

***Factores embriotóxicos tempranos como  
posible mecanismo de infertilidad en  
pacientes con aborto habitual y esterilidad  
sin causa aparente***

*Seudónimo: Ciencia y desarrollo*  
*Autores: Dra. Azucena Mercedes Rodríguez*  
*Dr. Roberto Martínez Coronado*

1er. Premio Nivel A

Hospital IV  
Edgardo Rebagliati Martins

## ***Factores embriotóxicos tempranos como posible mecanismo de infertilidad en pacientes con aborto habitual y esterilidad sin causa aparente***

### ***Introducción***

La presencia de factores que interfieren con el desarrollo del embrión durante los primeros días de vida ha sido establecida por estudios epidemiológicos, sin haberse logrado ningún ensayo que permita identificar los riesgos potenciales de una mujer con presencia de estos factores y prevenir un aborto o definir su diagnóstico cuando todas las pruebas rutinarias para determinar la etiología de su infertilidad han sido salvadas.

Estos factores embriotóxicos podrían actuar desde etapas muy tempranas, en el período preimplantacional comprendido entre la fertilización y el establecimiento de la preñez, la cual es una etapa decisiva y sumamente frágil en donde ocurriría la mayor cantidad de pérdidas embrionarias, tal es así que pacientes con infertilidad no explicada pueden deber su diagnóstico a pérdidas tan tempranas que resultan imposibles de ser detectadas por ellas mismas, confundiendo con una menstruación más.

Los trabajos de Spielmann (1987) y Porter y Singh (1988) han puesto en evidencia dos aspectos sumamente importantes para abordar este problema; demostraron que el embrión durante el período previo a su implantación y durante ésta, es sensible a sustancias embriotóxicas y genotóxicas (clastogénicas), y que es factible identificar la presencia de estos factores en el suero humano. Su contribución también es valiosa porque destaca la utilización de embriones de ratón como modelo *in vitro* para la identificación de la presencia de éstos, planteando una metodología para determinar sus efectos tanto durante las primeras divisiones celulares del embrión como durante su implantación.

El presente trabajo tiene como objetivo identificar la presencia de factores embriotóxicos tempranos como posible causa de infertilidad, evaluando puntos de control morfogénéticos, citológicos y citogenéticos en embriones preimplantacionales, usando parámetros sensitivos tales como compactación y formación de mórula, número celular e índice mitótico, frecuencia de micronúcleos y frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas. Para ello, hemos empleado el cultivo *in vitro* de embriones de ratón en presencia de suero de mujeres con diagnóstico de infertilidad no explicada o sin causa aparente y en abortadoras habituales.

## Material y métodos

### Pacientes

Las pacientes fueron seleccionadas del Departamento de Gineco-Obstetricia del Hospital Edgardo Rebagliati Martins del IPSS, a las que previamente se les realizó estudios evaluativos de:

- a) Factor tubo-peritoneal a través de histerosalpingografía, ecografía y/o laparoscopia;
- b) Factor ovárico-endocrino a través de perfil hormonal que incluye dosaje de FSH, LH, progesterona, prolactina, TSH y estradiol;
- c) Factor cervical a través del Test de Sims Hubner (post-coital);
- d) Factor infeccioso a través de dosaje de anticuerpos IgG e IgM para toxoplasma y citomegalovirus.

Los criterios de inclusión fueron pacientes infértiles con probados ciclos ovulatorios y que tuvieran alguno de los siguientes diagnósticos:

- Infertilidad no explicada o sin causa aparente
- Abortos habituales

Se excluyó los siguientes diagnósticos cuando éstos fueron única causa de infertilidad:

- Uso de contraceptivos anovulatorios o dispositivo intrauterino 3 meses antes del estudio
- Anomalías y obstrucciones del tracto reproductor.
- Factor cervical.
- Incompetencia cervical.
- Infecciones.
- Ciclos anovulatorios.
- Gestación durante el estudio.
- Factor masculino alterado.

