

ESTUDI DE L'EMBRIOTOXICITAT I CITOTOXICITAT COM A CONTROL DE QUALITAT BIOLÒGIC EN UN PROGRAMA DE FECUNDACIÓ *IN VITRO*

INMACULADA MOLINA I PEDRO J. FERNÁNDEZ

Departament d'Obstetrícia i Ginecologia. Unitat de Reproducció Humana. Hospital Universitari La Fe. València.

RESUM

L'avaluació del creixement *in vitro* d'embrions de ratolí (embriotoxicitat) és el mètode més emprat per controlar els medis, sèrums, materials i equips utilitzats en un laboratori de fertilització *in vitro* (FIV). Hi ha diversos models per realitzar aquest estudi: embrions de ratolí de dues cèl·lules, amb zona pel·lúcida o sense, i embrions d'una cèl·lula o embrions en pronúclis. Després de fer estudis paral·lelament amb el model de dues cèl·lules amb zona pel·lúcida, s'ha demostrat la validesa d'aquest model per realitzar controls de qualitat biològics. Així mateix, s'hi ha descrit una variació intraassaig i interassaig del 10-15 %. També s'hi han observat diferències significatives a l'1% ($p < 0,01$) entre medis amb suplementació proteica o sense ella. Les condicions físico-químiques del medi (pH i Osm) per a ratolí i per a clínica humana es troben en els intervals 7,7-7,8 i 270-310, per al pH i Osm respectivament. S'hi planteja l'estudi de la toxicitat dels medis mitjançant l'hibridoma 1E6, especialment sensible a les condicions subòptimes del medi de cultiu. Hom creu interessant la realització d'estudis comparatius d'embriotoxicitat, per tal de comprovar la validesa proposada per als controls de qualitat en què s'estudia només citotoxicitat.

SUMMARY

The evaluation of mouse embryos grown *in vitro* is the best method for quality control of medium, serum, materials and equipment used in a I.V.F. program. There are 3 different models for realization of this study: two cell mouse embryos with zona pellucida, two cell mouse embryos without zona and one cell embryos (or pronuclear embryos).

We have conducted a comparative study of the different culture conditions on the two cell model and have concluded that this model is the best one for quality control. However we have observed a variation of 10% between the different results of the same test. We obtained significant differences when we compared medium without a proteic supplement. Attending the physicochemical conditions of the culture media the most adequate range was 7,4-7,8 for the pH and 270-310 for the Osm.

In our opinion in order to improve quality control it would be preferable to study citotoxicity rather embryotoxicity. This study could be conducted using hibrydoma 1E6 which is very sensitive at suboptimal conditions of the culture media. Therefore we consider it to be very important to undergo a comparative study between embryo and citotoxicity to be able to demonstrate the potential validity of this model.

Les condicions de cultiu *in vitro* de gàmetes i embrions de mamífer han estat objecte de nombroses publicacions. La major part d'aquestes, relacionades amb la selecció i millora de determinades espècies ramaderes, estan encaminades a aconseguir un increment en la producció animal: d'aquestes no ens n'ocuparem en aquest treball. Únicament farem referència als estudis realitzats en mamífers de laboratori (29, 42, 97, 144, 162, 168, 178, 181, 197, 222, 230, 231). El desenvolupament de les tècniques bàsiques de recuperació i cultiu de gàmetes i embrions necessitava determinades espècies que reunissen una sèrie de condicions mínimes: fàcil maneig i emmagatzemament, grandària petita, cicle estral curt, producció d'un nombre elevat de cries i creixement ràpid d'aquestes, i també caràcters reproductius uniformes (al màxim dins del possible) que permetessen la repetitivitat dels estudis. D'entre els diferents animals de laboratori utilitzats en els treballs, el més abundant va ser el ratolí (9, 21, 22, 50, 64, 120, 121, 129, 134, 135, 213, 224), tot i que també se'n van fer servir altres com l'hàmsster (41, 94, 118, 182, 194, 242) i el conill (25, 44, 45, 46, 50, 92, 93, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 196).

Els primers bioassaigs realitzats es limitaven al cultiu *in vitro* de gàmetes (14, 35, 53, 54, 66, 68, 75, 95, 107, 108, 195, 242, 245), i posteriorment es passava al cultiu d'embrions obtinguts *in vivo* (1, 9, 13, 20, 22, 23, 24, 32, 34, 36, 98, 99, 152, 231). El fet que els embrions es desenvolupassen en aquestes condicions va resultar una prova concloent del fet que els medis de cultiu eren capaços de mimetitzar l'efecte del fluid oviductal i uterí.

En estudis posteriors es va mirar d'obtenir embrions per fecundació *in vitro*, i en aquesta línia l'espècie més utilitzada va ser també el ratolí. Així doncs, una volta estudiats els requeriments bàsics per al cultiu *in vitro* de gàmetes, es van desenvolupar les tècniques de fecundació *in vitro* del ratolí (2, 3, 8, 81, 104, 105, 137, 138, 145, 146, 147, 154, 171, 218, 219, 234) tot assajant-se diferents medis de cultiu amb diferents additius: sèrums (3, 14, 59, 64, 106, 164, 165), proteïnes (33, 37, 40, 76, 175, 197), nitrogen (21, 38, 39, 60, 61, 62, 213), insulina (82, 100, 135), àcids grassos (80, 180), fluid fol·licular (60), líquid peritoneal (151), secrecions oviductals i uterines (19, 84, 123, 141, 176, 192, 233), factors de creixement (31, 49, 51, 96, 106, 228, 240)...., i també d'altres

components (83, 188, 193, 198, 216, 226, 227, 228, 237, 238). La posada a punt de la fecundació *in vitro* en ratolí va possibilitar la realització de transferències embrionàries (TE), i d'aquesta manera es va poder estudiar la sincronització de l'estre (8, 138, 171, 228), efecte de les secrecions oviductals i uterines sobre el desenvolupament embrionari previ a la implantació (19, 84, 123, 176, 224), taxa d'implantació (8, 171, 228), efecte de les tècniques d'ovulació i superovulació (81, 145, 148, 149, 232).

El fet que l'objecte de la major part d'aquests estudis fos el ratolí va permetre un profund coneixement d'aquest animal com a model biològic, que va possibilitar el plantejament de problemes molt diversos.

Una vegada establertes les condicions de cultiu adequades per al desenvolupament d'embrions de ratolí, es va pensar que una alteració d'aquestes condicions permetria conèixer quins components o materials podrien afectar adversament aquest creixement. Quan es van iniciar les tècniques de FIV i TE en clínica humana, es va plantejar la necessitat de trobar un control de qualitat que permetés valorar medis i materials utilitzats en els laboratoris. Ackerman i col·l. (4) van ser els primers a avaluar la possible embriotoxicitat dels medis de cultiu i materials emprats en un programa de FIV. L'avaluació del creixement *in vitro* d'embrions de ratolí va ser acceptada com l'únic control de qualitat possible en relació amb aquestes tècniques de reproducció assistida. Fins ara, el model de control de qualitat més utilitzat ha estat el basat en el desenvolupament d'embrions de ratolí de dues cèl·lules que conserven la zona pel·lúcida (4, 5, 12, 43, 51, 59, 63, 79, 86, 91, 102, 126, 133, 148, 149, 157, 159, 167, 170, 187, 205, 207, 208, 212, 225, 229, 241); no obstant això,

existeixen altres alternatives, com ara el model d'embrions de dues cèl·lules sense zona pel·lúcida (77, 150, 243), o bé el model en què es fan servir embrions de ratolí d'una cèl·lula (55, 57, 58, 63, 65, 109, 163, 166, 173, 214), i són considerats aquests darrers més sensibles a les condicions subòptimes del cultiu.

