

Generación de blastocistos a partir de agregados celulares (quimeras experimentales)

Claudio Bisioli^{1,2} y Germán Galaverna^{3,4}

Primer premio de Investigación Básica

¹⁾ Instituto de Ginecología y Fertilidad (IFER) - ²⁾ Germinal Reproducción Asistida - ³⁾ Fundación Prof. Dr. Aníbal A. Acosta

⁴⁾ BIOgenomic.

bisioli@fibertel.com.ar

Reproducción 2007;22:59-68

Introducción

Durante el estadio embrionario de blastocisto los embriones forman una masa celular interna (MCI) capaz de formar un amplio rango de tipos celulares del cuerpo y un trofotodermo dedicado a formar la mayor parte de los tejidos placentarios (Winkel y Pedersen, 1998). El aislamiento y la siembra de la MCI sobre un soporte de cultivo adecuado puede generar células madre embrionarias humanas (CMEhs) (Thomson y cols., 1998; Reubinoff y cols., 2000). Todas las CMEhs tienen la habilidad de auto-renovarse perpetuamente en cultivo, manteniendo un fenotipo indiferenciado y un cariotipo normal. Son pluripotentes, es decir, capaces de desarrollar derivados de las tres capas germinativas primarias tanto *in vitro* (cuerpos embrioides) como *in vivo* (formación de teratomas) (Draper y Andrews, 2002). Hasta el presente los blastocistos usados para la derivación de CMEhs han sido obtenidos a partir de embriones normales donados (Thomson y cols., 1998; Reubinoff y cols., 2000; Lanzendorf y cols., 2001; Amit y Itskovitz-Eldor, 2002) o de embriones descartados de mala calidad (Mitalipova y cols., 2003).

El uso de embriones humanos o su creación con el solo propósito de realizar investigaciones en células madre ha sido controversial desde el inicio mismo de estas prácticas. El gobierno de los Estados Unidos, por ejemplo, mantiene una prohibición para la investigación con fondos públicos mientras

que permite su uso sobre células madre que hayan sido derivadas a partir de fondos privados (Solter y Gearhart, 1999). Existe un cierto acuerdo acerca del respeto hacia los embriones humanos preimplantatorios y acerca de que no deberían ser tratados como meras fuentes de provisión de materias primas (Edwards y cols., 2000; Somerville, 2004).

Una alternativa que no utiliza células embrionarias es la de aislar y caracterizar células madre derivadas de tejidos adultos (“clonación terapéutica”) (Solter y Gearhart, 1999). Esta técnica consiste en crear un embrión a partir de la transferencia de un núcleo somático del paciente en un ovocito donado enucleado, permitir que el embrión así obtenido se desarrolle hasta blastocisto y luego derivar las células terapéuticas requeridas, sorteando así el problema del rechazo inmunológico. La desventaja es que las células madre derivadas de embriones clonados no poseen la misma potencia para generar distintos tipos celulares que los embriones “naturales”. Por otro lado, y no menos importante, permanece la importante cuestión ética de haber creado un embrión clonado. El uso de embriones anormales o inviables es la alternativa experimental al uso de embriones viables para la obtención de células madre embrionarias. Contamos con varias fuentes potenciales de células totipotentes generadas a partir de embriones anormales o inviables:

- Partenogenotas.
- Productos de fecundación anómala.

- Embriones anormales según el Diagnóstico Genético Preimplantatorio (DGP).
 - Embriones 3PN diploidizados mediante remoción microquirúrgica selectiva del pronúcleo sobrante.
 - Blastómeras singulares de embriones sanos.
 - Quimeras experimentales.
- Veamos brevemente una a una estas alternativas.

Partenogenotas

Una de las alternativas a este dilema de obtener células madre sin destruir embriones consiste en la creación de embriones que sean inherentemente incapaces de implantar. En mamíferos, los partenotas o partenogenotas (los embriones obtenidos mediante partenogénesis) pueden desarrollar hasta diferentes estadios luego de la activación ovocitaria (dependiendo de la especie) pero nunca llegan a término. Los primeros en obtener células madre a partir de ovocitos de primates activados partenogénicamente fueron Cibelli y cols. (2002).

Productos de fecundación anómala

Suss-Toby y cols. (2004) lograron derivar y caracterizar una línea de CMEhs a partir de cigotos aneuploides. Utilizaron embriones provenientes de FIV y de ICSI, pero el blastocisto que dio origen a la línea celular de CMEhs provenía de un cigoto 1PN producto de ICSI.