### Obtención de muestras

A las pacientes seleccionadas se les tomó una muestra de sangre periférica para la obtención de suero el mismo que se inactivó a 56°C por 30 minutos, se filtró a través de una membrana de 0.45  $\mu\text{m}$  y se almacenó a -20°C hasta su uso.

### Cultivo de embriones

*Preparación de medios de cultivo:* Se utilizó el medio M2 (Quinn y col., 1982) tamponado con HEPES, pH 7.4, para la manipulación de los embriones fuera de la incubadora; y el medio M16 (Wittingham, 1971) para el cultivo en incubadora de CO<sub>2</sub>. La preparación de los medios se realizó con reactivos Sigma probados para cultivos celulares y con agua desmineralizada (Filtros Rovic) y purificada a través de un sistema de ósmosis reversa Milli RO y filtración Milli Q, la calidad de agua se midió de acuerdo a su resistencia considerándose adecuado 18 M  $\Omega$ . El medio se esterilizó mediante filtración en millipore de 0.25  $\mu\text{m}$ . El medio M16 se equilibró con 5% de CO<sub>2</sub> a pH 7.4 antes de introducir los embriones.

*Obtención y cultivo de embriones:* Ratones hembras Swiss del bioterio del Instituto de Investigaciones de la Altura de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, se trataron con 10 IU de gonadotropina sérica de ye-

gua preñada (PMSG; Sigma) y 10 IU de gonadotrofina coriónica humana (HCG; Sigma) 48 horas más tarde para inducir crecimiento folicular y sincronizar la ovulación. Las hembras fueron apareadas con machos fértiles comprobándose la cópula al día siguiente mediante observación de tapón vaginal. Embriones de 2 células tardías se obtuvieron a las 47 horas post-HCG y se cultivaron durante 2 ciclos de división (30 horas) en M16 suplementado con 20% de suero y 0.5  $\mu$ M de 5-Bromo-2-deoxiuridina (BrdU) para la identificación de intercambios de cromátides hermanas. Las incubaciones se realizaron a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> en aire y humedad a saturación. Tres horas antes de finalizar los cultivos se adicionó 0.1  $\mu$ g/ml de Colocemid (Demecolcine; Sigma) para obtener placas metafásicas analizables citogenéticamente.

### **Procesamiento de los embriones**

Al final del cultivo los embriones fueron procesados según la técnica de Tarkowski (1966), la que describimos brevemente: los embriones fueron incubados en una solución hipotónica de citrato de sodio al 0.75% por 10 minutos, luego fueron fijados sobre una lámina porta-objetos helada con una mezcla de metanol: ácido acético (3:1, v/v). Para visualizar los intercambios de cromátides hermanas se empleó la técnica de Perry y Wolff (1974) modificada: las láminas fueron incubadas en Hoechst 33258  $1 \times 10^{-4}$ M por 30 minutos, irradiados con luz ultravioleta a 10 cm en cámara húmeda y en oscuridad, luego lavados con solución salina 2X a 60°C por 2 minutos, finalmente las láminas fueron coloreadas con Giemsa al 2%.

### **Evaluaciones**

*Evaluación morfológica:* Se evaluó con ayuda de un microscopio invertido con contraste de fases la cantidad de embriones de 2 células que han desarrollado al menos un ciclo de división y aquellos que han alcanzado el estado de mórulas al final del cultivo.

*Evaluación citológica y citogenética:* Se determinó el número celular e índice mitótico. Además se siguió los criterios de Müller y col. (1985) para evaluar la presencia de micronúcleos y de Porter y Singh (1988) para la evaluación de cromosomas con intercambio de cromátides hermanas sólo en aquellas metafases que presentaron 40 cromosomas (Figura 1c).

### **Grupo control**

Se realizó cultivos paralelos de embriones en medios suplementado con suero de mujeres púerperas sanas que hayan tenido parto y producto normal.