Com ja s'ha indicat, aquests bioassaigs permeten valorar l'embriotoxicitat dels medis de cultiu (3, 4, 5, 46, 51, 52, 86, 91, 126, 148, 149, 157, 159, 212, 214, 229), sèrums (4, 5, 52, 65, 78, 148, 149, 163, 164, 165), material i equips (4, 5, 52, 63, 65, 79, 157, 167, 170), i també els sistemes d'obtenció d'aigua ultrapura (67, 77, 91, 142, 143, 150, 166, 187, 207, 208, 243); i estan basats en la recuperació d'embrions de una o dues cèl·lules per perfusió de les ampul·les 24 o 48 hores postinducció de l'ovulació (inducció requerida per obtenir finalment un nombre suficientment elevat d'embrions) i aparellament dels ratolins. Els embrions de dues cèl·lules obtinguts es cultiven *in vitro* amb els medis o materials l'embriotoxicitat dels quals es desitja conèixer. Després de 72 hores de cultiu *in vitro* es valora el percentatge d'embrions que ha assolit l'estadi de blastocist en expansió (REN), i es considera que el medi no és embriotòxic quan almenys el 70 % dels embrions de dues cèl·lules cultivats assoleix l'estadi de blastocist.

En aquests controls, el blanc està constituït per un assaig en paral·lel amb el medi Ham F10 modificat, mentre que la mostra problema consistirà en el mateix medi amb determinats additius (o diferents tractaments) segons els components o materials que es desitgen controlar (4, 5, 52, 79, 149).

Cal assenyalar que el medi Ham F10 no és el més adequat per al creixement dels embrions de ratolí; no obstant, açò no és cap problema, ja que els controls de qualitat biològics no tenen

com a objectiu obtenir les millors condicions de cultiu, sinó estudiar quin percentatge és capaç d'arribar a l'estadi de blastocist.

Alguns autors (63, 65, 79, 86) observen que com més gran era el REN d'un determinat lot de medi, més gran era la taxa de gestació en el laboratori de FIV. No s'hi han detectat, però, coeficients de correlació significatius.

D'altra banda, la variació interassaig i intraassaig per al model de dues cèl·lules amb zona pel·lúcida està entre el 10 i 15 % respectivament (91, 149, 157), i existeix una variabilitat important entre els diferents lots de medi que s'incrementa quan s'afegeix qualsevol tipus de suplementació proteica al medi (52, 64, 149). Com que els REN obtinguts en els controls que utilitzen embrions d'una o dues cèl·lules (sense zona) són prou més baixos que els obtinguts amb embrions de dues cèl·lules (amb zona), i tenint en compte la variabilitat abans esmentada, poder quantificar l'embriotoxicitat de medis o materials amb aquests models és força més difícil.

En el cas del model d'una cèl·lula, els embrions s'han de recuperar en estadi de pronuclis (PN) 24 hores postinjecció d'hCG (55, 57, 109, 173, 214). Per poder observar aquests PN, cal utilitzar hialuronidasa, que disgrega les cèl·lules del cúmul i la corona i permet identificar-los en el moment de llur recuperació. Posteriorment, es cultiven durant 96 hores *in vitro* fins a l'estadi del blastocist en expansió (58, 63, 65, 166). Els desavantatges d'aquest model estan associats al fet d'haver d'aplicar tractaments enzimàtics als embrions que podrien afectar llur futura capacitat de divisió (55, 57). El temps de cultiu més perllongat també afecta adversament aquests embrions (109, 163) i, a més, en els embrions de ratolí, es pot produir un aturament del creixement en estadi de dues cèl·lules segons

la soca que s'utilitza (88, 132, 153). Per una altra banda, el model presenta una especial sensibilitat dels embrions en estadis previs a dues cèl·lules a les condicions de cultiu o a les fluctuacions de temperatura (1, 20, 32, 34, 51). Per tot això, el model d'una cèl·lula, tot i que pot ser més sensible, és difícil d'utilitzar a causa de l'existència de múltiples factors que poden determinar una interpretació errònia dels resultats.

El tercer model, també proposat per la seua major sensibilitat, és el de dues cèl·lules sense zona pel·lúcida (77, 109, 150, 243). L'obtenció d'aquests embrions es realitza per mitjà de la perfusió d'ampul·les 48 hores postinjecció d'hGC. Posteriorment, es tracten amb pronasa per eliminar la zona pel·lúcida (109). Com ja s'ha indicat, els tractaments enzimàtics en estadis primerencs del desenvolupament poden ser perillosos (donada la seua especial sensibilitat a qualsevol tipus de canvi), ja que podrien originar l'aturament de l'embrió, i aquest no seria degut a l'embriotoxicitat. Si, als controls, se'ls fa el mateix tractament aquest problema s'evita.

Quant a la suplementació proteica dels medis utilitzats en els controls, trobem en la literatura que pot ser realitzada mitjançant la utilització de sèrum de cordó fetal (11, 52, 69, 70, 71, 125, 157, 189), sèrum matern (11, 125, 128, 139, 183, 185, 203), albúmina sèrica humana (11, 122, 203, 204), seroalbúmina bovina (11, 59, 114, 127, 179, 190, 191, 242), sèrums sintètics (10, 15, 59, 215) i altres additius (28, 30, 67, 87, 131, 184, 236). El seu paper podria estar relacionat amb un efecte favorable sobre el procés de fecundació, i també sobre les primeres divisions embrionaries (47, 59, 122, 125, 139, 200, 221). L'efecte positiu d'aquesta suplementació sol atribuir-se a la presència d'elements com ara AMPc, catecolamines,

vitamines, factors de creixement, etc. (189, 203, 204, 239).

Tanmateix, els sèrums també poden tenir efectes adversos sobre el desenvolupament *in vitro* dels embrions (140, 163, 164). Així doncs, el paper precís del sèrum, i també les condicions de cultiu idònies per al desenvolupament dels embrions humans, no estan perfectament definides. Dels estudis realitzats cultivant embrions amb diferents medis i diferents suplementacions proteiques, les conclusions que se n'obtenen han estat molt diverses: uns autors recomanen utilitzar sèrum de cordó fetal (52, 11, 157, 189); uns altres seroalbúmina bovina (12, 127), sèrum matern (110, 139, 185, 189), albúmina sèrica humana (10, 11, 122, 172, 203, 204), sèrums sintètics (15, 56, 215) o bé no utilitzar cap suplementació (48, 72, 103, 130, 140, 149, 156, 177, 210).