Embriones anormales según DGP

Los embriones que se sabe no van a implantar o van a ser abortados debido a su carga de anomalías cromosómicas, pueden llegar a ser una fuente de células madre más aceptable moralmente. Estos embriones, aun siendo anormales, pueden contener algunas células normales o células anormales que pueden llegar a auto-corregirse *in vitro*.

En 2005 Munné y cols. intentaron averiguar si embriones clasificados como anor-

males mediante DGP y puestos a cultivar para dar origen a células madre eran capaces de auto-corregirse parcial o totalmente *in vitro* y dar origen a células madre disómicas/diploides.

Cincuenta embriones calificados como anormales según DGP fueron cultivados hasta el estadio de blastocisto. Se les realizó una biopsia de trofoblasto para confirmar la anomalía cromosómica detectada en día 3. Treinta y cuatro embriones se adherieron después de un co-cultivo sobre células soporte durante 12 días. Veinticuatro de estos cultivos fueron analizados mediante FISH y el resto para la expresión del gen OCT-4. Los resultados de FISH mostraron que 7 de los cultivos fueron totalmente normales, 6 fueron mayormente anormales y 11 habían experimentado algún tipo de normalización cromosómica (entre un 21 y un 88 % de células normales). El único cultivo que pudo ser sometido a RT-PCR demostró expresión de OCT-4. Por lo tanto, los autores concluyeron que los embriones anormales son una fuente potencial de células madre disómicas.

Embriones 3PN diploidizados mediante remoción microquirúrgica selectiva del pronúcleo sobrante

Aunque Escribá y cols. (2001) intentaron “normalizar” embriones tripnucleados mediante la extracción del pronúcleo sobrante, no pudieron asegurarse de que efectivamente hubiesen removido un pronúcleo paterno. Recientemente Escribá y cols. (2006) lograron corregir efectivamente embriones triploides humanos mediante la remoción microquirúrgica selectiva del pronúcleo sobrante, confirmando herencia heteropaternal. El 41% de estos embriones anormales, inviables, generó blastocistos *in vitro*. Siete de ellos fueron sembrados pero no originaron células madre. Los autores proponen que este “reciclado” embrionario podría ser útil tanto para propósitos repro-

ductivos como para investigación en células madre. Hasta el momento se conoce un solo reporte de nacimiento mediante esta técnica de normalización (Kattera y Chen, 2003).

Blastómeras singulares de embriones sanos

Recientemente el equipo liderado por Robert Lanza de la compañía Advanced Cell Technology ha demostrado que es posible obtener líneas de células madre embrionarias humanas a partir de una única blastómera biopsiada de embriones sometidos a DGP (Klimanskaya y cols., 2006). Esta alternativa no usa específicamente embriones anómalos sino que se sirve de los sanos pero sin dañarlos.

Quimerismo experimental

Alikani y Willadsen (2002) consideraron el uso de embriones inviables (aunque no definieron con exactitud a qué se referían) para construir con sus células individuales agregados celulares de distintos embriones para obtener una quimera experimental que permitiese producir células madre.

El quimerismo experimental inducido mediante agregación celular ha sido usado en otras especies de mamíferos para estudiar el potencial de desarrollo y la capacidad regulatoria de embriones enteros o de blastómeras aisladas (Tarkowski, 1998).

La construcción de agregados celulares de embriones inviables podría originar blastocistos que por auto-corrección generen células diploides como fuente de células madre embrionarias (CME), sin los problemas derivados del uso de embriones normales y con mayor eficiencia, ya que podrían derivar por auto-corrección células normales o anormales en su totalidad. El fundamento teórico de esta hipótesis se basa en que existe conocimiento de que en el caso de las quimeras inter-específicas entre ovejas y cabras sólo nacen crías de ovinos (MacLaren y cols., 1993; Holtz, 2005) y en los fenómenos de

auto-corrección (ver Discusión).

El objetivo del presente trabajo consistió en evaluar el potencial de estos agregados celulares (quimeras experimentales) para generar blastocistos *in vitro*.

Materiales y Métodos

Los cigotos anormales utilizados en este estudio fueron donados por parejas que efectuaron procedimientos de FIV e ICSI durante los años 2004-2005 y que firmaron los correspondientes consentimientos informados luego de la aprobación del proyecto por el Comité de Ética del Departamento de Biología del IFER.