### **Análisis estadísticos**

A las variables expresadas en porcentajes se les aplicó la prueba de diferencias de proporciones, mientras que los valores expresados en medias se les aplicó la prueba de t-Student para determinar la significación estadística.

## Resultados

Se incluyó 15 sueros de pacientes con diagnóstico de infertilidad divididas en dos grupos, 8 con abortos habituales y 7 con esterilidad sin causa aparente. En el grupo control se incluyó 15 sueros de pacientes púerperas. Todas las pacientes presentaron un perfil hormonal dentro de los rangos de normalidad establecidos para las pruebas de RIA en el IPSS.

Después de 30 horas de incubación los embriones fueron analizados morfológicamente haciéndose la evaluación de los embriones clivados y de aquellos que habían alcanzado el estado de mórula, el máximo estadio esperado. Los embriones de 2 células cultivados en presencia de suero de pacientes con esterilidad sin causa aparente mostraron una significativa inhibición del desarrollo, ( $P < 0.05$ ) 69.6%, frente a los embriones cultivados en suero de pacientes fértiles quienes clivaron en un 91.6%. Por otro lado los embriones cultivados en presencia de suero de mujeres con abortos habituales mostraron un retardo en su desarrollo (21.6%,  $P < 0.01$ ) en comparación a los cultivados en suero de pacientes fértiles en donde se encontró un mayor número de mórulas (52.9%) (Tabla 1). Sin embargo el promedio del número de células entre los grupos estudiados no fue diferente, así también el índice mitótico no mostró diferencias significativas (Tabla 2, Figura 1a).

Los embriones cultivados en suero de pacientes subfértiles tanto abortadoras habituales como sin causa aparente mostraron un significativo incremento ( $p < 0.01$  y  $P < 0.05$  respectivamente) en la frecuencia de micronúcleos con respecto a los embriones cultivados en suero de pacientes fértiles. Más aún, el número de embriones que presentaron micronúcleos en los grupos con infertilidad (50.0% en abortadoras habituales y 46.2% sin causa aparente) contrasta notablemente con el grupo de pacientes fértiles (5.0%) (Tabla 3, Figura 1b). No se encontró diferencias en el número de metafases con intercambios de cromátides hermanas ni en la frecuencia de intercambios por metafase en los grupos estudiados (Tabla 4, Figura 1d).

**Tabla 1.** Desarrollo de embriones cultivados en medio suplementado con suero de pacientes fértiles y sub-fértiles

Pacientes	Embriones Cultivados	Embriones en Desarrollo	Embriones en Estado de Mórulas
Sub-Fértiles	60	49(81.7)	17(20.3)a
-Abortadoras	37	33(89.2)	8(21.6)a
-E.S.C.A.	23	16(69.9b)	9(39.1)
Fértiles	34	31(91.6)	18(52.9)

E.S.C.A. = Esterilidad sin causa aparente. Los porcentajes están entre paréntesis.

a  $P < 0.01$  y b  $P < 0.05$  con respecto a los sueros de pacientes fértiles (Prueba de diferencia de proporciones).

**Tabla 2.** Número de células e Índice Mitótico en embriones cultivados en medio suplementado con suero de pacientes fértiles y sub-fértiles

Pacientes	Embriones Analizados	Número de Células	Índice Mitótico
Sub-Fértiles	37	5.46 ± 0.43	0.246 ± 0.038
- Abortadoras	24	5.65 ± 0.59	0.239 ± 0.059
- E.S.C.A	13	5.17 ± 0.67	0.259 ± 0.034
Fértiles	20	5.55 ± 0.39	0.211 ± 0.068

E.S.C.A. = Esterilidad sin causa aparente. El número de células se expresa en promedios. Índice mitótico = número de células en mitosis/número de células por embrión. Las cifras se expresan en promedios ± error estandar. P: No significativo (t-Student).