El 1981 Ashwoohd-Smith i col·l. (10) van proposar la utilització d'albumina sèrica humana (HSA) a una concentració de 20 g/100 ml (que es va denominar albúmina 20). Els treballs realitzats amb aquest additiu aconsellaven la seua utilització en els laboratoris de FIV, s'indicaven que, a més d'afavorir el desenvolupament embrionari, seria una aportació proteica més senzilla i còmoda, i evitaria possibles contagis de SIDA, hepatitis i altres malalties víriques (10, 215).

Els controls de qualitat biològics han permès d'estudiar l'embriotoxicitat de cadascun d'aquests additius per tractar de millorar les condicions de cultiu *in vitro*. En concret, en el model de dues cèl·lules amb zona pel·lúcida s'ha constatat una disminució del REN dels medis suplementats amb sèrum de cordó fetal o sèrum matern. A més, s'ha vist una major tolerància a rangs baixos de pH quan els embrions de ratolí es cultiven en absència de suplementació proteica.

El mesurament de l'embriotoxicitat també permet de determinar els rangs de pH i osmolaritat (Osm) més adequats per al cultiu *in vitro*, tant dels embrions humans com d'altres espècies (36, 56, 109, 133, 149, 178).

Fins ara ens hem referit solament al control de qualitat sobre medis elaborats i les diferents suplementacions. Tanmateix, el control de qualitat permet de valorar les tècniques utilitzades per a l'esterilització de materials, control embriotòxic de les càpsules de cultiu, agulles de punció, cànules de transferència, guants quirúrgics..., és a dir, qualsevol material que puga utilitzar-se en un laboratori de FIV (4, 5, 52, 63, 79, 157, 167). També és possible d'estudiar l'embriotoxicitat de grans equips, com ara estufes de CO₂, sistemes d'aspiració fol·licular, congeladors d'embrions programables, caixes congeladores per a la conservació de medis i sèrums..., etc.

Finalment, assenyalarem que aquest tipus de control pot ser aplicat també a qualsevol compost químic addicionat al medi, com per exemple antioxidants (157, 167) i el seu possible paper en l'envelliment i la caducitat dels medis de cultiu, i també al control dels mètodes d'obtenció d'aigua ultrapura, la qual cosa permet de detectar la possible presència d'endotoxines (LPS) en el medi de cultiu (150, 187, 206, 208, 243).

La recopilació de totes les possibles aplicacions de l'estudi de l'embriotoxicitat confirma que és un control vàlid per a l'estudi dels medis, materials i equips, i també per a les possibles modificacions que es desitja introduir en un laboratori de FIV.

El mesurament de la toxicitat en els cultius cel·lulars (citotoxicitat) s'ha aplicat en nombroses ocasions com a control de qualitat de fàrmacs (112, 124, 155), medis i compostos químics (6, 7, 26, 27, 73, 74, 85, 90, 101, 169,

174, 186, 209, 217, 223). Dins d'aquest tipus d'estudis, hem de considerar també la valoració de la citotoxicitat sobre la motilitat dels espermatozoides en l'anomenat *test de supervivència espermàtica*, que també s'ha utilitzat com a control de qualitat dels programes de FIV (16, 189, 200, 201, 202, 211). En relació amb el mesurament de la citotoxicitat per controlar la qualitat dels medis i materials utilitzats en els programes de reproducció assistida, cal indicar que és encara un tema poc estudiat.

En 1989 es va descriure un nou model per realitzar els controls de qualitat biològica fonamentat en el mesurament de la citotoxicitat d'una estirp cel·lular concreta (hibridoma 1E6) (17, 89, 158, 160, 161) molt sensible a les condicions subòptimes del medi, i que permet un nou concepte del control de qualitat. Aquest bioassaig denominat *HybriTest* es basa en el cultiu de cèl·lules de l'hibridoma 1E6 amb un medi de cultiu definit. Els resultats obtinguts després de controlar agents tòxics coneguts demostren que es pot detectar la citotoxicitat dels medis amb un alt grau de sensibilitat. Experiències repetides han permès de demostrar que aquest test posseeix una variació interassaig i intraassaig menor del 8 i 5 % respectivament (17, 158, 160).

Com a conclusió final d'aquest treball, voldríem posar de manifest l'interès d'aprofundir en l'estudi de la citotoxicitat (*HybriTest*), ja que podria suposar un mètode més sensible, senzill i reproduïble per al control de qualitat de medis de cultiu, sistemes d'obtenció d'aigua ultrapura, composts químics i grans equips utilitzats en un programa de FIV. Considerem que una vegada demostrada la validesa d'aquest assaig, caldria comparar-la amb la del control de qualitat que estudia l'embriotoxicitat, valorant per a tots dos i comparativament: utilitat, sensibilitat, reproductibilitat i viabilitat.

BIBLIOGRAFIA

1. ABRAMEZUC, J., D. SOLTER i H. KOPROWSKI (1977). The beneficial effect of EDTA on development of mouse one-cell embryos in chemically defined medium. **Devel. Biol.** 61: 378-383.
2. ACKERMAN, S., R. J. SWANSON, P. J. ADAMS i J. W. E. WORTHAM (1983). *In vitro* fertilization and preimplantation embryo development in mice. **Infertility**, 6: 293-298.
3. ACKERMAN, S. B., R. J. SWANSON, P. J. ADAMS i J. W. E. WORTHAM (1983). Comparison of strains and culture media used for mouse *in vivo* fertilization. **Gamete Res.** 7: 103-108.
4. ACKERMAN, S. B., R. J. SWANSON, G. K. STOKES i L. L. WEECK (1984). Culture mouse preimplantation embryos as a quality control assay for human *in vitro* fertilization. **Gamete Res.** 9: 245-249.
5. ACKERMAN, S. B., G. L. STOKES, R. J. SWANSON, S. P. TAYLOR i L. FENWICK (1985). Toxicity testing for human *in vitro* fertilization programs. **J. Vitro Fert. Embryo Transfer**, 2: 132-137.
6. ANDERSEN, L. i D. ARENHOLT-BINDSLEY (1989). Morphometric registration of cytotoxic changes of epithelial cells *in vitro*: a methodological study. **Atla**, 17: 174-176.
7. ANDERSSON, M., A. FORBY i L. LEWAN (1989). Determination of ATP Leakage from cultured cells in toxicity testing: a two-step bioluminescent assay. **Atla**, 17: 188-190.
8. APPELMAN, Z. i C. G. WEBB (1984). Evaluation of pregnancy rates following transfer of *in vivo* and *in vitro* fertilized mouse embryos. **In Vitro Fert. Embryo Transfer**, 1: 98.
9. ARNY, M., L. NACHTINGALL i J. QUAGLIARELLO (1987). The effect of preimplantation and fetal development. **Fertil. Steril.** 48: 861-872.
10. ASHWOOD-SMITH, M. J., P. HOLLANDS i R. G. EDWARDS (1989). The use of Albuminar (TM) as a medium supplement in clinical IVF. **Hum. Reprod.** 4: 702-705.
11. BALL, G. D., C. B. COULAM, C. S. FIELD, R. W. HARMS, J. T. THIE i A. B. BYERS (1985). Effect of serum source on human fertilization and embryonic growth parameters *in vitro*. **Fertil. Steril.** 44: 75-80.
12. BALTZ, J. M., J. D. BIGGERS i C. LECHENE (1990). Apparent absence of Na⁺/H⁺ antiport activity in the two-cell mouse embryo. **Devl. Biol.** 138: 421-429.
13. BALTZ, J. M., J. D. BIGGERS i C. LECHENE (1991). Two-cell stage mouse embryos appear to lack mechanisms for alleviating intracellular acid loads. **J. Biol. Chem.** pp. 420-424.
14. BARNES, D. i G. SATO (1980). Methods for growth of cultured cell in serum-free medium. **Anal Biochem.** 102: 225-270.