Dieciocho ovocitos fecundados anormalmente con 3 ó 4 PN fueron cultivados hasta día 3 en cápsulas separadas bien identificadas. Pasado el mediodía del día 3 los embriones anormales fueron colocados en cápsulas de microinyección conteniendo medio G-PGD sin Ca²⁺ ni Mg²⁺ (Vitrolife, Gotenburgo, Suecia) para facilitar la separación de las células. Se les practicó un orificio en la zona pelúcida (ZP) con solución ácida de Tyrode (pH 2.4, Irvine Scientific, Santa Ana, California, EE.UU.) por donde se extrajeron una a una todas las células, dejando completamente vacías las ZPs y las blastómeras individuales aisladas e identificadas. Se mezclaron las células de distintos embriones y se reintrodujeron nuevamente dentro de las ZPs que habían sido vaciadas. Cada ZP contuvo blastómeras de distintos embriones (1 a 3 de cada embrión, 8-9 en cada ZP, 2-3 embriones en cada experimento), (tabla 1, figuras 1 y 2). Se obtuvieron 16 embriones quiméricos que se dejaron evolucionar hasta día 5 en microgotas de medio G2 (Vitrolife, Gotenburgo, Suecia) suplementado con 5% de hSA (Irvine Scientific, Santa Ana, California, EE.UU.) bajo aceite (Oil for Embryo Culture, Irvine Scientific, Santa Ana, California, EE.UU.) a 37°C en una atmósfera húmeda de 5.8% de CO₂ en aire. El grupo control consistió en em-

Figura 1. A: ovocito tripronucleado. B: a los 3 días, ubicado para ser biopsiado. C: zona pelúcida completamente biopsiada. D: blastómeras sueltas.

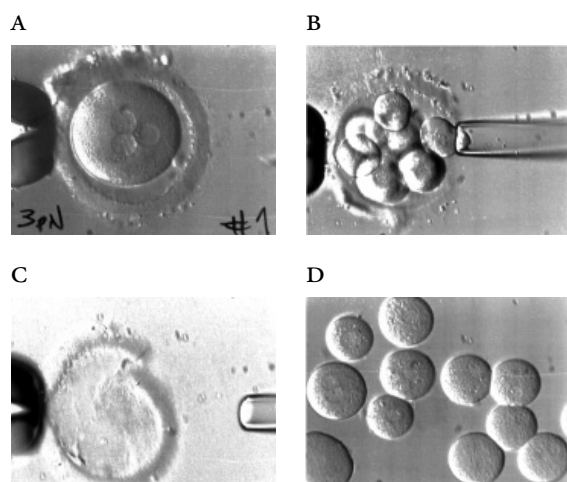


Figura 2. A y B: reintroducción de blastómeras en las ZPs vaciadas. C: quimera experimentando compactación celular. D: blastocistos quiméricos eclosionados.

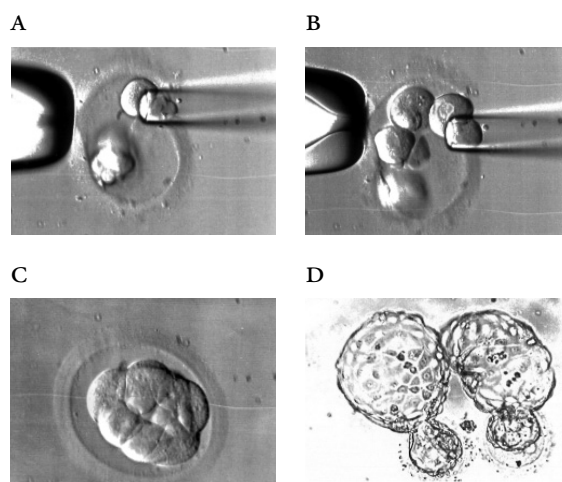


Tabla 1. Grupos experimentales y resultados.

Comp: presencia de compactación celular. *Div + comp:* presencia de división celular y compactación. *Necro:* necrosis celular. *EB + TF:* presencia de embrioblasto y trofoblasto. *Eclosión:* Blastocistos eclosionados.

Experimento N°	N° de embriones reconstituidos	Estatus cromosómico	N° de embriones biopsiados	Resultado	N
1	2	3PN	1	Comp	1
2	2	3PN	1	Div + comp	1
3	2	3PN	1	Necro	1
4	2	3PN	2	Div + comp	1
				EB + TF	1
5	3	3PN+ 3PN + 4PN	3	Comp	2
				EB + TF	1
6	3	3PN	3	Eclosion	2
				Comp	1
7	3	3PN+ 3PN + 4PN	3	Div + comp	1
				Necro	2
8	3	3PN + 3PN + 4PN	2	Eclosion	1
				Necro	1
TOTAL	20		16		16

briones biopsiados de nuestro programa de diagnóstico genético preimplantacional. El

análisis estadístico se realizó mediante el test exacto de Fisher.

