

DERIVACIÓ DE LÍNIES DE CÈL·LULES MARE EMBRIONÀRIES HUMANES

BEGOÑA ARAN,¹ IGNASI RODRIGUEZ,¹ ANGEL RAYA,¹ YOLANDA MUÑOZ,¹ PERE N. BARRI,² JUAN CARLOS IZPISÚA¹ I ANNA VEIGA^{1,2}

¹ *Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona.*

² *Servei de Medicina de la Reproducció, Departament d'Obstetrícia, Ginecologia i Reproducció, Institut Universitari Dexeus.*

Adreça per a la correspondència: Begoña Aran. Banc de Línies Cel·lulars, Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona. Dr. Aiguader, 88. 08003 Barcelona. Adreça electrònica: baran@cmrb.eu.

RESUM

Les cèl·lules mare embrionàries (CME) representen una font potencial de cèl·lules per a ús terapèutic en algunes malalties produïdes per la pèrdua de la funció cel·lular. Normalment, aquestes cèl·lules procedeixen d'embrions donats per les parelles sotmeses a tècniques de reproducció assistida (TRA). Es presenten els resultats obtinguts en el Banc de Línies Cel·lulars del Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona (CMRB), on s'han descongelat 254 embrions donats per parelles sotmeses al programa de fecundació *in vitro* (FIV) de l'Institut Universitari Dexeus. La taxa de supervivència va ser del 51,9 %. S'han obtingut cinc línies de CME. Tres d'aquestes línies procedeixen d'embrions de mala qualitat i presenten la capacitat d'autorenovació, pluripotència i diferenciació característiques d'aquestes cèl·lules. Els embrions de mala qualitat, sovint descartats en els centres de RA, poden ser una font útil per a la derivació de CME.

Paraules clau: donació d'embrions, qualitat embrionària, cèl·lules mare embrionàries.

HUMAN EMBRYONIC STEM CELLS DERIVATION

SUMMARY

Human embryonic stem cells (hESC) represent a potential source for cell therapy for many degenerative diseases. Usually hESC lines are derived from surplus embryos donated from couples undergoing In Vitro Fertilisation (IVF). We here present the results obtained in the Stem Cell Bank at the Center of Regenerative Medicine in Barcelona. 254

embryos have been thawed. The embryos were donated from couples from the IVF programme at the Institut Universitari Dexeus. The embryo survival rate was 51.9%. Five ESC lines were obtained. Three of these lines came from poor quality embryos. The cell lines present self-renewal, pluripotency, and differentiation properties characteristic of these cells. Poor quality embryos, usually discarded in assisted reproduction centres, could be useful for ESC derivation.

Key words: embryo donation, embryo quality, embryonic stem cells.

INTRODUCCIÓ

La recerca amb embrions viables humans està permesa al nostre país des de l'aprovació de la *Llei 45/2003, per la qual es modifica la Llei 35/1988 sobre tècniques de reproducció assistida*, que va permetre la utilització dels embrions humans congelats existents en aquell moment en els centres de reproducció assistida. Amb la promulgació de la *Llei 14/2006, sobre tècniques de reproducció assistida*, qualsevol parella amb embrions congelats, independentment del moment de la congelació, pot decidir el futur dels seus embrions entre quatre opcions: la utilització per la dona mateixa o la seva parella, la donació amb fins reproductius, la donació per a recerca o la destrucció sense altres fins. La congelació d'embrions humans als centres de reproducció assistida va començar a Espanya en la dècada dels anys vuitanta (Veiga *et al.*, 1987) i s'estima que actualment hi ha més de cinquanta mil embrions congelats en aquests centres.

L'interès en la recerca amb embrions humans es deu principalment al fet que el model animal no sempre és aplicable a l'espècie humana. La recerca amb embrions és necessària per ampliar els coneixements sobre els processos de fecundació, desenvolupament embrionari i implantació per poder millorar els resultats dels tractaments de reproducció assistida. Un dels objectius més importants en la recerca amb embrions és la derivació de cèl·lules mare embrionàries. Des que l'any 1998, Thomson *et al.* van pu-

blicar la derivació de la primera línia de cèl·lules mare embrionàries (CME) humanes a partir de l'aïllament de la massa cel·lular interna (MCI) d'un embrió humà, es va veure que els embrions humans podien representar una font potencial de cèl·lules per a ús en la recerca i, en un futur, per a ús terapèutic. Les dues característiques principals d'aquestes cèl·lules, la capacitat d'autorenovació i la capacitat de diferenciar-se en les tres línies germinals (Thomson *et al.*, 1998; Reubinoff *et al.*, 2000), les fan candidates especials per al tractament d'algunes malalties produïdes per la pèrdua de la funció cel·lular. La malaltia de Parkinson, la fallada cardíaca, la diabetis mellitus o els accidents vasculars són algunes de les malalties possiblement tractables amb el trasplantament de cèl·lules procedents de cèl·lules mare embrionàries (Hoffman *et al.*, 2003; Trounson *et al.*, 2005). Però la medicina regenerativa és només una part del potencial de les CME. Les CME humanes són una eina molt important per a l'estudi de la biologia del desenvolupament, l'expressió gènica, el desenvolupament de nous fàrmacs i nous tractaments (Pera *et al.*, 2004), així com per a la recerca en malalties monogèniques (Pickering *et al.*, 2003; Verlinsky *et al.*, 2005; Maizel *et al.*, 2006).

Des d'aquestes primeres derivacions, s'han produït nombroses línies de CME humanes (Allegrucci *et al.*, 2007; ISCI, 2007) a partir d'embrions supernumeraris procedents dels programes de fecundació *in vitro* (FIV), que són donats per les parelles que

no desitgen usar-los per a la seva pròpia transferència o per a altres parelles (Bjurensten *et al.*, 2003; Lacey, 2007; Lysterly *et al.*, 2006, 2007). Aquests embrions normalment han estat sotmesos a un procés de congelació, i després de la seva donació han de ser descongelats i cultivats fins a l'estadi de blastocist. (Menezo *et al.*, 1992; Veiga *et al.*, 1995). Aproximadament un 35 % dels embrions cultivats *in vitro* arriben a l'estadi de blastocist, però no tots presenten una bona qualitat morfològica; alguns presenten un desenvolupament retardat, es bloquegen o presenten fragments o una morfologia anormal a causa de divisions cel·lulars irregulars (Menezo *et al.*, 1998; Gardner *et al.*, 2000).