**Tabla 3.** Frecuencia de micronúcleos en embriones cultivados en medio suplementado con suero de pacientes fértiles y sub-fértiles

Pacientes	Embriones Analizados	Embriones con Micronúcleos (%)	Frecuencia de Micronúcleos
Sub-fértiles	37	18(48.6)a	0.123 ± 0.035c
-Abortadoras	24	12(50.0)a	0.083 ± 0.023d
-E.S.C.A	13	6(46.2)b	0.188 ± 0.080c
Fértiles	20	1(5.0)	0.010 ± 0.010

E.S.C.A. = Esterilidad sin causa aparente. Frecuencia de micronúcleos = número de células con micronúcleos/número total de células por embrión; las cifras se expresan en promedios ± error estandar.

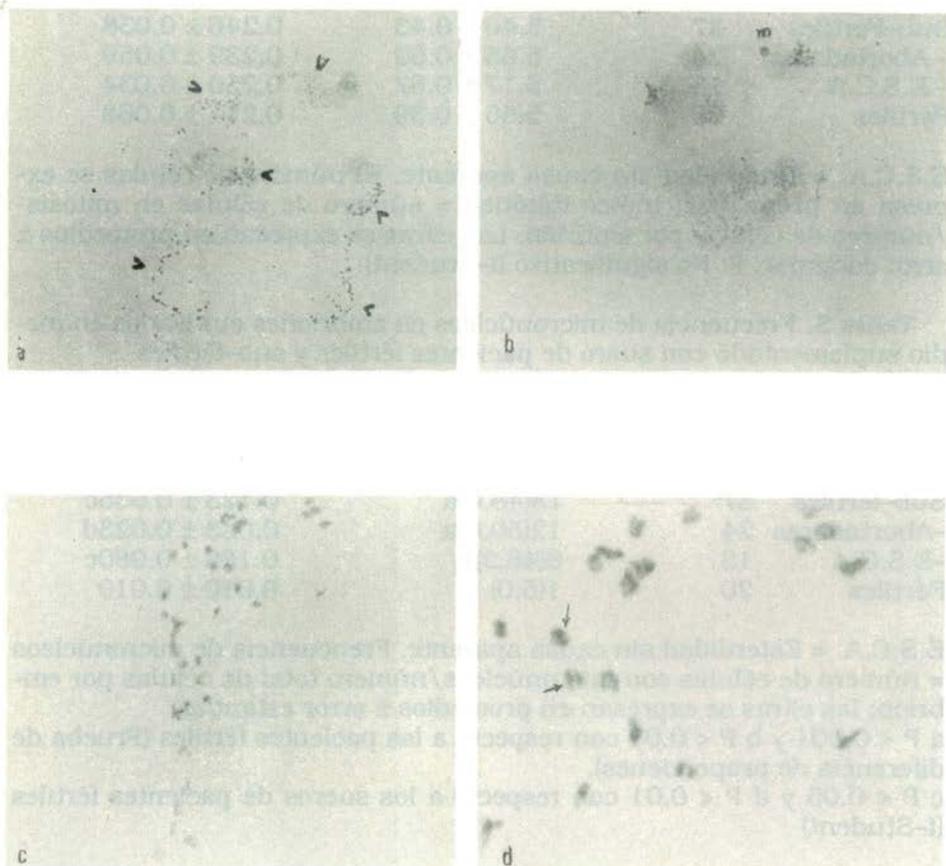
a P < 0.001 y b P < 0.01 con respecto a las pacientes fértiles (Prueba de diferencia de proporciones).

c P < 0.05 y d P < 0.01 con respecto a los sueros de pacientes fértiles (t-Student)

**Tabla 4.** Intercambio de cromátides hermanas en embriones cultivados en medio suplementado con suero de pacientes fértiles y sub-fértiles

Pacientes	Metafases Analizadas	Metafases con ICH/ Metafases analizadas	ICH/ Metafase
Sub-fértiles	22	0.65 ± 0.12	2.7 ± 0.94
- Abortadoras	16	0.51 ± 0.15	1.4 ± 0.68
-E.S.C.A.	6	0.89 ± 0.11	3.2 ± 2.39
Fértiles	10	0.43 ± 0.30	1.9 ± 1.58

E.S.C.A. = Esterilidad sin causa aparente. Las cifras se expresan en promedios + error estandar. P: No significativo (t-Student).