15. BAVISTER, B. D. (1981). Substitution of a synthetic polymer for protein in a mamalian gamete culture system. **J. Exp. Zool.** 217: 45-51.
16. BAVISTER, B. D. i J. C. ANDREWS (1988). A rapid sperm motility bioassay procedure for quality control testing of water and culture media. **J. in Vitro Fert. Embryo. Transfer.** 5: 67-71.
17. BERTHEUSEEN, K., N. HOLST, F. FORSDHAL i K. E. HØIE (1989). A new cell culture assay for quality control in IVF. **Hum. Reprod.** 4: 531-535.
18. BIGGERS, J. D., L. M. RINALDINI i M. WEBB (1957). The study of growth factors in tissue culture. **Symp. Soc. Exp. Biol.** 11: 264-297.
19. BIGGERS, J. D., R. B. L. GWATKIN i R. L. BRINSTER (1962). Development of mouse embryos in organ cultures of Fallopian tubes on a chemically defined medium. **Nature.** 194: 747-749.
20. BIGGERS, J. D., B. D. MOORE i D. G. WHITTINGHAM (1965). Development of mouse embryos *in vivo* after cultivation from two-cell ova to blastocysts *in vitro*. **Nature.** 206: 734-735.
21. BIGGERS, J. D., D. G. WHITTINGHAM i R. P. DONAHUEL (1967). The pattern of energy metabolism in the mouse oocyte and zygote. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 58: 560-567.
22. BIGGERS, J. D., W. K. WHITTEN i D. G. WHITTINGHAM (1971). Methods of Mammalian Embriology; The culture of mouse embryos *in vitro*. Ed. J. C. Daniel. Freeman. San Francisco. pp. 7-21.
23. BIGGERS, J. D., W. K. WHITTEN i D. G. WHITTINGHAM (1971). Methods of Mammalian Embriology; The culture of mouse embryos *in vitro*. Ed. J. C. Daniel. Freeman. San Francisco. pp. 86-116.
24. BIGGERS, J. D. i S. STERN (1973). Metabolism of the preimplantation mammalian embryo. **Adv. Reprod. Physiol.** 6: 1-60.
25. BINKERD, P. E. i G. B. ANDERSON (1979). Transfer of cultured rabbit embryos. **Gamete Res.** 2: 65-73.
26. BONDESSON, I., B. EKWALL, S. HELLBERG, J. HÖGBERG, L. ROMERT, K. STENBERG i E. WALUM (1989). A new international multicenter project to evaluate the relevance to human toxicity of *in vitro* cytotoxicity tests. **Cellular and Biological Toxicology**, en premsa.
27. BORENFREUND, E., H. BABICH i N. MARTIN-ALGUACIL (1988). Comparisons of two *in vitro* cytotoxicity assays the neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests. **Toxicology In vitro.** 2: 1-16.
28. BONGSO, A., N. SOONCHYE, H. SATHANANTHAN, N. P. LIAN, N. RAUFF i S. RATMAN (1989). Improved quality of human embryos when co-cultured whit human ampullary cells. **Hum. Reprod.** 4: 706-801.
29. BORLAND, R. M., S. HAZRA, J. D. BIGGERS i C. P. LECHENE (1977). The elemental composition of environment of the gametes and preimplantation embryo during the initiation of pregnancy. **Biol. Reprod.** 16: 147-149.
30. BORLAND, R. M., J. D. BIGGERS, C. P. LECHENE i M. L. TAYLOR (1980). Elemental composition of fluid in the human fallopian tube. **J. Reprod. Fertil.** 58: 479-486.
31. BOTTENSTEIN, J. E. (1983). Growth and maturation factors; Defined media an studies of grown factors. Ed. G. Guroff, John Wilwy and Sons, New York. pp. 249.
32. BOWMAN, P. i A. McLAREN (1970). Cleavage rate of mouse embryos *in vivo* and *in vitro*. **J. Embryol. Exp. Morphol.** 24: 203-207.
33. BRAUDE, P. R. (1989) Control of protein synthesis during blastocyst formation in mouse. **Dev. Biol.** 68: 440-452.
34. BRINSTER, R. L. (1965) Studies on the development of mouse embryos *in vitro*. IV. Interactions of energy sources. **J. Reprod. Fert.** 10: 227-240.
35. BRINSTER, R. L. (1963). A method of *in vitro* cultivation of mouse ova from 2-cell to blastocyst. **Exp. Cell. Res.** 32: 205-208.
36. BRINSTER, R. L. (1965). Studies on development of mouse embryos *in vitro*. I. The effect of osmolarity and hydrogen i on concentration. **J. Exp. Zool.** 158: 49-58.
37. BRINSTER, R. L. (1965). Studies on development of mouse embryos *in vitro*. II. The effect of energy source. **J. Exp. Zool.** 158: 59-68.
38. BRINSTER, R. L. (1965). Studies on development of mouse embryos *in vitro*. III. The effect of nitrogen source. **J. Exp. Zool.** 158: 69-78.
39. BRINSTER, R. L. (1967). Protein content of the mouse embryo during the first five days of development. **J. Reprod. Fert.** 13: 413-420.
40. BRINSTER, R. L. (1971). Uptake and incorporation of amino acids by the preimplantation mouse embryo. **J. Reprod. Fert.** 27: 329-338.
41. BRONSON, R. A. i B. J. ROGERS (1988). Pitfalls of the zona-free hamster egg penetration test: protein source as a major variable. **Fertil. Steril.** 50: 851-854.
42. BURTON, R. F. (1975). Ringer Solutions and Physiological Salines. **Wright Scientechica**, Bristol. pp. 61.
43. BYATT-SMITH, J. G., H. J. LEESE i R. G. GOSDEN (1991). An investigation by mathematical modelling of whether mouse and human primplantation embryos in static culture can satisfy their demands for oxigen by diffusion. **Human Reprod.** 1: 53-57.
44. CARNEY, E. W. i R. H. FOOTE (1990). Effects of superovulation, embryo recovery, culture system and embryo transfer on development of rabbit embryos *in vivo* and *in vitro*. **J. Reprod. Fert.** 89: 543-551.
45. CARNEY, E. W., C. TOBBACK i R. H. FOOTE (1990). Co-culture of rabbit I-cell embryos with rabbit oviduct epithelial cells. **J. in Vivo Cell. Devl. Biol.** 26: 629-635.
46. CARNEY, E. W. i R. H. FOOTE (1991). Improved development of rabbit one-cell embryos to the hatching bastocist stage by culture in a defined, protein-free culture medium. **J. Reprod. Fert.** 91: 113-123.