La metodologia de derivació de CME actualment és encara empírica. S'utilitzen diferents protocols en els diversos punts del procés, incloent-hi o no l'aïllament previ de la MCI, les fases inicials de la derivació i el cultiu amb la utilització o no de cèl·lules de suport (*feeders*), de la línia establerta. De fet, l'objectiu final és la derivació de CME en cultius lliures de *feeders* (Amit *et al.*, 2004; Klimanskaya *et al.*, 2005), de components d'origen animal (Genbacev *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005; Elleström *et al.*, 2006; Rajala *et al.*, 2007) i en condicions químicament definides (Li *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2006; Ludwig *et al.*, 2006). Aquestes condicions, juntament amb la derivació en condicions GMP (de l'anglès *good manufactured practice*) són necessàries per un ús segur de les CME en la terapèutica clínica (Crook *et al.*, 2007).

Alguns autors han publicat derivacions de CME a partir d'embrions descartats (Mitalipova *et al.*, 2003), de mala qualitat (Chen *et al.*, 2005; Cowan *et al.*, 2004; Aran *et al.*, 2007; Raya *et al.*, 2008) i a partir d'embrions bloquejats (Zhang *et al.*, 2006).

En aquest treball descriuim els resultats obtinguts en el Banc de Línies Cel·lulars del Centre de Medicina Regenerativa (CMRB),

amb la utilització dels embrions donats per a la derivació de línies de CME, fet que demostra que els embrions de mala qualitat també poden ser útils per obtenir CME.

MATERIAL I MÈTODES

Origen dels embrions

Els embrions van ser donats per a la recerca per parelles sotmeses a FIV a l'Institut Universitari Dexeus de Barcelona. Les parelles que van comunicar la seva voluntat de donar els embrions per a recerca van ser informades dels aspectes ètics i legals relacionats, així com del projecte d'investigació al qual van ser destinats els seus embrions, que porta per títol *Derivación de líneas de células madre embrionarias humanas en condiciones libres de xenobióticos y la caracterización in vivo de su pluripotencialidad*. Es va facilitar a les parelles el consentiment informat per ratificar per escrit la seva donació. Es va iniciar el projecte després d'obtenir l'aprovació del Comitè Clínic d'Investigació del centre i de la Comisión de Seguimiento y Control de la Donación de Células y Tejidos Humanos de l'Instituto de Salud Carlos III.

Els embrions van ser descongelats utilitzant els medi de descongelació Vitrolife Thaw-kit 1 o el Thaw-kit Blast (Vitrolife, Gotemburg, Suècia), segons l'estat de l'embrió d'acord amb les instruccions del fabricant.

S'han analitzat els resultats referents a la descongelació dels embrions, supervivència embrionària, taxa de blastocist i obtenció de línies de CME.

Derivació de línies de CME humanes

S'ha utilitzat la tècnica de congelació lenta i descongelació ràpida per a la congelació i descongelació dels embrions (Testart *et al.*, 1986). Els embrions descongelats en estadi primers van ser cultivats en medi G1.2 (Vitrolife, Göteborg, Suècia) fins al dia 3 i cultivats en G2.2 (Vitrolife, Göteborg, Suècia) fins a l'estadi de blastocist. Els blastocists van ser classificats d'acord amb la classificació proposada per Stephenson *et al.* (2006), tenint en compte el grau d'expansió, el nombre de cèl·lules i l'aparència de la massa cel·lular interna (MCI) i el nombre de cèl·lules i la cohesió del trofectoriderma (TE). Es van agrupar en tres grups d'acord a la seva qualitat: bona, intermèdia i mala qualitat. Els blastocists de mala qualitat presentaven un baix nombre de cèl·lules a la MCI i al TE, així com àrees de degeneració.

Es va eliminar la zona pellúcida amb 5 mg/ml de Pronasa (Roche) o amb àcid Tyrode (Medicult), i es van eliminar també els fragments i les cèl·lules mortes amb

una pipeta Pasteur esmolada al foc (Human Fertility Diagnosis). En una fase inicial es va aïllar la MCI dels blastocists de bona qualitat mitjançant immunocirurgia. En una segona fase es va deixar d'utilitzar l'aïllament per evitar l'ús d'anticossos i complements d'origen animal i, per tant, es van sembrar els blastocists sencers (Heins *et al.*, 2004; Suss-Toby *et al.*, 2004) sobre fibroblasts humans (HFF-1, CCD11125k ATCC) irradiats (55 Gy) i sembrats ($7 \times 10^4/\text{cm}^2$) sobre plaques d'un sol pou cobertes de gelatina (Falcon, Becton Dickinson) i van ser cultivats a 37 °C i 5 % CO₂ en medi hES (medi Knockout Dulbecco's modified Eagle's suplementat amb 2 mmol/l GlutaMAX (Gibco, InVitrogen corporation), 0,05 mmol/l 2-mercaptoetanol (Gibco, InVitrogen corporation), 8 ng/ml de factor bàsic de creixement del fibroblast (bFGF) (Invitrogen), 1 % d'aminoàcids no essencials (Cambrex), 20 % Knockout Serum Replacement (Invitrogen) i 0,5 % de penicil·lina-estreptomicina (Gibco, InVitrogen corporation).