Resultados

El 75 % (12/16) de los embriones reconstituidos mostró algún tipo de evolución (división y compactación celular) y el 31 % (5/16) formaron blastocistos con embrioblasto y trofotodermo bien definidos, tres de los cuales eclosionaron *in vitro* (tablas 1 y 2, figura 2). Este resultado no fue diferente estadísticamente del grupo control (35%, 128/366, P=1.000).

Tabla 2. Resumen de los resultados. EB: formación de embrioblasto. TF: formación de trofotodermo

Resultado	N=16
Necrosis	4
Compactación	4
División celular + compactación	3
EB y TF	2
Eclosión (<i>Hatching</i>)	3

Discusión

Las quimeras construidas a partir de embriones inviábiles forman blastocistos de manera similar a los embriones de DGP. Estas construcciones celulares podrían ser utilizadas para proporcionar células para la obtención de líneas de CMEhs normales y/o anormales que luego deberían ser evaluadas genéticamente (sexo, aneuploidía, poliploidía, *imprinting*, etc.).

Es una práctica establecida en la clínica embriológica que los embriones mono (provenientes de ICSI) o triploides y las entidades de mayores ploidías sean descartadas debido a:

- Los problemas de salud que pueden acarrear a la paciente, pudiendo derivar en molas hidatiformes parciales (Edwards y cols., 1990. Lawler y cols., 1991).
- Que los escasísimos nacidos triploides reportados en la literatura no pueden ser considerados seres viables (Maaswinkel-Mooij y cols., 1992; Niemann y cols., 1993).

- Que el gran porcentaje de embriones diploides que se ha reportado que provienen de cigotos 1PN de FIV (Munné y cols., 1993) cae al 10-30% cuando provienen de ICSI (Sultan y cols., 1995; Staessen y Van Steirteghem, 1997).

Es probable que Suss-Toby y cols. (2004) hayan utilizado embriones diploides normales pero que hayan aparecido como anormales (1PN) a los ojos del embriólogo debido a la formación asincrónica de los pronúcleos. Entonces lo que proponen es utilizar estos embriones ya que de cualquier manera van a ser descartados. Pero en sentido estricto en este abordaje están utilizando embriones normales y no presenta ninguna ventaja ética.

El trabajo de Alikani y Willadsen (2002) partió de dos observaciones claves:

1. Una proporción de células individuales experimentan división y cavitación cuando son cultivadas en aislamiento.

2. La remoción completa de fragmentos de los embriones conduce a la reorganización de las blastómeras intactas y facilita la compactación (Alikani, 2001).

El experimento de Alikani y Willadsen (2002) consistió en aislar mediante micro-manipulación blastómeras de embriones inviábiles e insertarlas dentro de zonas pelúcidas vacías, dejando estos agregados celulares en cultivo hasta el día 5 ó 6. En total, 247 células de 107 embriones inviábiles fueron combinadas en 36 agregados. Doce de estos agregados (33%) formaron estructuras semejantes a blastocistos, normalmente organizados y con una clara y distintiva MCI. Se llevó a cabo FISH con sondas para 7 cromosomas en todas las células en 7 de los blastocistos formados. Entre el 52 y el 90% de las células en 6 de los blastocistos fueron diploides.

Este experimento demostró que algunas de las células de embriones no viables mantienen aún su potencial de desarrollo y capacidad regulatoria al extremo de ser capaces de contribuir a la formación de un

blastocisto normalmente organizado. Más aún, una proporción de estas blastómeras y de sus descendientes resultaron cromosómicamente normales. Los autores partieron de embriones inviables en el contexto de la FIV terapéutica y obtuvieron blastocistos que pueden constituir una fuente de células madre que no requiera la destrucción de embriones viables.

Hasta ahora se desconoce si el abordaje de construir partenogenotas puede ser aplicado en humanos. Brevini y cols. (2006) obtuvieron dos líneas celulares aparentemente totipotentes y auto-renovables a partir de un número no descrito de ovocitos humanos activados partenogénicamente. El análisis citogenético de dichas células informó un cariotipo estable diploide.

Otra cuestión totalmente diferente consistiría en utilizar embriones triploides o de mayores ploidías sin construir quimeras. El principal problema de este abordaje es que el desarrollo embrionario está severamente influenciado por la ploidía y la herencia parental. Los cigotos humanos triploides, cuando su origen es dispérmico, tienen un pobre desarrollo embrionario (Plachot y Crozet, 1992; Sathananthan y cols., 1999; Plachot y Mandelbaum, 1990).