47. CARO, C. M. i A. TROUNSON (1984). The effect of protein on preimplantation mouse embryo development *in vitro*. **J. in Vitro Fert. Embryo Transfer.** 1: 183-187.
48. CARO, C. M. i A. TROUNSON (1986). Successful fertilization, embryo development, and pregnancy in human *in vitro* fertilization (IVF) using a chemically defined culture medium containing no protein. **J. in Vitro Fert. Embryo Transfer.** 3: 215-217.
49. CARO, C. M., A. TROUNSON i G. KIRBY (1987). Effect of growth factors in culture medium on the rate of mouse embryo development and viability *in vitro*. **J. in Vitro Fert. Embryo Transfer.** 4: 265-268.
50. COLE, R. J. i J. PAUL (1965). Preimplantation stages of pregnancy; Properties of cultured preimplantation mouse and rabbit embryos, and cell strains derived from them. Eds. Wolsteholme EGW, M. O'Connor, Londres. p. 82-122.
51. COLVER, R. M., A. M. HOWE, P. G. McDONOUGH i J. BOLDT (1991). Influence of growth factors in defined culture medium on *in vitro* development of mouse embryos. **Fertil. Steril.** 55: 194-198.
52. CONDON-MAHONY, M., J. W. E. WORTHAM, J. C. BUNDREN, J. WITMYER i B. SHIRLEY (1985). Evaluation of human fetal cord serum Ham's F-10 medium, and *in vitro* culture materials with a mouse *in vivo* fertilization system. **Fertil. Steril.** 44: 521-526.
53. CROSS, P. C. i R. L. BRINSTER (1970). *In vitro* development of mouse oocytes. **Biol. Reprod.** 3: 298-307.
54. CROSS, P. C. (1973). The role of cumulus cells and serum in mouse oocyte maturation *in vitro*. **J. Reprod. Fert.** 34: 241-245.
55. CROSS, P. C. i R. L. BRINSTER (1973). The sensitivity of one-cell mouse embryos to pyruvate and lactate. **Exp. Cell. Res.** 77: 57-62.
56. CUMMINGS, J. M., T. M. BREEN, S. M. FULLER, K. L. HARRISON, I. M. WILSON, J. F. HENNESSEY, J. M. SHAW i G. SHAW (1986). Comparison of two media in a human *in vitro* fertilization program: lack of significant differences in pregnancy rate. **J. in Vitro Fert. Embryo Transfer.** 3: 326-329.
57. CHATOT, C. L., C. A. ZIOMEK, B. O. BAVISTER, J. L. LEWIS i I. TORRES (1989). An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos *in vitro*. **J. Reprod. Fert.** 86: 679-688.
58. CHATOT, C. L., J. L. LEWIS, I. TORRES i C. A. ZIOMEK (1990). Development of 1-cell embryos from different strain of mice in CZB medium. **Biol. Reprod.** 42: 432-440.
59. CHOI, T. S., M. MORI, K. KOHMOTO i Y. SHODA (1987). Beneficial effect of serum on the fertilizability of mouse oocytes matured *in vitro*. **J. Reprod. Fert.** 79: 565-568.
60. CHOLEWA, J. A. i W. K. WHITTEN (1965). Development of 2-cell mouse embryos *in vitro* III. The effect of fixed nitrogen source. **J. Exp. Zool.** 158: 69-78.
61. CHOLEWA, J. A. i W. K. WHITTEN (1967). Development of two-celled mouse embryos without a fixed nitrogen source. **J. Reprod. Fert.** 13: 413-419.
62. CHOLEWA, J. A. i W. K. WHITTEN (1970). Development of 2-cell mouse embryos in absence of a fixed nitrogen source. **J. Reprod. Fert.** 22: 553-555.
63. DANDEKAR, P. V. i M. M. QUIGLEY (1984). Laboratory setup for human *in vitro* fertilization. **Fertil. Steril.** 42: 1-11.
64. DANDEKAR, P. V. i R. H. GLASS (1987). Development of mouse embryos *in vitro* is affected by strain and culture medium. **Gamete Res.** 17: 279-285.
65. DAVIDSON, A., M. VERMESH, R. A. LOBO i R. J. PAULSON (1988). Mouse embryo culture test as quality control for human *in vitro* fertilization: The one-cell versus the two-cell model. **Fertil. Steril.** 49: 516-521.
66. DE FELICI, M. i G. SIRACUSA (1982). "Spontaneous" hardening of the zone pellucida of mouse oocytes during *in vitro* culture. **Gamete Res.** 6: 107-113.
67. DE FELICI, M., A. SALUSTRI i G. SIRACUSA (1985). "Spontaneous" hardening of the zone pellucida of mouse oocytes during *in vitro* culture. II. The effect of follicular fluid and glycosaminoglycans. **Gamete Res.** 12: 227-235.
68. EBERT, K. M. i R. L. BRINTER (1983). Rabbit α -globin messenger RNA translation by the mouse ovum. **J. Embriol. Exp. Morph.** 74: 159-168.
69. EDWARDS, R. G. (1980). Conception in the Human Female. **Fertilization**. Academic Press, Londres. pp. 573-667.
70. EDWARDS, R. G., P. C. STEPTOE i J. M. PURDY (1980). Establishing full term human pregnancies using cleaving embryos grown *in vitro*. **Br. J. Obstet. Gynecol.** 87: 737-756.
71. EDWARDS, R. G., J. M. PURDY, P. C. STEPTOE i D. E. WALTERS (1981). The growth of human preimplantation embryos *in vitro*. **Am. J. Obstet. Gynecol.** 141: 408-412.
72. EDWARDS, R. G., S. B. FISHEL, J. COHEN, C. B. FEHILLY, J. M. PURDY, J. SLATER, P. C. STEPTOE i J. M. WEBSTER (1984). Factors influencing the success of *in vitro* fertilization and embryo transfer. **J. in Vitro Fert. Embryo Transfer.** 1: 3-9.
73. EK WALL, B. i A. JOHANSSON (1980). Preliminary Studies on validity of *in vitro* measurement of drug toxicity using Hela cells. I. Comparative *in vitro* cytotoxicity of 27 drugs. **Toxicology Letters.** 5: 299-307.
74. EK WALL, B., I. BONDESSON, J. V. CASTELL, M. J. GÓMEZ-LECHÓN i col. (1989). Cytotoxicity evaluation of the first ten MEIC chemicals: acute lethal toxicity in man predicted by cytotoxicity in five cellular assays and by oral LD50 tests in rodents. **Atla.** 17: 83-100.
75. EPPIG, J. J., P. F. WARD-BAILEY i O. L. COLEMAN (1985). Hypoxanthine and adenosine in murine ovarian follicular fluid: Concentrations and activity in maintaining oocyte meiotic arrest. **Biol. Reprod.** 33: 1041-1049.