**Figura 1.** Embriones cultivados con BrdU 0.5uM en suero de pacientes fértiles y sub-fértiles y procesados mediante la técnica de Tarkowski modificado para el conteo de núcleos, determinación del índice mitótico, micronúcleos e intercambio de cromátides hermanas. a) Embrión de 8 células cultivado en suero de pacientes fértiles. Se observa 6 metafases (flechas). b) Embrión de 6 células cultivado en suero de paciente sub-fértil donde es posible observar la presencia de un micronúcleo (m). c) Metafase analizable completa con 40 cromosomas. d) Cromosomas provenientes de un embrión cultivado en suero de pacientes sub-fértil mostrando intercambio de cromátides hermanas (flechas).

### Discusión

Hemos establecido un protocolo que permite la identificación de factores embriotóxicos en suero de mujeres con abortos habituales y con infertilidad sin causa aparente mediante la evaluación del desarrollo y el análisis citológico y citogenético de embriones preimplantacionales de ratón cultivados en presencia de suero proveniente de estas pacientes.

Mediante la evaluación del desarrollo de los embriones se ha podido observar que los sueros de abortadoras habituales tienen un factor que altera el desarrollo embrionario dado que la cantidad de mórulas encontradas al final del cultivo es significativamente reducido comparado a los controles; así, también se observa que el suero de mujeres con esterilidad sin causa aparente afectan el clivaje. Estos resultados son concordantes con lo reportado por Chávez y McIntery (1984) quienes utilizando embriones de ratón cultivados en suero de mujeres y Klein y colaboradores (1982) utilizando embriones de rata en suero de monos, ambos grupos con historias de abortos recurrentes, reportaron anomalías en el desarrollo de embriones preimplantacionales. Existe una verdadera controversia sobre el rol de los antígenos de histocompatibilidad en el establecimiento del embarazo. Algunos investigadores han encontrado que parejas que comparten algunos antígenos de histocompatibilidad tienen una alta posibilidad de aborto espontáneo (Beer y col., 1983; Lauritsen y col., 1976; Aoki y Yagami, 1983; Unander y Lindholm, 1986). Zigril y colaboradores (1991) estudiando el suero de 17 abortadoras en la Escuela de Medicina de la Universidad de Tel-Aviv demostró la inhibición del desarrollo de embriones de ratón cuando estos fueron cultivados en medio suplementado con suero de estas pacientes; el fenómeno fue revertido al ensayar un procedimiento de inmunopotenciación. Otros investigadores por el contrario no encuentran relación alguna entre los antígenos de histocompatibilidad y el desarrollo embrionario (Caudle y col., 1983; Oksenberg y col., 1984; Sargent y col., 1988; Christiansen y col., 1989; Eroglu y col., 1992).

Damewood y colaboradores (1990) reportaron una inhibición del desarrollo de los embriones de 2 células cultivados en 31 sueros de mujeres infértiles con endometriosis leve y moderada, así también Morcos y colaboradores (1985) utilizando fluido peritoneal de 18 pacientes infértiles con endometriosis y Prough y colaboradores (1990) utilizando fluido peritoneal fraccionado de 10 pacientes reportaron efectos tóxicos sobre embriones de 2 células de ratón. Los estudios de Fakih y colaboradores (1987) con líquido peritoneal de 11 pacientes tuvieron semejantes resultados y fueron interpretados como una posible alteración inmunológica con secreción de citotóxicos principalmente interleukina-1 producidos por macrófagos activados por la endometriosis. Sin embargo Shneider y colaboradores (1989) no han encontrado efectos tóxicos en el desarrollo embrionario del ratón en presencia de Interleukina-1, Interleukina-2 ni ningún otro producto soluble producido por los macrófagos, por último Haimovici y colaboradores (1991) utilizando una serie de citokinas concluyó que algunos de ellos favorecen el desarrollo de los embriones mientras que otros lo perjudican. En el estudio realizado por nosotros con suero de 15 pacientes infértiles no tendría explicación los posibles efectos embriotóxicos causados por la endometriosis puesto