Després de 4-5 dies de cultiu, va aparèi-

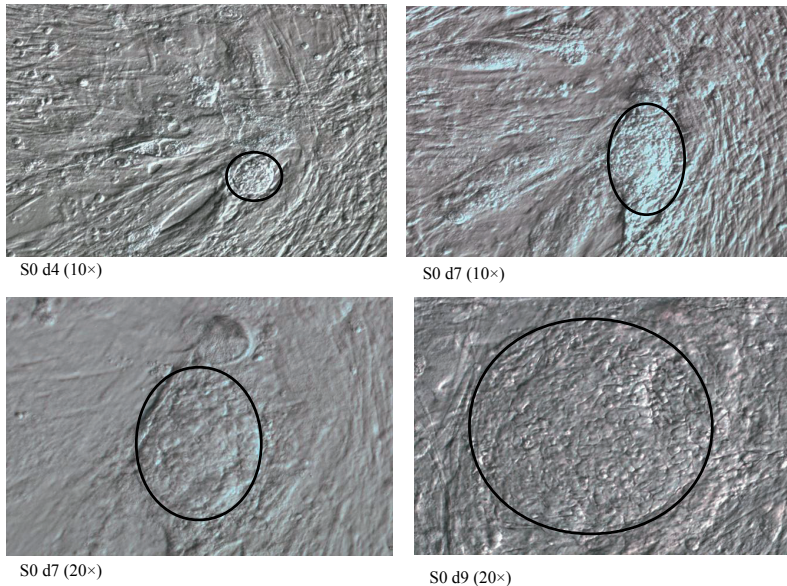


FIGURA 1. Creixement inicial durant la derivació d'una línia de CME, els dies 4, 7 i 9.

xer un petit grup de cèl·lules amb morfologia de CME (colònia compacta i amb vores llises, alta relació nucli/citoplasma i nuclèols prominents) (Thomson *et al.*, 1998; Reubinoff *et al.*, 2000) entre altres tipus cel·lulars de creixement inespecífic (vegeu la figura 1). Al voltant dels dies 10-12, aquesta colònia inicial és dissociada mecànicament en diferents fragments amb una pipeta de plàstic, els quals van ser tornats a sembrar sobre una nova monocapa de *feeders*. A partir d'aquest moment, les colònies de cèl·lules indiferenciades són dissociades i passades cada 5-7 dies. També són congelades periòdicament en 90 % FBS (Invitrogen) i 10 % DMSO (Sigma) i emmagatzemades en nitrogen líquid. Algunes colònies van ser descongelades i sembrades per valorar la supervivència després de la congelació i descongelació.

Caracterització de CME humanes

Per determinar si aquestes línies es componen de CME, es va dur a terme una caracterització exhaustiva, incloent-hi cariotip, HLA, valoració de l'expressió de marcadors

de pluripotencialitat i diferenciació *in vivo* i *in vitro*.

Es van valorar els marcadors de pluripotencialitat Oct-4 (Santa Cruz Biotechnology), Sox2 (Chemicon), Nanog (Abcam), SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-80 (Chemicon), seguits de DAPI (Sigma-Aldrich) mitjançant immunocitoquímica.

L'activitat fosfatasa alcalina es va mesurar utilitzant el *kit* Alkaline Phosphatase Red Membrane Substrate (Sigma) després de fixar-ho amb paraformaldehid (PFA) al 4 %. El cariotip es va realitzar incubant les colònies 30 min amb 2µl/ml de colcemid (Invitrogen) i la tinció de bandes G. Es van analitzar un mínim de quinze metafases per línia. L'activitat telomerasa es va detectar mitjançant el *kit* TRAPeze Detection Kit (Chemicon International) seguint les instruccions del fabricant.

Els antígens HLA van ser analitzats per determinar la histocompatibilitat mitjançant el *kit* AlleleSEQR HLA Sequencing Kit (Atria Genetics). L'anàlisi de microsatèl·lits es va fer amb PCR *multiplex* de nou microsatèl·lits amb AmpliFISTR Profiler Plus Kit (Applied Biosystems).

Per a la diferenciació *in vitro* es van generar cossos embrioides (EB) dissociant



FIGURA 2. Blastocist del qual procedeix la línia ES[5]. Classificat com de bona qualitat.

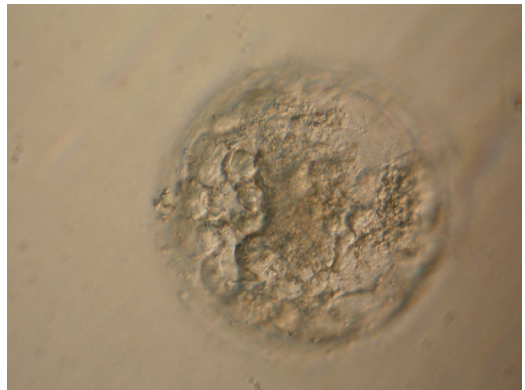


FIGURA 3. Blastocist del qual procedeix la línia ES[4]. Classificat com de mala qualitat.

TAULA 1. Resultats obtinguts en el CMRB a partir dels embrions donats per a recerca

Fase	Embrions congelats en 2PN (D+1)	Embrions congelats en D+2/D+3	Embrions congelats en estadi de blastocist	Total
Descongelats	50	141	63	254
Sobreviuen	30 (60 %)	68 (48,2 %)	34 (53,9 %)	132 (51,9 %)
Taxa de blastocist	8 (26,7 %)	12 (17,6 %)		
Sembrats	8	11	28	47
Inici de creixement	1	3	3	7
Línies		3	2	5 (10,6 %)

mecànicament les colònies senceres després de cultivar-les 10 min a 37 °C amb col·lagenasa (Invitrogen). Aquestes colònies es van cultivar en plaques no adherents durant 3-4 dies en medi hES. Després es van sembrar en portaobjectes (*chamber slides*, LabTek, Nunc). Per induir la diferenciació a mesoderma, es van cultivar els EB amb àcid ascòrbic durant 12-28 dies. La diferenciació a neurones es va obtenir cocultivant amb cèl·lules de l'estroma PA6 durant 3-5 setmanes. Per mostrar l'expressió de marcadors associats a la diferenciació de les tres capes embrionàries es van tenyir les cèl·lules amb anticossos anti- α -actinina (Sigma), anti- β -tubulina (Covance) i anti- α -fetoproteïna (Dako) com a marcadors de mesoderma, ectoderma i endoderma, respectivament.

