.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 1998; 282: 1145-1147.
- Turetsky T, Aizenman E, Gil Y, Weinberg N, Shufaro Y, Revel A, Laufer N, Simon A, Abeliovich D, Reubinoff BE. Laser-assisted derivation of human embryonic stem cell lines from IVF embryos after preimplantation genetic diagnosis. *Hum Reprod.* 2008; 23: 46-53.
- Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2008; 8: 726-736.
- Veeck L.L. *An Atlas of Human Gametes and Conceptuses.* Parthenon Publishing Group. New York. 1999.
- Veeck, L.L., and N. Zaninovic. Human blastocyst in vitro, p. 99-137. In L.L. Veeck, and N. Zaninovic (Eds.), *An atlas of human blastocysts.* The Parthenon Publishing Group. New York. 2003.
- Watanabe K, Ueno M, Kamiya D, Nishiyama A, Matsumura M, Wataya T, Takahashi JB, Nishikawa S, Nishikawa S, Muguruma K, Sasay Y. A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol.* 2007; 25: 681-686.
- Wang L, Li L, Menendez P, Cerdan C, Bhatia M. Human embryonic stem cells maintained in the absence of mouse embryonic fibroblasts or conditioned media are capable of hematopoietic development. *Blood.* 2005 ;105: 4598-4603.

- Wang L. Endothelial and hematopoietic cell fate of human embryonic stem cells. *Trends Cardiovasc Med.* 2006; 16: 89-94.
- Wobus AM, Guan K, Pich U. In vitro indiferentiation of embryonic stem cells and analysis of cellular phenotypes. *Methods Mol Biol.* 2001; 158: 263-286.
- www.academiavita.org. Oocyte fecundation.
- www.kalipedia.com. Espermatozoides humanos.
- Xu C, Inokuma MS, Denham J, Golds K, Kundu P, Gold JD, Carpenter MK. Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol.* 2001 ;19: 971-974.
- Xu RH, Peck RM, Li DS, Feng X, Ludwig T, Thomson JA. Basic FGF and suppression of BMP signaling sustain undifferentiated proliferation of human ES cells. *Nat Methods.* 2005; 2: 185-190.
- Zeng X, Cai J, Chen J, Luo Y, You ZB, Fötter E, Wang Y, Harvay B, Miura T, Backman C, Chen GJ, Rao MS, Freed WJ Dopaminergic differentiation of human embryonic stem cells. *Stem Cells.* 2004; 22: 925-940.
- Zhang X, Stojkovic P, Przyborski S, Cooke M, Armstrong L, Lako M, Stojkovic M. Derivation of human embryonic stem cells from developing and arrested embryos. *Stem Cells.* 2006; 24: 2669-2676.