que a las seleccionadas para el presente estudio se les descartó mediante laparoscopia esta alteración.

Sorprendentemente el número de células así como el índice mitótico no se ve alterado en ninguno de los grupos estudiados lo que nos permite sospechar que son los eventos morfogénéticos y no la cinética de división lo que se vería afectado, en este caso la compactación del embrión que ocurre durante el estado de 8 células y establece el inicio de un complejo proceso de citodiferenciación (ver revisión: Fleming y Johnson, 1988; Pratt, 1989).

Nuestros resultados reflejan la posibilidad de identificar factores embriotóxicos y sugerir su participación como responsables de infertilidad asociadas a pérdidas embrionarias tempranas. Lo que explicaría, por lo menos en parte, los datos provenientes de estudios epidemiológicos donde indican que las pérdidas del embarazo antes de la doceava semana son del orden del 62 al 70% y más aún que el 92% de ellas ocurran subclínicamente sin que la madre lo note (Leridon 1977; Edmonds et al, 1982; revisión de Volpe, 1987). Además, en los abortos clínicos la mayor causa de pérdidas puede deberse a razones cromosómicas. Así, del 50 al 70% de los casos presentan alteraciones citogenéticas (Boué & Boué, 1976; Hassold et al, 1980; Stein, 1981). En los abortos subclínicos sin embargo, por su propia naturaleza, se desconocen las causas, pero las anomalías cromosómicas parecen no ser la mayor ya que embriones humanos fertilizados y desarrollados *in vitro* en suero de pacientes con infertilidad tubaria (97.7% de los casos) fueron analizados citogenéticamente durante su desarrollo preimplantacional indicando que el 12.5% de los embriones morfológicamente buenos (93% de los embriones fecundados *in vitro*) poseen anomalías cromosómicas (Plachot et al, 1987), por lo que la mayor parte de pérdidas muy tempranas se debe a otras razones.

El análisis citogenético que hemos realizado en los embriones preimplantacionales contemplan dos parámetros sensitivos que demuestran efectos clastogénicos. La presencia de micronúcleos nos indica cromatina expulsada durante la anafase por deleciones cromosómicas; mientras que el intercambio de cromátides hermanas es una medida indirecta para medir daño y reparación en el DNA.

En nuestro trabajo los embriones analizados citogenéticamente tuvieron buena morfología mientras que los degenerados (sin significancia estadística, dato no mostrado) no fueron incluidos en el análisis. La alta frecuencia de micronúcleos encontrados en embriones cultivados tanto en suero de abortadoras habituales (50%) como en suero de mujeres con esterilidad sin causa aparente (46.2%) se podría deber a una contribución de agentes clastogénicos maternos, tal como es sugerido en los estudios experimentales de Spielmann y Vogel (1989).

Por otro lado, la frecuencia de intercambios de cromátides hermanas no es significativamente diferente entre ninguno de los grupos estudiados. Sin embargo, desde que un incremento en la frecuencia de intercambio de cromátides puede no solamente indicar daño en el DNA, sino también su reparación, el hecho de haberse encontrado un significativo incremento en la frecuencia de micronúcleos que denotan daño citogenético y una frecuencia de intercambio de cromátides normal, puede

ser explicado por una inhibición en la reparación del DNA dañado.