La pluripotència *in vivo* es va demostrar mitjançant la inducció de teratomes injectant intramuscularment un milió de cèl·lules, aproximadament, en ratolins SCID (*severe combined immunodeficient*). Vuit setmanes més tard els ratolins van ser sacrificats i els tumors analitzats mitjançant les tècniques d'histologia i d'immunohistoquímica convencionals.

Els detalls de la caracterització han estat descrits anteriorment (Raya *et al.*, 2008).

RESULTATS

Es van descongelar un total de 254 embrions amb una taxa de supervivència del 51,9 %, (60 % en els embrions congelats en estadi de pronuclis, 68 % en els embrions congelats el dia 2r i 3r, i 53,9 % dels blastocists). Els resultats es presenten a la taula 1. La taxa de desenvolupament fins a blastocist dels embrions congelats en estadis primerencs va ser del 20,4 %.

Es van sembrar quaranta-set blastocists, que van ser classificats d'acord amb la proposta de Stephenson (Stephenson *et al.*, 2006, 2007) i van ser inclosos en tres grups de bona, intermèdia o mala qualitat. Vuit dels blastocists sembrats eren de bona qualitat. Es tractava de blastocists expandits amb una MCI compacta i amb TE que formava una capa contínua o quasi contínua. Vint blastocists van ser classificats com a intermedis perquè presentaven una MCI amb poques cèl·lules o poc compactades. En el grup de mala qualitat es van incloure dinou blastocists. Era impossible diferenciar entre TE i MCI, o no presentaven morfologia de blastocist i tenien únicament algunes cèl·lules supervivents (vegeu les figures 2 i 3).

Es van observar set creixements inicials, dels quals cinc es van consolidar com a lí-

TAULA 2. Caracterització de les cinc línies de CME derivades en el Banc de Línies Cel·lulars del CMRB

	ES[2]	ES[3]	ES[4]	ES[5]	ES[6]
<i>Cariotip</i>	46, XY	46, XY	46, XY	46, XY	46, XY
<i>Fosfatasa alcalina</i>	+	+	+	+	+
<i>Telomerasa</i>	+	+	+	+	+
<i>HLA</i>	fet	fet	fet	fet	fet
<i>Marcadors de pluripotència</i>					
<i>SSEA-3</i>	+	+	+	+	+
<i>SSEA-4</i>	+	+	+	+	+
<i>TRA-1-60</i>	+	+	+	+	+
<i>TRA-1-81</i>	+	+	+	+	+
<i>Oct-4</i>	+	+	+	+	+
<i>NANOG</i>	+	+	+	+	+
<i>SOX-2</i>	+	+	+	+	+
<i>SSEA-1</i>	-	-	-	-	-
<i>Congelació/descongelació</i>	+	+	+	+	+
<i>Pluripotència</i>					
<i>In vitro (formació EB)</i>	+	+	+	+	+
<i>In vivo (teratomes)</i>					
<i>Endoderma</i>	+	+	+	+	+
<i>Ectoderma</i>	+	+	+	+	+
<i>Mesoderma</i>	+	+	+	+	+

nies de cèl·lules mare embrionàries estables, fet que suposa una eficiència del 10,6 %. Una d'aquestes línies (ES[5]) deriva d'un embrió de bona qualitat, una altra d'un de qualitat intermèdia (ES[3]), i tres línies procedeixen de tres blastocists de mala qualitat (ES[2], ES[4] i ES[6]). Les eficiències de derivació segons la qualitat embrionària van ser del 12,5 %, 5 % i 15,8 %, per als grups de bona, intermèdia i mala qualitat, respectivament.

Les cinc línies han estat caracteritzades i registrades en el Banco Nacional de Líneas Celulares (http://www.isciii.es/htdocs/terapia/terapia_banccelular.jsp).

El resum de la caracterització de les línies es presenta a la taula 2. Les cinc línies són positives per a tots els marcadors de pluripotencialitat testejats. Expressen fosfatasa alcalina (vegeu la figura 4) Oct4, Nanog,

SOX2, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60 i TRA-1-81 (vegeu la figura 5). També són positives per a l'activitat telomerasa.

S'han generat EB a partir de totes les línies que expressen marcadors d'ectoderma (β -tubulina), endoderma (α -fetoproteïna) i mesoderma (α -actinina) després de cultivar-los *in vitro*. També s'han generat teratomes en ratolins SCID amb presència de teixits de les tres línies germinals, com cartílag, epitelí respiratori i teixit neuronal.

Les cinc línies presentaren cariotips normals (46, XY) (vegeu la figura 5).

DISCUSSIÓ

Al nostre país, els embrions donats per a recerca són sempre congelats, i sovint fa bastants anys que estan criopreservats.

S'ha de tenir en compte que els protocols de cultiu i de congelació utilitzats fa uns anys no estaven optimitzats com els d'ara. A més, en la majoria dels casos es congelaven tots els embrions que no es transferien, independentment de la seva qualitat, sovint deficient. Això podria explicar els pobres resultats obtinguts quant a la taxa de supervivència (51,9 %) i la taxa de blastocist. (20,4 %) i també la mala qualitat morfològica de molts dels blastocists. Amb una bona selecció abans de congelar, l'eficiència de derivació podria ser més elevada (Sjögren *et al.*, 2004).

Està ben documentat que la taxa d'embaràs millora quan es transfereixen embrions de bona qualitat, i això mostra la relació entre la qualitat embrionària i la viabilitat i la capacitat de desenvolupament posterior. Els embrions de mala qualitat sovint són descartats en els programes de fecundació *in vitro* (FIV), a causa al seu baix potencial de desenvolupament (Alikani *et al.*, 2000).

Tot i així, els nostres resultats demostren que embrions de mala qualitat po-

den ser utilitzats per a la derivació de CME amb eficiències similars a les obtingudes amb embrions de bona morfologia. Molts autors presenten el nombre d'embrions i metodologia utilitzada per a la derivació però pocs informen sobre la qualitat embrionària.