La auto-normalización ocurriría *in vitro* en una proporción muy significativa de los cultivos producidos pero, a partir de embriones cromosómicamente anormales mono o poliploides. Munné y cols. (2005) sostienen que eso ocurre fundamentalmente debido a la pérdida de un cromosoma (en las células trisómicas) entre el día 3 y el día 5 de cultivo embrionario (endoreducción cromosómica).

En 2006 Frumkin y cols. reanalizaron en día 5 embriones que habían sido biopsiados (y calificados como anormales) para DGP en día 3, con el propósito de verificar si realmente ocurría la autocorrección. Encontraron que 13 de 52 (28%) eran parcial o enteramente disómicos en día 5. Este resultado puede ser explicado de 3 maneras:

1. Errores en el FISH que conducen a un 7-15% de errores en el diagnóstico.

2. Un alto grado de mosaicismo cromosómico en embriones de día 3 que no siempre puede ser detectado mediante un DGP de 1 ó 2 blastómeras.

3. Auto-corrección, un mecanismo de selección natural –según los autores– que opera en favor de las células normales, probablemente más significativo durante los estadios de división intensa.

Cho y cols. (2006) repitieron el experimento de Alikani y Willadsen (2002) utilizando embriones murinos y formando agregados celulares entre blastómeras diploides y tetraploides. No obtuvieron células madre, pero obtuvieron nacidos vivos a partir de la transferencia de las quimeras experimentales. Además observaron, luego de cultivar células de la MCI de los blastocistos formados, células semejantes a células madre que eran homogéneas a las del donante diploide original.

Algunos estudios han demostrado la desaparición de las células somáticas tetraploides en las quimeras tetraploide-diploide. Se ha hipotetizado que en embriones mixoploides las células aneuploides desaparecen gradualmente en el feto en crecimiento por relocalización en la placenta o por disminución de su proliferación y que sólo las células diploides pueden proliferar y diferenciarse normalmente en el feto (Eakin y Behringer, 2003; Tam y Rossant, 2003).

El mosaicismo puede ser frecuente aún entre embriones de día 3 de buena calidad. Peeters y cols. (2006) determinaron el grado de mosaicismo en embriones sanos y de buena calidad donados para investigación. En general se posee información de mosaicismo a partir del estudio de dos o tres células por embrión. Estos autores pudieron estudiar todas las células, ya que los fijaron en su totalidad. De 158 blastómeras fijadas pertenecientes a 28 embriones sólo 8 embriones (28.6%) fueron uniformemente diploides y

9 (32.1%) fueron mosaicos “limitados” (es decir, con más de un 75% de células diploides). Seis embriones (21.4%) fueron mosaicos extensivos (entre 75 y 40% de células diploides) y cinco fueron anormales (menos de un 40% de células diploides). De estos 5 uno fue uniformemente anormal, 3 fueron caóticos y uno fue una trisomía 13 con una célula diploide de 6.

Una única célula extraída de un embrión humano de 3 días podría ser usada para producir líneas estables de células madre sin comprometer la viabilidad del embrión (Klimanskaya y cols., 2006). El mismo equipo ya había logrado hacer lo mismo con ratones (Chung y cols., 2006). Esto permitiría, al igual que en los procedimientos descritos anteriormente, generar células madre embrionarias humanas sin la controvertida destrucción de embriones humanos.

Klimanskaya y cols. (2006) tomaron 91 células provenientes de 16 embriones descartados porque no eran normales, las sembraron por separado y obtuvieron diecinueve crecimientos celulares similares a CMEhs y dos líneas celulares que se mantuvieron indiferenciadas durante 18 meses, demostrando cariotipo normal y expresión de marcadores de pluripotencia, incluyendo OCT-4, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-80, fosfatasa alcalina y nanog, factores asociados con un estadio indiferenciado y característicos de células madre que se auto-renuevan. También mantuvieron el potencial de formar derivados de las tres capas germinales embrionarias *in vitro* y en teratomas.

Los embriones utilizados en este estudio fueron desmantelados célula por célula. O sea que este trabajo sugiere que potencialmente uno podría sacar una célula de un embrión sano, y sin dañarlo obtener líneas de células madre. Esto permitiría en el futuro obtener cualquier número de líneas de células madre sin dañar a los embriones o perjudicar su desarrollo.

Sin embargo Pearson (2006), comentando el artículo de Klimanskaya y cols. (2006), se ha preguntado si este abordaje puede responder a todas las preocupaciones éticas. Existe temor de que remover una célula de un embrión de día 3 disminuya sus chances de implantación o altere su desarrollo causando problemas de salud en el niño resultante. Existen numerosos reportes de que esto no es así: Handyside y cols., 1990; Hardy y cols., 1990; Magli y cols., 2006; Staessen y cols., 2004; Cieslak-Janzen y cols., 2006.