76. EPSTEIN, C. J. i S. A. SMITH (1973). Aminoacid uptake and protein synthesis in primplantation mouse embryos. **Devel. Biol.** 33: 171-178.
77. FISHEL, S., P. JACKSON, J. WEBSTER i B. FARATIAN (1988). Endotoxins in culture medium of human *in vitro* fertilization. **Fertil. Steril.** 49: 108-113.
78. FISSORE, R. A., K. V. JACKSON i A. A. KIESSLING (1990). Mouse zygote development in culture medium without protein in the presence of ethylene-diaminetetraacetic acid. **Biol. Reprod.** 41: 835-841.
79. FLEMING, T. P., H. P. M. PRATT i P. R. BRAUDE (1987). The use of mouse preimplantation embryos for quality control of culture reagents in human *in vitro* fertilization programs: a cautionary note. **Fertil. Steril.** 47: 858-861.
80. FLYNN, T. J. i N. HILLMAN (1980). The metabolism of exogenous fatty acids by preimplantation mouse embryos developing *in vivo*. **J. Embryol. Exp. Morphol.** 56: 157-162.
81. FRAZER, L. R. (1977). Fertilization and preimplantation development *in vitro* mouse eggs obtained following stimulation with different doses of pregnant mare serum: a comparison of the responses in two strains. **Differentiation**. 9: 29-33.
82. GARDNER, H. i P. L. KAYE (1986). The effect of insulin treatment during primplantation culture on fetal development in the mouse. **Proc. Aust. Soc. Reprod. Biol.** 18: (Abstr.) p. 3.
83. GARDNER, O. K., R. N. CLARKE, C. P. LECHENE i J. D. BIGGERS (1989). Development of a noninvasive ultramicrofluorometric method for measuring net uptake of glutamine by single preimplantation mouse embryos. **Gamete Res.** 24: 427-438.
84. GARDNER, O. K. i H. J. LEESE (1990). Concentrations of nutrients in mouse oviduct fluid and their effects on embryo development and metabolism *in vitro*. **J. Reprod. Fert.** 88: 361-368.
85. GARZA-OCAÑAS, L., O. TORRES-ALANÍS i A. PIÑERO-LÓPEZ (1989). Evaluation of the cytotoxicity of 18 compounds in six rat cell lines. **Atla.** 17: 246-249.
86. GERRITY, M. (1988). *In vitro* fertilization and embryo transfer: a manual of basic techniques; Mouse embryo culture bioassay. Ed. Wolf D.P., B. D. Bavister, M. Gerrity, G. Kopf, Plenum press. Nova York. p. 57.
87. GIANAROLI, L., R. SCRACCHIOLI, A. P. FERRARETI, A. TROUNSON, G. FLAMIGNI i L. BOVICELLI (1986). The successful use of human amniotic fluid for embryo culture and human *in vitro* fertilization, embryo culture and transfer. **Fertil. Steril.** 46: 907-913.
88. GODDARD, M. J. i H. P. M. PRATT (1983). Control of events during early cleavage of the mouse embryo: an analysis of the "2-cell block". **J. Embryol. Exp. Morphol.** 73: 111-133.
89. GOLDSBY, R. (1989) Nucleic Acid and Monoclonal Antibody Probes. A practical guide to making hybridomas. Eds. Swaminathan G. Prakash. Marcel Dekker, Nova York. pp. 367-382.
90. GÓMEZ-LECHÓN, M. J., A. MONTOYA, P. LÓPEZ, I. DONATO, A. LARRAURI i J. V. CASTELL (1988). The potential use of cultured hepatocytes in predicting the hepatotoxicity of xenobiotics. **Xenobiotica**. 18: 725-735.
91. GORRILL, M. J., J. S. RINEHART, A. C. TAMBHANE i M. GERRITY (1991). Comparison of the hamster sperm motility assay to the mouse one-cell and two-cell embryo bioassays as quality control tests for *in vitro* fertilization. **Fertil. Steril.** 55: 345-350.
92. GREENWALD, G. S. (1962). The role of the mucin layer in development of the rabbit blastocyst. **Anat. Rec.** 142: 407-415.
93. GREGOIRE, A. T., D. GONGSAKDI i A. E. RAKOFF (1962). The presence of inositol on reproductive tract secretion of the female rabbit. **Fertil. Steril.** 13: 432-435.
94. GWATKIN, R. B. L. i A. A. HAIDRI (1974). Oxygen requirements for the maturation of hamster oocytes. **J. Reprod. Fertil.** 37: 127-131.
95. HAIDRI, A. A., I. M. MILLER i R. B. L. GWATKIN (1971). Culture of mouse oocytes *in vitro* using a system without oil or protein. **J. Reprod. Fertil.** 26: 409-412.
96. HAM, R. G. i W. L. McKEENAN (1979). Media and growth requirements. **Methods Enzymol.** 58: 44-50.
97. HAM, R. G. (1981). The growth requirements of vertebrate cells *in vitro*; Introduction: cell growth requirements-the challenge we face. Eds. Haymouth C, RG Ham, PJ. Chapple. Cambridge University Press. Cambridge. pp. 1-15.
98. HARLOW, G. W. i P. QUINN (1979). Fetal and placental growth in the mouse after preimplantation development *in vitro* under oxygen concentrations. **Aust. J. Biol. Sci.** 32: 363-368.
99. HARLOW, G. W. i P. QUINN (1982). Development of preimplantation embryos *in vivo* and *in vitro*. **Aust. J. Biol. Sci.** 35: 187-193.
100. HARVEY, M. B. i P. L. KAYE (1988). Insulin stimulates protein synthesis in compacted mouse embryos. **Endocrinology**. 122: 1182-1184.
101. HELBERG, S., I. BONDESSON, B. EKWALL, M. J. GÓMEZ-LECHÓN, R. JOVER, J. HÖGBERG, X. PONSODA, L. ROMERT, K. STENBERG i E. WALUM (1989). Multivariate validation of cell toxicity data: the first ten MEIC Chemicals. **Atla.** 17: 237-239.
102. HOGAN, B., F. CONSTANTINI i E. LACY (1986) Manipulation the mouse embryo: *In vitro* culture of eggs, embryos, and teratocarcinoma cells. Cold Spring Harbor Laboratory. Nova York. p. 255.
103. HOLST, N., K. BERTHEUSSEN, F. FORSDAHL, M. G. HAKONSEN, L. J. HANSEN i H. I. NIELSEN (1990). Optimization and simplification of culture conditions in human *in vitro* fertilization (IVF) and preembryo replacement by serum-free media. **J. in Vitro Fertil. Embryo. Trans.** 7: 47-52.
104. HOPPE, P. C. i S. PITTS (1973). Fertilization *in vitro* and development of mouse ova. **Biol. Reprod.** 8: 420-425.