Els nostres resultats (eficiència de derivació: 10,6 %) són molt similars als presentats per Chen *et al.* (2005) a partir de cent trenta embrions del dia 3 de baixa qualitat: obtingueren dinou blastocists que van donar lloc a dues línies de CME amb una eficiència del 10,5 %. Cowan *et al.* (2004) van derivar disset línies a partir de noranta-set blastocists (17,5 %). Tres d'aquestes línies procedien de tres blastocists que haurien estat descartats per a ús clínic a causa de les seves característiques morfològiques. Quatre línies procedien d'embrions de qualitat intermèdia. Aquests autors suggereixen una major eficiència de derivació amb embrions congelats que en frescos.

Mitalipova *et al.* (2003) van publicar una eficàcia de derivació més elevada (21 %),

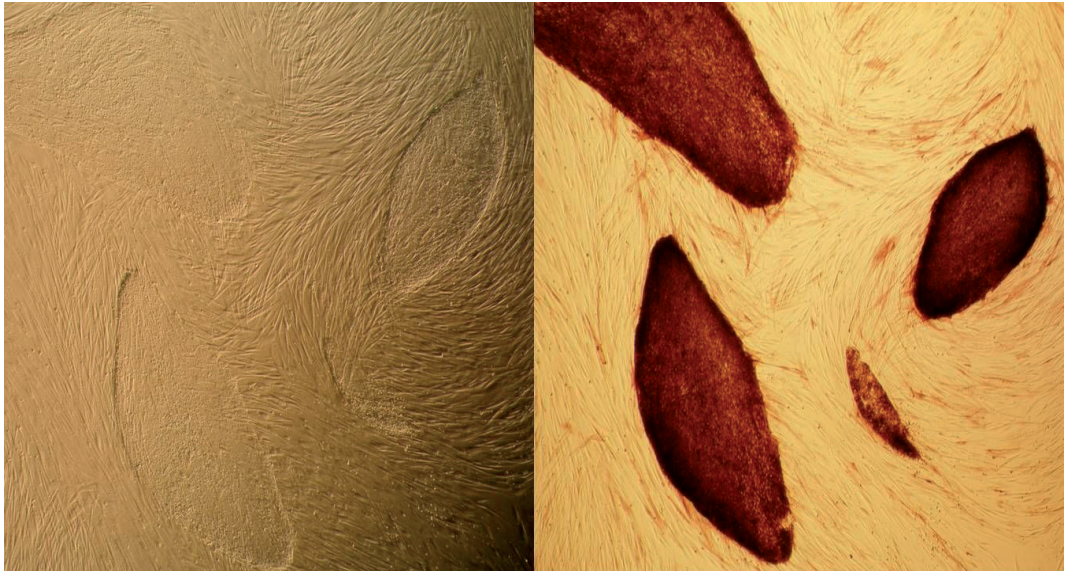


FIGURA 4. Activitat fosfatasa alcalina de la línia ES[3].

amb quatre línies aconseguïdes a partir de dinou embrions descartats perquè eren de mala qualitat. S'ha de tenir en compte que es tractava d'embrions en fresc. Zhang *et al.* (2006) van derivar vuit línies a partir de cent seixanta-un embrions bloquejats —els embrions bloquejats són aquells en els quals no es divideix cap blastòmer després de 24-48 h en cultiu. Tot i així, els resultats són millors amb blastocists del dia 6 que amb embrions bloquejats (35,7 % *vs.* 4,9 %). Aquests embrions bloquejats no es poden desenvolupar en les condicions estàndards de cultiu per a FIV i probablement són incapaçs de donar lloc a un embaràs. Però aquests embrions podrien reiniciar la seva divisió i continuar el seu desenvolupament en cultivar-los amb medis més complexos, com els que requereixen les CME i, per tant, poden donar lloc a CME. Laundry i Zucker (2004) defineixen els embrions bloquejats com embrions morts, per justificar les qüestions ètiques que pot comportar l'ús d'embrions humans.

Lerou *et al.* (2008) descriuen els resultats obtinguts en utilitzar embrions de mala

qualitat (tant en estadis primerencs com en blastocists) no aptes per a la transferència o per a congelació. Presenten eficiències de derivació del 0,6 % amb embrions de dia 3 de desenvolupament (1 línia/171 embrions) i de 4,1 % amb embrions del dia 5 (10 línies/242 embrions). Aquests autors demostren un cop més que es poden obtenir CME d'embrions de mala qualitat en diferents estadis de desenvolupament, i que l'eficàcia de derivació es correlaciona amb l'estadi de desenvolupament de l'embrió.

Altres autors presenten línies derivades a partir d'embrions en estadis previs. Strelchenko *et al.* (2004) obtingué vuit línies de quaranta-sis embrions en estadi de mòrula. Alguns autors, però, sostenen que la derivació de CME és més eficient amb embrions de bona qualitat (Oh *et al.*, 2005; Simon *et al.*, 2005). Stojkovic *et al.* (2004) aconseguí augmentar el nombre de cèl·lules de la MCI, prèviament a la derivació, utilitzant embrions del dia 8 en lloc dels del dia 6 cultivats amb un sistema de cultiu en tres etapes, i va augmentar així l'eficiència de derivació.

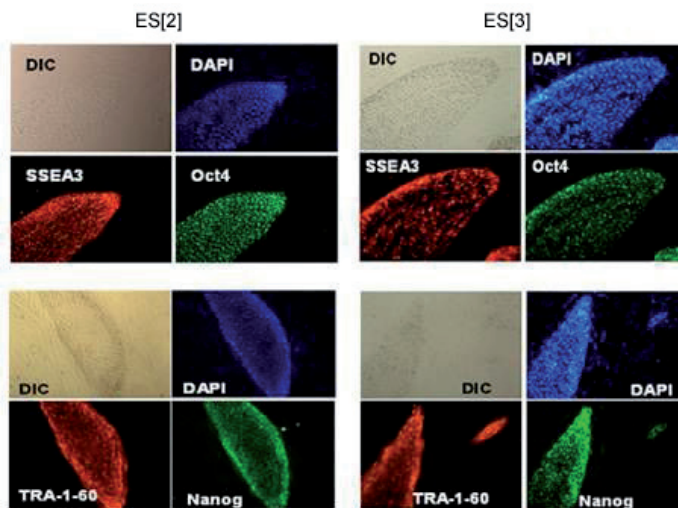


FIGURA 5. Expressió de marcadors de pluripotencialitat per a les línies ES[2] i ES[3].