Otros autores han señalado que cada una de esas células es totipotente y capaz de desarrollar un embrión enteramente nuevo, y que entonces ese potencial se estaría destruyendo (Piotrowska-Nitsche y cols., 2005; Hansasis y cols., 2001). Sin embargo, un estudio reciente (Deb y cols., 2006) ha demostrado la localización de determinantes de destino celular (Cdx2) en las células de embriones de ratón en el estadio de 2 células.

Más aún, otros autores califican a este abordaje de éticamente inadmisibles ya que está involucrada la técnica de DGP que, según estos mismos autores, ya es moralmente inaceptable porque su práctica, además de involucrar el riesgo de daño embrionario, sólo aumenta la discriminación contra las personas discapacitadas (de Melo-Martin y cols., 2006). Para una discusión objetiva sobre estos temas recomendamos la lectura de Handyside (1996) y de Schulman y Edwards (1996).

La respuesta de carácter utilitario de usar células de los procedimientos de DGP parece éticamente inaceptable ya que se sabe que biopsiar más de una célula sí produce daño embrionario (Cohen y Munné, 2005). Además, parece muy improbable que algún paciente consienta en donar una célula adicional y que no sea utilizada para descartar mosaicismo.

En la misma línea de trabajo que Klimanskaya y cols. (2006) se encuentran Takeuchi y cols. (2006), quienes han extraído blastó-

meras individuales de embriones de ratón en estadio de 8 células. Alternativamente extrajeron células individuales de MCI de blastocistos murinos. Las células fueron sembradas para producir células madre y los embriones biopsiados fueron transferidos a hembras receptoras para evaluar el daño. De 46 blastómeras aisladas obtuvieron una línea de células madre. El 93.5% de los embriones biopsiados desarrolló un blastocisto. La transferencia de embriones biopsiados de 8 células y la de blastocistos generados a partir de embriones biopsiados resultó, respectivamente, en un 50 y 30.8% de nacidos vivos, valores no diferentes del que obtuvieron con el grupo control. Cuando las 13 biopsias de MCI (cada una constando de 3-5 células individuales de MCI) fueron sembradas en forma separada, dieron origen a 4 líneas de células madre (28.6%). En el grupo control, la siembra de 51 blastocistos intactos dio origen a 9 líneas de células madre (17.6%).

Lim y cols. (2006) estimaron que es posible establecer líneas de células madre a partir de blastómeras aisladas de embriones de ratón de 2 y 4 células, pero la eficiencia es menor que cuando se utilizan embriones enteros.

Conclusión

En conclusión, la obtención de blastocistos a partir de agregados celulares podría ser un método genuino para obtener células madre ya que garantiza totalmente la no destrucción de embriones viables. Su eficiencia podría ser mayor comparada con los otros métodos que tampoco destruyen embriones viables: los productos de fecundación anómala y los embriones anormales según el DGP. La importancia de desarrollar estas técnicas, además de evitar la controversia ética, reside en aumentar las fuentes de células madre, ya que en general la provisión de pre-embriones humanos y la baja eficacia de estas técnicas son factores limitantes importantes.

Agradecimientos

El apoyo del IFER ha sido fundamental para la realización de nuestro trabajo. Estamos en deuda con los doctores Dante Paz (FCEyN, UBA), Alberto Valcárcel, Marisa Tiverón y Mariana Gómez Peña (IFER) por su constante apoyo a nuestra tarea. También queremos agradecer a los médicos y embriólogos del CEGyR por sus valiosas críticas cuando presentamos nuestros resultados durante un ateneo en 2006.

Bibliografía

- Alikani M** (2001). Cytoplasmic fragmentation in human embryos in vitro: implications and the relevance of fragment removal. In: Gardner D, Weisman A, Howles C, Shoham Z (eds). *Textbook of Assisted Reproductive Techniques, Laboratory and Clinical Perspectives*. Martin Dunitz, United Kingdom, pp. 169-182.
- Alikani M, Willadsen SM** (2002). Human blastocysts from aggregated mononucleated cells of two or more non-viable zygote-derived embryos. *Reprod Biomed Online* 5:56-58.
- Amit M, Itskovitz-Eldor J** (2002). Derivation and spontaneous differentiation of human embryonic stem cells. *J Anat* 200:225-232.
- Brevini TAL, Tosetti V, Crestan M, Paffoni A, Ragni G, Gandolfi F** (2006). Derivation and characterization of parthenogenetic human embryonic stem cells. Abstracts of the 22nd Annual Meeting of theESHRE, Prague, Czech Republic, 18-21 June. *Human Reproduction* 21, Supp 1 2006, O-238, pp. i93.
- Cho M, Jang M, Lee EJ, Han JY, Lim JM** (2006). An alternative method of deriving embryonic stem cell-like clones by aggregation of diploid cells with tetraploid embryos. *Fertil Steril* 85:1103-1110.
- 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.
- Cibelli, et al.** (2006) Parthenogenetic stem cells in nonhuman primates. *Science* 295(5556):819.