105. HSU, Y. C. (1979). *In vitro* development of individually cultured whole mouse embryos from blastocyst to early somite stage. **Dev. Biol.** 68: 453-461.
106. HSU, Y. C. (1980) Embryo growth and differentiation factors in embryonic sera of mammals. **Dev. Biol.** 76: 465-474.
107. JACKSON, K. V. i A. A. KIESSLING (1989). Fertilization and cleavage of mouse oocytes exposed to the conditions of human oocyte retrieval for *in vitro* fertilization. **Fertil. Steril.** 51: 675-681.
108. JINNO, M., E. LIDA i R. LIZUKA (1987). A detrimental effect of platelets on mouse embryo development. **J. Vitro. Fert. Embryo. Transfer.** 4: 324-330.
109. JOHN, D. P. i A. A. KIESSLING (1988). Improved pronuclear mouse embryo development over an extended pH range in Ham's F-10 medium without protein. **Fertil. Steril.** 49: 150-155.
110. JOHNSTON, I., A. LOPATA, A. SPEIRS, I. HOULT, G. KELLOW i Y. PLESSIS (1981). *In vitro* fertilization: the challenge of the eighties. **Fertil. Steril.** 36: 699-703.
111. JONES, H. W., C. G. JONES, M. C. ANDREWS, A. ACOSTA, C. BUNDREN, J. GARCÍA, B. SANDOW, L. VEECK, C. WILKES, J. WITMYER, J. E. WORTHAM i G. WRIGHT (1982). The program for *in vitro* fertilization at Norfolk. **Fertil. Steril.** 38: 14-20.
112. JOVER, R., X. PONSODA, J. V. CATELL i M. J. GÓMEZ-LECHÓN (1989). Hepatotoxicity of opiates and cocaine on different hepatic cellular systems. **Atla.** 17: 240-245.
113. KANE, M. T. i R. H. FOOTE (1970). Culture of two- and four-cell rabbit embryos to the expanding blastocyst stage in synthetic media. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** 133: 921-925.
114. KANE, M. T. i D. R. HEADON (1980). The role of commercial bovine serum albumin preparations in the culture of one-cell rabbit embryos to blastocysts. **J. Reprod. Fert.** 60: 469-475.
115. KANE, M. T. (1983). Variability in different lots of commercial bovine serum albumin effects cell multiplication and hatching of rabbit blastocysts in culture. **J. Reprod. Fert.** 69: 555-558.
116. KANE, M. T. (1987). Minimal nutrient requirements for culture of one-cell rabbit embryos. **Biol. Reprod.** 37: 775-778.
117. KANE, M. T. (1987) Mammalian preimplantation embryo. *In vitro* growth of preimplantation rabbit embryos. Ed. Bavister BD. Nova York, Londres, Plenum Press. pp. 193-217.
118. KANE, M. T., B. D. BAVISTER i M. FAHY (1988). Water soluble vitamins stimulate *in vitro* development of rabbit and hamster blastocysts. Proc. 11th Cong. Anim. Reprod. & AI. p. 473.
119. KANE, M. T. (1989). Effects of the putative phospholipid precursors, inositol, choline, serine and ethanolamine on formation and expansion of rabbit blastocysts *in vitro*. **J. Reprod. Fert.** 87: 275-279.
120. KASAI, K., Y. MINATO i Y. TOYODA (1978). Fertilization and development *in vitro* of mouse eggs from inbred strains and F1 hybrids. **Jpn. J. Anim. Reprod.** 24: 19-23.
121. KAUFMAN, M. H. i K. SACHS (1976). Complete preimplantation development in culture of parthenogenetic mouse embryos. **J. Embryol. Exp. Morph.** 35: 179-182.
122. KEMETER, P. i W. FEICHTINGER (1984). Pregnancy following *in vitro* fertilization and embryo transfer using pure human serum as culture and transfer medium. **Fertil. Steril.** 41: 936-940.
123. KHURANA, N. K. i R. G. WALES (1987). Effects of coculture with uterine epithelial cells on the metabolism of glucose by mouse morulae and early blastocysts. **Aust. J. Biol. Sci.** 40: 389-395.
124. KLOSS, M. W., G. M. ROSEN i E. J. RAUCKMAN (1984). Cocaine-mediated hepatotoxicity: a critical review. **Biochemical Pharmacology.** 33: 169-173.
125. KRUGER, T. F., F. S. H. STANDER, K. SMITH, J. P. VAN DER MERWE i C. J. LOMBARD (1987). The effect of serum supplementation on the cleavage of human embryos. **J. In Vitro Fert. Embryo. Transfer.** 4: 10-16.
126. LAWITTS, J. A. i J. D. BIGGERS (1991). Optimization of mouse embryo culture media using simplex methods. **J. Reprod. Fert.** 91: 543-556.
127. LEAL, C., L. LEVESQUE, M. KEARMAN, H. MOVER i M. SEBEL (1989). The value of serum albumin as an alternative in IVF. VI World Congress on *In Vitro* Fertilization and Alternate Assisted Reproduction, Israel. 2-7: p.42.
128. LEUNG, P., M. GRONOW, G. KELLOW, A. LOPATA, A. SPEIRS, J. McBAIN, Y. du PRESSIS i J. JOHNSTON (1984). Serum supplement in human *in vitro* fertilization and embryo development. **Fertil. Steril.** 1: 36-39.
129. LEVINSON, J., P. GODDFELLOW, M. VADEBONCOEUR, H. M. C. DEVITT (1978). Identification of stage-specific polipeptide synthesis during marine preimplantation development. **Prod. Nat. Acad. Sci.** 75: 3332-3336.
130. LOPATA, A. (1982). Human conception *in vitro*. Factors influencing the growth of human preimplantation embryos *in vitro*. Ed. Edwards RG, JM Purdy, Academic Press, Londres. pp. 211.
131. LOPATA, A. i D. L. HAY (1989). The surplus human embryo; its potential for growth blastulation, hatching, and human chorionic gonadotropin production in culture. **Fertil. Steril.** 51: 984-991.
132. LOUTRADIS, D., D. JOHN i A. A. KIESSLING (1987). Hypoxanthine causes a 2-cell block in random-bred mouse embryos. **Biol. Reprod.** 37: 311-316.
133. MAHADERVAN, M. M., J. FLEETHAM, R. B. CHURCH i P. J. TAYLOR (1986). Growth of mouse embryos in bicarbonate media buffered by carbon dioxide, hepes or phosphate. **J. in Vitro. Fert. Emb. Transfer.** 3: 304-308.