S'ha demostrat que una sola cèl·lula d'un embrió del dia 2 és capaç de donar lloc a un embaràs (Veiga *et al.*, 1987). De fet, s'han obtingut CME humanes i murines a partir de blastòmers aïllats (Chung *et al.*, 2006; Klimanskaya *et al.*, 2006; Wakayama *et al.*, 2007), i amb això es demostra que un únic blastòmer és suficient per derivar CME.

És necessari arribar a un consens amb la informació mínima que necessiten reportar els grups de recerca per poder establir uns estàndards i poder comparar i intercanviar informació entre els equips (Stephenson *et al.*, 2006, 2007). Aquests autors han proposat una classificació morfològica i una informació mínima de dades per unificar les dades reportades pels investigadors. Aquesta informació inclou nombre d'embrions, qualitat dels mateixos, dia i estadi de desenvolupament, metodologia de l'aïllament de la MCI i derivació, etc. En reproducció assistida s'han establert paràmetres de qualitat embrionària que es correlacionen amb la capacitat d'implantació, que haurien de ser aplicats al camp de la derivació de CME.

És important descriure en detall les fases inicials del procés de derivació per establir una correlació entre morfologia embrionària i eficiència de derivació per optimitzar el procés. Allegrucci *et al.* (2007) descriuen diferències entre línies de CME relacionades amb l'ambient al qual han estat exposades durant el seu cultiu des del moment de la derivació. Es tracta de diferències quant a la pluripotencialitat, perfils de transcripció i estabilitat genètica i epigenètica. És necessari establir correlacions entre morfologia embrionària, condicions de cultiu i característiques de les línies per provar diferències. L'estandardització de la classificació d'embrions i l'optimització dels protocols per obtenir CME millorarà l'eficiència del procés. A més, la implantació d'estàndards de qualitat afavorirà la possible apli-

cació clínica (Allegrucci *et al.*, 2007; Sousa *et al.*, 2006).

Amb la idea de recollir i estandarditzar la informació de totes les línies creades a Europa i a fora d'Europa, s'ha creat recentment el Registre Europeu de Cèl·lules Mare Embrionàries Humanes (hESCreg, www.hescreg.eu) (Borstlap *et al.*, 2008). Es tracta d'un projecte finançat per la Comissió Europea dins del 6è Programa Marc (FP6), coordinat pel Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona i el Charité-Universitätsmedizin de Berlín. El principal objectiu d'aquest registre és proporcionar als investigadors, als legisladors i a la societat en general tota la informació existent sobre les línies de CME que existeixen actualment pel que fa a derivació, mètode de cultiu, caracterització, etc. hESCreg també facilita una visió de tots els projectes de recerca que s'estan duent a terme amb línies de CME. Per tant, aquest registre europeu constitueix una eina molt útil d'interacció entre investigadors, projectes de recerca, bancs de línies cel·lulars i legisladors, i contribueix a l'estandardització en aquest camp.

BIBLIOGRAFIA

- ALIKANI, M.; CALDERON, G.; TOMKIN, G.; GARRISI, J.; KOKOT, M.; COHEN, J. (2000). «Cleavage anomalies in early human embryos and survival after prolonged culture in-vitro». *Hum. Reprod.*, 15: 2634-2643.
- ALLEGRUCCI, C.; YOUNG, L. E. (2007). «Differences between human embryonic stem cell lines». *Hum. Reprod. Update*, 13: 103-120.
- AMIT, M.; SHARIKI, C.; MARGULETS, V.; ITSKOVITZ-ELDOR, J. (2004). «Feeder layer- and serum-free culture of human embryonic stem cells». *Biol. Reprod.*, 70: 837-845.
- ARAN, B.; RODRÍGUEZ, I.; RAYA, A.; LUNA, M.; BARRI, P.; IZPISÚA, J. C.; VEIGA, A. (2007). «Derivation of human embryonic stem cells from poor quality blastocysts». *23th Annual Meeting of the European Society Human Reproduction and Embryology*, Lió.