- Cieslak**-Janzen, et al. (2006). Multiple micromanipulations for PGD do not affect embryo development to the blastocyst stage. *Fertil Steril* 85:1826-1829.
- Cohen** J, Munné S (2005). Two-cell biopsy and PGD pregnancy outcome. *Hum Reprod* 20:2363-2364.
- Deb** K, Sivaguru M, Yong H, Roberts RM (2006). Cdx2 gene expression and trophectoderm lineage specification in mouse embryos. *Science* 311:992-996.
- de Melo**-Martin I, Rosenwaks Z, Fins JJ (2006). New methods for deriving embryonic stem cell lines: are the ethical problems solved? *Fertil Steril* 86:1330-1332.
- Draper** JS, Andrews PW (2002). Embryonic stem cells: advances toward potential therapeutic use. *Curr Opin Obstet Gynecol* 14:309-315.
- Eakin** GS, Behringer RR (2003). Tetraploid development in the mouse. *Dev Biol* 228:751-766.
- Edwards** R, Crow J, Dale S (1990). Preimplantation diagnosis and recurrent hydatidiform moles. *Lancet* 335:1030-J.
- Edwards** BE, Gearhart JD, Wallach EE (2000). The human pluripotent stem cell: impact on medicine and society. *Fertil Steril* 74:1-7.
- Escribá**, et al. (2001) Diploid rescue from triprounucleated human embryos. A new tool for embryo research. *Fertil Steril* 76, S238
- Escribá M-J**, Martín J, Rubio C, Valbuena D, Remohí J, Pellicer A, Simón C (2006). Heteroparental blastocyst production from microsurgically corrected triprounucleated human embryos. *Fertil Steril* 86:1601-1607.
- Frumkin** T, Yaron Y, Malcov M, Schwartz T, Mey-Raz T, Carmon T, Cohen T, Azem F, Amit A, Ben-Yosef D (2006). Self-Correction of Chromosomally Abnormal Embryos and its Implication for PGS. Alpha Biennal Conference. Luzern, September 15-17. *J Reproduktionsmed Endokrinol* 3:O13, pp. 269.
- Handyside** AH, et al. (1990). Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature* 344:768-770.
- Handyside** AH (1996). Commonsense as applied to eugenics: response to Testart and Sèle. *Hum Reprod* 11:707.
- Hansis** C, Tang Y, Grifo JA, Krey LC (2001). Analysis of Oct-4 expression and ploidy in individual human blastomeres. *Mol Hum Reprod* 7:155-161.
- Hardy** K, Martin KL, Leese H, Winston RM, Handside A (1990). Human preimplantation development in vitro is not adversely affected by biopsy at the 8-cell stage. *Hum Reprod* 5:708-714.
- Holtz** W (2005). Recent developments in assisted reproduction in goats. *Small Ruminant Research* 60:95-110.
- Kattera** S, Chen C (2003). Normal birth after microsurgical enucleation of triprounuclear human zygotes: case report. *Hum Reprod* 6:1319-1322.
- Klimanskaya** I, Chung Y, Becker S, Lu S-J, Lanza R (2006). Human embryonic stem cells lines derived from single blastomeres. *Nature* doi:10.1038/nature05142;2006.
- Lanzendorf** SE, Boyd CA, Wright DL, Muasher S, Oehninger S, Hodgen GD (2001). Use of human gametes obtained from anonymous donors for the production of human embryonic stem cells lines. *Fertil Steril* 76:132-137.
- Lawler** SD, Fisher RA, Dent J (1991). A prospective genetic study of complete and partial hydatidiform moles. *Am J Obstet Gynecol* 164:1270-1277.
- Lim** CK, Sung JH, Choi HW, Cho JW, Shin MR, Jun JH (2006). Establishment of embryonic stem cell lines from isolated blastomeres from mouse preimplantation embryos. Abstracts of the 22nd Annual Meeting of the ESHRE, Prague, Czech Republic, 18-21 June. *Human Reproduction* 21, Supp 1 2006, O-240, pp. i93.
- Maaswinkel-Mooij** PD, van Zwieten P, Mollevanger P, van Noort E, Beverstock G (1992). A girl with 71,XXXXY karyotype. *Clin Genet* 41:(2)96-99.
- MacLaren** LA, Anderson GB, BonDurant RH, Edmondson AJ (1993). Reproductive cycles and pregnancy in interspecific sheep-goat chimaeras. *Reprod Fertil Dev* 5:261-270.
- Magli** MC, et al. (2006). Cryopreservation of biopsied embryos at the blastocyst stage. *Hum Reprod* doi:10.1093/humrep/del228 (published on line 12 June 2006).
- Mitalipova** M, Calhoun J, Shin S, Wininger D, Schulz T, Noggle S, Venable A, Lyons I, Robins A, Stice S (2003). Human embryonic stem cells lines derived from discarded embryos. *Stem Cells* 21:521-526.
- Munné** S, Tang YX, Grifo J, Cohen J (1993). Origin of single pronucleated human zygotes. *J Assist reprod Genet* 10:276-279.
- Munné** S, Velilla E, Colls P, Bermudez MG, Garrisi J, Cohen J (2005). Self-correction of chromosomally abnormal embryos in culture and implication for stem cell production. Abstracts of the 21st Annual Meeting of the ESHRE: O-020.