Por último podemos concluir que el cultivo de embriones preimplantacionales de ratón es una herramienta importante como procedimiento diagnóstico, permitiendo identificar en el suero de mujeres agentes embriotóxicos y mutagénicos incompatibles con el desarrollo embrionario y que pueden ser causantes de pérdidas del embarazo. Esta prueba además es específica para cada paciente y los resultados pueden obtenerse en pocos días con una información útil en la identificación de estos problemas reproductivos y en la selección de sueros utilizables en programas de fecundación asistida.

### Agradecimientos

Los autores agradecen al Dr. Gustavo Gonzales R. por su apoyo a la realización del presente trabajo. A la Bióloga Mónica Paredes A. por su colaboración en la parte experimental.

### Referencias

Aoki, K; Yagami, Y. (1983) HLA-DR compatibility couples with recurrent abortions. *Reprod. Immunol.* 112 (suppl. 1): 97.

Beer, AE; Quebbleman, JF; Semprini, AE; Smouse, PE; Haines, RF. (1983) Recurrent abortion: analysis of the roles of parental sharing of histocompatibility antigens and maternal immunological responses to paternal antigens.

In: *Reproduction and Immunology* (Isojima S, Billington WD, eds.) Amsterdam: Elsevier, 185-195.

Boué, JG; Boué, A. (1976) Chromosomal anomalies in early spontaneous abortion. *Curr. Top. Pathol.* 62:193-208.

Caudle, MR; Rote, NS; Scott, JR; Dewitt, C; Burney, MF. (1983) Histocompatibility in couples with recurrent spontaneous abortion and normal fertility. *Fert. Steril.* 39:793-798.

Chávez, DJ; McIntyre, JA. (1984) Sera from women with histories of repeated pregnancy losses cause abnormalities in mouse preimplantation mouse blastocyst. *J. Reprod. Immunol.* 6:273-281.

Christiansen, OB; Riison, K; Lauritsen, JG; Grunnet, N. (1989) No increased histocompatibility antigen-sharing in couples with idiopathic habitual abortions. *Human Reprod.* 4:160-162.

Damewood, MD; Hesla, JS; Schlaff, WD; Hubbard, M; Gearhart, JD; Rock, JA. (1990) Effect of serum from patients with minimal to mild endometriosis on mouse embryo development in vitro. *Fert. Steril.* 54:917-920.

Edmonds, DK; Lindsay, KS; Miller, JF; Williamson, E; Wood, PJ. (1982) Early embryonic mortality in women. *Fert. Steril.* 38:447-453.

Eroglu, G; Betz, G; Torregano, C. (1992) Impact of histocompatibility antigens on pregnancy outcome. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 166: 1364-1369.

Fakih, H; Bagget, B; Holtz, G; Tsang, K-Y; Lee, JC; Williamson, HO. (1987) Interleukin-1: a possible role in the infertility associated with endometriosis. *Fert. Steril.* 47:213-217.

Fleming, TP; Johnson, MH. (1988) From egg to epithelium. *Ann Rev. Cell Biol.* 4: 459-485.

Haimovici, F; Hill, JA; Anderson, DJ. (1991) The effects of soluble products of activated lymphocytes and macrophages on blastocyst implantation events *in vitro*. *Biol. Reprod.* 44: 69-75.

Hassold, TN; Chen, N; Funkhouser, J; Jooss, T; Manuel, B; Matsiira, K; Matsuyama, A; Wilson, C; Yamane, JA; Jacobs, PA. (1980) A cytogenetic study of 1000 spontaneous abortions. *Ann. Hum. Genet.* 44:151-164.

Klein, NW; Plenefish, JD; Sackett, SW. (1982) Serum from monkeys with histories of fetal wastage cause abnormalities in cultured rat embryos. *Science* 215: 66-69.

Lauritsen, JG; Kristensen, T; Grunnet, N. (1976) Depressed mixed lymphocytes culture reactivity in mothers with recurrent spontaneous abortion. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 125: 35-39.