- BJURESTEN, K.; HOVATTA, O. (2003). «Donation of embryos for stem cell research: how many couples consent?». *Hum. Reprod.*, 18: 1353-1355.
- BOLETÍN OFICIAL DEL ESTADO (2003). *Ley 45/2003, de 21 de noviembre, por la que se modifica la Ley 35/1988, de 22 de noviembre sobre técnicas de reproducción asistida*. BOE, 126.
- (2006). *Ley 14/2006, de 26 de Mayo, sobre técnicas de reproducción humana asistida*. BOE, 126.
- BORSTLAP, J.; STACEY, G.; KURTZ, A.; ELSTNER, A.; DAMASCHUN, A.; ARÁN, B.; VEIGA, A. (2008). «First evaluation of the European hESCreg» *Nature. Biotech.*, 26: 859-860.
- COWAN, C. A.; KLIMANSKAYA, I.; MCMAHON, J.; ATIENZA, J.; WITMYER, J.; ZUCKER, J. P.; WANG, S.; MORTON, C. C.; MCMAHON, A. P.; POWERS, D.; MELTON, D. A. (2004). «Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts». *N. Engl. J. Med.*, 350: 1353-1356.
- CROOK, J.; PEURA, T.; KRAVETS, L.; BOSMAN, A.; BUZZARD, J.; HORNE, R.; HENTZE, H.; DUNN, N.; ZWEIGERT, R.; CHUA, F. (2007). «The generation of six clinical-grade human embryonic stem cell lines» *Cell Stem Cell*, 1: 490-494.
- CHEN, H.; QIAN, K.; HU, J.; LIU, D.; LU, W.; YANG, Y.; WANG, D.; YAN, H.; ZHANG, S.; ZHU, G. (2005). «The derivation of two additional human embryonic stem cell lines from day 3 embryos with low morphological scores». *Hum. Reprod.*, 20: 2201-2206.
- CHUNG, Y.; KLIMANSKAYA, I.; BECKER, S.; MARH, J.; LU, S. J.; JOHNSON, J.; MEISNER, L.; LANZA, R. (2006). «Embryonic and extraembryonic stem cell lines derived from single mouse blastomeres». *Nature*, 439: 216-219.
- ELLERSTROM, C.; STREHL, R.; MOYA, K.; ANDERSSON, K.; BERGH, C.; LUNDIN, K.; HYLLNER, J.; SEMB, H. (2006). «Derivation of a xeno-free human embryonic stem cell line». *Stem Cells*, 24: 2170-2176.
- GARDNER, D. K.; LANE, M.; STEVENS, J.; SCHLENKER, T.; SCHOOLCRAFT, W. B. (2000). «Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer». *Fertil. Steril.*, 73: 1155-1158.
- 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, S. J. (2005). «Serum-free derivation of human embryonic stem cell lines on human placental fibroblast feeders». *Fertil. Steril.*, 83: 1517-1529.
- HEINS, N.; ENGLUND, M. C.; SJOBLUM, C.; DAHL, U.; TONNING, A.; BERGH, C.; LINDAHL, A.; HANSON, C.; SEMB, H. (2004). «Derivation, characterization, and differentiation of human embryonic stem cells». *Stem Cells*, 22: 367-376.
- HOFFMAN, D. I.; ZELLMAN, G. L.; FAIR, C. C.; MAYER, J. F.; ZEITZ, J. G.; GIBBONS, W. E.; TURNER, T. G. JR. (2003). «Cryopreserved embryos in the United States and their availability for research». *Fertil. Steril.*, 79: 1063-1069.
- HOFFMAN, D.; ZELLMAN, G.; FAIR, C.; MAYER, J.; ZEITZ, J.; GIBBONS, W.; TURNER, T. (2003). «Cryopreserved embryos in the United States and their availability for research». *Fertil. Steril.*, 79: 1063-1069.
- KLIMANSKAYA, I.; CHUNG, Y.; BECKER, S.; LU, S. J.; LANZA, R. (2006). «Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres». *Nature*, 444: 481-485.
- KLIMANSKAYA, I.; CHUNG, Y.; MEISNER, L.; JOHNSON, J.; WEST, M. D.; LANZA, R. (2005). «Human embryonic stem cells derived without feeder cells». *Lancet*, 365: 1636-1641.
- LACEY, S. DE (2007). «Decisions for the fate of frozen embryos: fresh insights into patients' thinking and their rationales for donating or discarding embryos». *Hum. Reprod.*, 22: 1751-1758.
- LANDRY, D. W.; ZUCKER, H. A. (2004). «Embryonic death and the creation of human embryonic stem cells». *J. Clin. Invest.*, 114: 1184-1186.
- LEROU, P.; YABUCHI, A.; HUO, H.; TAKEUCHI, A.; SHEA, J.; CIMINI, T.; INCE, T.; GINSBURG, E.; RACOWSKY, C.; DALEY, G. (2008). «Human embryonic stem cell derivation from poor-quality embryos» *Nature Biotech.* [En prensa]
- LI, T.; ZHOU, C. Q.; MAI, Q. Y.; ZHUANG, G. L. (2005). «Establishment of human embryonic stem cell line from gamete donors». *Chin. Med. J. (Engl.)*, 118: 116-122.
- LU, J.; HOU, R.; BOOTH, C. J.; YANG, S. H.; SNYDER, M. (2006). «Defined culture conditions of human embryonic stem cells». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103: 5688-5693.
- LUDWIG, T. E.; LEVENSTEIN, M. E.; JONES, J. M.; BERGGREN, W. T.; MITCHEN, E. R.; FRANE, J. L.; CRANDALL, L. J.; DAIGH, C. A.; CONARD, K. R.; PIEKARCZYK, M. S.; LLANAS, R. A.; THOMSON, J. A. (2006). «Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions». *Nat. Biotechnol.*, 24: 185-187.
- LYERLY, A. D.; FADEN, R. R. (2007). «Embryonic stem cells. Willingness to donate frozen embryos for stem cell research». *Science*, 317: 46-47.
- LYERLY, A. D.; STEINHAUSER, K.; NAMEY, E.; TULSKY, J. A.; COOK-DEEGAN, R.; SUGARMAN, J.; WALMER, D.; FADEN, R.; WALLACH, E. (2006). «Factors that affect infertility patients' decisions about disposition of frozen embryos». *Fertil. Steril.*, 85: 1623-1630.
- MATEIZEL, I.; TEMMERMAN, N. DE; ULLMANN, U.; CAUFFMAN, G.; SERMON, K.; VELDE, H. VAN DER; RYCKE, M.