- Niemann-Seyde** SC, Rehder H, Zoll B (1993). A case of full triploidy (69,XXX) of paternal origin with unusually long survival time. *Clin Genet* 43:79-82.
- Pearson** H (2006). Early embryos can yield stem cells... and survive. *Nature* 442:858.
- Peeters** K, Moordtgat K, VanAssche E, Punjabi U (2006). Genetic Mosaicism in Donated Cryo-preserved 8-Cell Embryos of Good Quality. Alpha Biennal Conference. Luzern, September 15-17. *J Reproduktionsmed Endokrinol* 3:O15, pp. 270.
- Piotrowska-Nitsche** K, Perea-Gomez A, Haraguchi S, Zernicka-Goetz Z (2005). Four-cell stage mouse blastomeres have different developmental properties. *Development* 132:479-490.
- Plachot** M, Crozet N (1992). Fertilization abnormalities in human in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 7:89-94.
- Plachot** M, Mandelbaum J (1990). Oocyte maturation, fertilization and embryonic growth in vitro. *Br Med Bull* 46:675-694.
- Reubinoff** B, Pera M, Fong C, Trounson A, Bongso A (2000). Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nature Biotechnol* 18:399-404.
- Sathananthan** AH, Tarín JJ, Gianaroli L, Ng SC, Dharmawardena V, Magli C, et al. (1999). Development of the human dispermic embryo. *Hum Reprod Update* 5:553-560.
- Schulman** JD, Edwards RG (1996). Preimplantation diagnosis is disease control, not eugenics. *Hum Reprod* 11:463-464.
- Solter** D, Gearhart J (1999). Putting Stem Cells to Work. *Science* 283:1468-1470.
- Somerville** MA. Ethical issues in reproductive medicine: a forum for conflict on societal values. Serono, Inc., Endowed Lectureship, ASRM Annual Meeting, October 16-20, Philadelphia, USA, 2004.
- Sultan** KM, Munné S, Palermo GD, Alikani M, Cohen J (1995). Chromosomal status of uni-pronuclear human zygotes following in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 10:132-136.
- Staessen** C, Van Steirteghem AC (1997). The chromosomal constitution of embryos developing from abnormally fertilized oocytes after intracytoplasmic sperm injection or conventional in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 12:321-327.
- Staessen** C, et al. (2004). Comparison of blastocyst transfer with or without preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in couples with advanced maternal age: a prospective randomized controlled trial. *Hum Reprod* 19:2849-2858.
- 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.
- Takeuchi** T, Neri QV, Rosenwaks Z, Palermo GD (2006). An approach to harvesting of embryonic stem cells that allows embryo conservation. Abstracts of the 22nd Annual Meeting of the ESHRE, Prague, Czech Republic, 18-21 June. *Human Reprod* 21, Supp 1 2006, O-237, pp. i92.
- Tam** PP, Rossant J (2003). Mouse embryonic chimeras: tools for studying mammalian development. *Development* 130:6155-6163.
- Tarkowski** AK (1998). Mouse chimaeras revisited: recollections and reflections. *International Journal of Developmental Biology* 42:903-908.
- Thomson** JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282:1145-1147.
- Winkel** GK, Pedersen RA (1998). Fate of the inner cell mass in mouse embryos as studied by microinjection of lineage tracers. *Dev Biol* 127:143-156.