Leridon, H. (1977) Human fertility; The basic component. The University of Chicago Press, Chicago.

Morcos, RN; Gibbons, WE; Findley, WE- (1985) Effect of peritoneal fluid on *in vitro* cleavage of 2-cell mouse embryos: possible role in infertility associated with endometriosis. *Fert. Steril.* 44:678-683.

Müller, W; Streffer, C; Wurm, R. (1985) Supraadditive formation of micronuclei in preimplantation mouse embryos *in vitro* after combined treatment with X-rays and caffeine.

*Terat. Carcin. Mutag.* 5:123-131.

Oksenberg, JR; Persitz, E; Amar, A; Brautbar, C. (1984) Maternal-paternal histocompatibility: lack of association with habitual abortions. *Fert. Steril.* 42:389-395.

Perry, P; Wolff, S. (1974) New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature* 251: 156-158.

Plachot, M; de Grouchy, J; Junca, A-M; Mandelbaum, J; Turleau, C; Couillin, P; Cohen, J; Salat-Baroux, J. (1987) From oocyte to embryo: a model, deduced from *in vitro* fertilization, for natural selection against chromosome abnormalities. *Ann. Génét.* 30: 22-32.

Porter, AJ; SM. (1988) Toxicity and sister-chromatid exchange in cultured preimplantation mouse embryos exposed to serum from cyclophosphamide-treated rats: possible implications for testing maternal serum genotoxicity. *Mutagenesis* 3: 45-49.

Pratt, HPM. (1989) Marking time and making space: Chronology and topography in the early mouse embryo. *Int. Rev. Cytol.* 117: 99-130.

Prough, SG; Aksel, S; Gilmore, SM; Yeoman, RR. (1990) Peritoneal fluids fractions from patients with endometriosis do not promote two-cell mouse embryo growth. *Fert. Steril.* 54:927-930.

Quinn, P; Barros, C; Whittingham, DG. (1982) Preservation of hamster oocytes to assay the fertilizing capacity of human spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 66:161-168.

Sargent, IL; Wilkins, T; Redman, CWG. (1988) Maternal immune response to the fetus in early pregnancy and recurrent miscarriage. *Lancet* 2: 1099-1104.

Schneider, EG; Armant, DR; Kupper, TS; Polan, ML. (1989) Absence of a direct effect of recombinant interleukins and cultured peritoneal

macrophages on early embryonic development in the mouse. *Biol. Reprod.* 40: 825-833.

Spielman, H. (1987) Analysis of embryotoxic effects in preimplantation embryos. *In: The mammalian preimplantation embryo.* (Barry D. Bavister, ed.), Plenum Publishing Corporation, New York, 309-331.

Spielmann, H; Vogel, R. (1989) Unique role of studies on preimplantation embryos to understand mechanism of embryotoxicity in early pregnancy. *Critical Reviews in Toxicology* 20:51-64.

Stein, Z. (1981) Early fetal loss. *Birth Defects: Original Article Series (March of Dimes)* 17 (N° 1) 95-111.

Tarkowski, AK (1966) An air-drying method for chromosome preparation from mouse eggs. *Cytogenetics* 5:394-400.

Unander, AM; Lindholm, A. (1986) Transfusions of leukocytetrich erythrocyte concentrates: A succesful treatment in selected cases of habitual abortio. *Am J. Obstet. Gynecol.* 154: 516-520.

Volpe. EP. (1987) Developmental Biology and human concerns. *Am. Zool.* 27:697-714.

Whittingham, DG. (1971) Culture of mouse ova. *J. Reprod. Fert.* 14: 7-21 (Suppl).

Zigril, M; Fein, A; Carp, H; Toder, V. (1991) Immunopotentialiation reverses the embryotoxic effect of serum from women with pregnancy loss. *Fert. Steril.* 56:653-659.