- DE; DEGREEF, E.; DEVROEY, P.; LIEBAERS, I.; STEIRTEGHEM, A. VAN (2006). «Derivation of human embryonic stem cell lines from embryos obtained after IVF and after PGD for monogenic disorders». *Hum. Reprod.*, 21: 503-511.
- MENEZO, Y.; HAZOUT, A.; DUMONT, M.; HERBAUT, N.; NICOLLET, B. (1992). «Coculture of embryos on Vero cells and transfer of blastocysts in humans». *Hum. Reprod.*, 7: 101-106.
- MENEZO, Y.; VEIGA, A.; BENKHALIFA, M. (1998). «Improved methods for blastocyst formation and culture». *Hum. Reprod.*, 13: 256-265.
- MITALIPOVA, M.; CALHOUN, J.; SHIN, S.; WININGER, D.; SCHULZ, T.; NOGGLE, S.; VENABLE, A.; LYONS, I.; ROBINS, A.; STICE, S. (2003). «Human embryonic stem cell lines derived from discarded embryos». *Stem Cells*, 21: 521-526.
- OH, S. K.; KIM, H. S.; AHN, H. J.; SEOL, H. W.; KIM, Y. Y.; PARK, Y. B.; YOON, C. J.; KIM, D. W.; KIM, S. H.; MOON, S. Y. (2005). «Derivation and characterization of new human embryonic stem cell lines: SNUhES1, SNUhES2, and SNUhES3». *Stem Cells*, 23: 211-219.
- PERA, M. F.; TROUNSON, A. O. (2004). «Human embryonic stem cells: prospects for development». *Development*, 131: 5515-5525.
- PICKERING, S. J.; BRAUDE, P. R.; PATEL, M.; BURNS, C. J.; TRUSSLER, J.; BOLTON, V.; MINGER, S. (2003). «Preimplantation genetic diagnosis as a novel source of embryos for stem cell research». *Reprod. Biomed. Online*, 7: 353-364.
- RAJALA, K.; HAKALA, H.; PANULA, S.; AIVIO, S.; PIHLAJAMAKI, H.; SUURONEN, R.; HOVATTA, O.; SKOTTMAN, H. (2007). «Testing of nine different xeno-free culture media for human embryonic stem cell cultures». *Hum. Reprod.*, 22: 1231-1238.
- RAYA, A.; RODRÍGUEZ-PIZÀ I.; ARAN, B.; CONSIGLIO, A.; BARRI, P. N.; VEIGA, A.; IZPISÚA, J. (2008). «Generation of cardiomyocytes from new human embryonic stem cell lines derived from poor-quality blastocysts». *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. [En premsa]
- REUBINOFF, B. E.; PERA, M. F.; FONG, C. Y.; TROUNSON, A.; BONGSO, A. (2000). «Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro». *Nat. Biotechnol.*, 18: 399-404.
- SIMON, C.; ESCOBEDO, C.; VALBUENA, D.; GENBACEV, O.; GALAN, A.; KRTOLOVA, A.; ASENSI, A.; SANCHEZ, E.; ESPLUGUES, J.; FISHER, S.; PELLICER, A. (2005). «First derivation in Spain of human embryonic stem cell lines: use of long-term cryopreserved embryos and animal-free conditions». *Fertil. Steril.*, 83: 246-249.
- SJOGREN, A.; HARDARSON, T.; ANDERSSON, K.; CAISANDER, G.; LUNDQUIST, M.; WIKLAND, M.; SEMB, H.; HAMBERGER, L. (2004). «Human blastocysts for the development of embryonic stem cells». *Reprod. Biomed. Online*, 9: 326-329.
- SOUSA, P. A. DE; GALEA, G.; TURNER, M. (2006). «The road to providing human embryo stem cells for therapeutic use: the UK experience». *Reproduction*, 132: 681-689.
- STEPHENSON, E. L.; BRAUDE, P. R.; MASON, C. (2006). «Proposal for a universal minimum information convention for the reporting on the derivation of human embryonic stem cell lines». *Regen. Med.*, 1: 739-750.
- STEPHENSON, E. L.; BRAUDE, P. R.; MASON, C.; ROWLAND, K. (2007). «International community consensus standard for reporting derivation of human embryonic stem cell lines». *Regen. Med.*, 2: 349-362.
- STOJKOVIC, M.; LAKO, M.; STOJKOVIC, P.; STEWART, R.; PRZYBORSKI, S.; ARMSTRONG, L.; EVANS, J.; HERBERT, M.; HYSLOP, L.; AHMAD, S.; MURDOCH, A.; STRACHAN, T. (2004). «Derivation of human embryonic stem cells from day-8 blastocysts recovered after three-step in vitro culture». *Stem Cells*, 22: 790-797.
- STRELCHENKO, N.; VERLINSKY, O.; KUKHARENKO, V.; VERLINSKY, Y. (2004). «Morula-derived human embryonic stem cells». *Reprod. Biomed. Online*, 9: 623-629.
- SUSS-TOBY, E.; GERECHT-NIR, S.; AMIT, M.; MANOR, D.; ITSKOVITZ-ELDOR, J. (2004). «Derivation of a diploid human embryonic stem cell line from a mononuclear zygote». *Hum. Reprod.*, 19: 670-675.
- TESTART, J. [et al.] (1986). «High pregnancy rate after early human embryo freezing». *Fertil. Steril.*, 46: 268-272.
- THE INTERNATIONAL STEM CELL INITIATIVE. (2007). «Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative» *Nature Biotech.*, 25: 803-816.
- THOMSON, J. A.; ITSKOVITZ-ELDOR, J.; SHAPIRO, S. S.; WAKNITZ, M. A.; SWIERGIEL, J. J.; MARSHALL, V. S.; JONES, J. M. (1998). «Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts». *Science*, 282: 1145-1147.
- TROUNSON, A. (2005). «Human embryonic stem cell derivation and directed differentiation». *Ernst. Schering. Res. Found. Workshop*, 27-44.
- VEIGA, A.; CALDERON, G.; BARRI, P. N.; COROLEU, B. (1987). «Pregnancy after the replacement of a frozen-thawed embryo with less than 50% intact blastomeres». *Hum. Reprod.*, 2: 321-323.
- VEIGA, A.; TORELLO, M. J.; BOISO, I.; SANDALINAS, M.; BUSQUETS, A.; CALDERON, G.; BARRI, P. N. (1995). «Optimization of implantation in the in-vitro fertilization laboratory». *Hum. Reprod.*, 10: 98-106.
- VERLINSKY, Y.; STRELCHENKO, N.; KUKHARENKO, V.; RECHITSKY, S.; VERLINSKY, O.; GALAT, V.; KULIEV, A. (2005). «Human embryonic stem cell lines with ge-

- netic disorders». *Reprod. Biomed. Online*, 10: 105-110.
- WAKAYAMA, S.; HIKICHI, T.; SUETSUGU, R.; SAKAIDE, Y.; BUI, H. T.; MIZUTANI, E.; WAKAYAMA, T. (2007). «Efficient establishment of mouse embryonic stem cell lines from single blastomeres and polar bodies». *Stem Cells*, 25: 986-993.
- ZHANG, X.; STOJKOVIC, P.; PRZYBORSKI, S.; COOKE, M.; ARMSTRONG, L.; LAKO, M.; STOJKOVIC, M. (2006). «Derivation of human embryonic stem cells from developing and arrested embryos». *Stem Cells*, 24: 2669-2676.
- netic disorders». *Reprod. Biomed. Online*, 10: 105-110.