- 134.MASIP, A., P. VAN DER ZWALMEN, F. PUISSANT, M. CAMUS i F. LEROY (1984). Effects of *in vitro* fertilization, culture, freezing and transfer on the ability of mouse embryos to implant and survive. **J. Reprod. Fertil.** 71: 199-203.
- 135.MATTSON, B. M., I. Y. ROSENBLUM, R. M. SMITH i S. HEYNER (1988). Autoradiographic evidence for insulin and insulin-like growth factor binding to early mouse embryos. **Diabetes**. 37: 585-590.
- 136.McKEEHAN, W. L., K. A. McKEEHAN i R. G. HAM (1981). The growth requirements of vertebrate cell *in vitro*; the relationship between defined low-molecular weight substances and undefined serum-derived factors. Eds. Naymouth C, RG Ham, PJ Chapple, Cambridge University Press. Cambridge. pp. 223-243.
- 137.McLAREN, A. i J. D. BIGGERS (1958). Successful development and birth of mice cultivated *in vitro* as early embryos. **Nature**. 182: 877-882.
- 138.McLAREN, A i D. MICHIE (1956). Studies on the transfer of fertilized mouse eggs to uterine foster-mothers. I. Factors affecting the implantation and survival of native and transferred eggs. **J. Exp. Biol.** 33: 394-399.
- 139.MENEZO, Y. (1984). *In vitro* fertilization and Embryo transfer; Culture media and embryo metabolism: the influence of serum addition. Eds. Feichtinger, W. Kemeter, P. Palermo, Cofese. p. 159.
- 140.MENEZO, Y, J. TESTART i D. PERRONE (1984). Serum is not necessary in human *in vitro* fertilization, early embryo culture, and transfer. **Fertil. Steril.** 43: 750-755.
- 141.MENEZO, Y., J. HAMIDI, C. KHATCHADOURIAN i C. NARDION (1989). The murine prepubertal oviduct support early embryo development *in vitro*. **Dev. Growth Differ.** 31: 551-555.
- 142.MEGENHAGEN, S. E., H. A. BLADEN i K. C. HSU (1966). Electron microscopic localization of endotoxin lipopolysaccharide in gram-negative organisms. **Ann. NY Acad. Sci.** 133: 279-282.
- 143.MEGENHAGEN, S. E., R. SNYDERMAN, H. GEWURZ i H. S. SHIN (1969). Significance of complement to the mechanism of action of endotoxin. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.** 50: 37-40.
- 144.MILLS, R. M., i R. L. BRINSTER (1967). Oxygen consumption of preimplantation mouse embryos. **Exp. Cell. Res.** 47: 337-344.
- 145.MINATO, Y i Y. TOYODA (1980). Inmature tubal ova in PMSG treated or PMSG-HCG treated prepubertal mice and fertilization of these ova by epididymal spermatozoa *in vitro*. **Jpn. J. Anim. Reprod.** 26: 81-88.
- 146.MINATO, Y i Y. TOYODA (1982). Fertilizing ability of mouse oocytes matured *in vitro*. **Jpn. J. Anim. Reprod.** 28: 134-140.
- 147.MIYAMOTO, H., Y. TOYODA i M. C. CHANG (1974). Effect of hydrogenion concentration on *in vitro* fertilization of mouse Golden hamster and rat eggs. **Biol. Reprod.** 10: 487-492.
- 148.MOLINA, I., L. DIEGUEZ, C. BLANCO, A. ROMEU, A. EDO i A. PÉREZ (1988). Manipulació *in vitro* d'embrions de ratolí. Controls biològics. 13è. Congrés de Metges i Biòlegs de llengua catalana. Andorra. Llibre de ponències. pp. 155-165.
- 149.MOLINA, I., C. BLANCO, L. DIEGUEZ, A. ROMEU, C. ÁLVAREZ i P. J. FERNÁNDEZ (1992). Efectos de la suplementación proteica y condiciones físico-químicas del medio de cultivo sobre el desarrollo *in vitro* de embriones de ratón de dos células. **RIF**. 9: 11-17.
- 150.MONTORO, L., E. SOBIAS, P. YOUNG, M. BACCARO, J. SWANSON i C. SUELDO (1990). Detection of endotoxin in human *in vitro* fertilization by the zone-free mouse embryo assay. **Fertil. Steril.** 54: 109-112.
- 151.MORCOS, R. N., W. E. GIBBONS i W. E. FINDLEY (1985). Effect of peritoneal fluid on *in vitro* cleavage of 2-cell mouse embryos: possible role in infertility associated with endometriosis. **Fertil. Steril.** 44: 678-681.
- 152.MUGGLETON-HARRIS, A., D. G. WHITTINGHAM i I. WILSON (1982). Cytoplasmic control of preimplantation development *in vitro* in the mouse. **Nature**. Londres. 229: 460-462.
- 153.MUGGLETON-HARRIS, A. i J. G. BROWN (1988). Cytoplasmic factors influence mitochondrial reorganization and resumption of cleavage during culture of early mouse embryos. **Human Reprod.** 3: 1020-1028.
- 154.MUKHERJEE, A. B. (1972). Norman progeny from fertilization *in vitro* of mouse oocytes matures in culture and spermatozoa capacitated *in vitro*. **Nature**. Londres. 237: 397-398.
- 155.NAGAMATSU, K., Y. OHNO, H. IKEBUCHI, A. TAKAHASHI, I. TERAU i A. TAKANAKA (1986). Morphine metabolism in isolated rat hepatocytes and its implication for hepatotoxicity. **Biochemical Pharmacology**. 35: 3543-3548.
- 156.NAYUDU, P. L., A. LOPATA, P. C. S. LEUNG i W. I. H. JOHNSTON (1983). Current problems in human *in vitro* fertilization and embryo implantation. **J. Exp. Zool.** 228: 203-208.
- 157.NAZ, R. K., J. T. JANOUSEK, I. MOODY i R. J. STILLMAN (1986). Factors influencing murine embryo bioassay: effects of proteins, aging of medium, and surgical glove coatings. **Fertil. Steril.** 46: 914-920.
- 158.NIELSEN, H. I. i K. BERTHEUSSEN (1988). The Medi-Cult HybriTest. A novel toxicity test using Medi-Cult RPMI-SR3 protein-free medium and a selected hybridoma cell line. **Cytotechnology**. Suppl. 68.
- 159.NIELSEN, H. I., A. L. POULSEN i K. BERTHEUSSEN (1989). Degradation of cell culture media by light. Fifth Annual ESHRE Meeting, Malmö, Suècia.
- 160.NIELSEN, H. I. i K. BERTHEUSSEN (1989). Medi-Cult HybriTest for *In vitro* Toxicology and Quality Control. **Atla**. 17: 199-202.
- 161.NIELSEN, H. I., A. L. POULSEN i K. BERTHEUSSEN (1989). Degradation of cell culture media by light. **Cytotechnology**. Suppl. 79.
- 162.NEW DAT, P. T. COPPOLA i O. L. COCKROFT (1976). Improved development of head-fold rat embryos in culture resulting from low oxygen and modifications of the culture serum. **Reprod. Fertil.** 48: 219-224.

163. OGAWA, T., R. P. MARRS (1987). The effect of protein supplementation on single-cell mouse embryos *in vitro*. **Fertil. Steril.** 47: 156-161.
164. OGAWA, T., T. ONO i R. P. MARRS (1987). The effect of serum fractions on single cell mouse embryos *in vitro*. **J. in Vitro Fert. Embryo Transfer.** 4: 153-159.
165. OKSENBURG, J. R. i C. BRAUTHAR (1986). *In vitro* suppression of murine blastocysts growth by sera from nomen with reproductive disorders. **AIRI.** 11: 118-122.
166. OUHIBI, N., J. HAMIDI, J. GUILLAUD i Y. MENEZO (1990). Co-culture of 1-cell mouse embryos on different cell supports. **Human Reprod.** 5: 737-743.
167. PABON, J. E., W. E. FINDLEY i W. E. GIBBONS (1989). The toxic effect of short exposures to the atmospheric oxygen concentration on early mouse embryonic development. **Fertil. Steril.** 51: 896-900.
168. PADILLA, S. L., A. M. HOWE i J. P. BOLDT (1988). Effects of charcoal extracted serum as a growth medium supplement on *in vitro* development of mouse embryos. **J. in Vitro Fert. Embryo Transfer.** 5: 286-290.
169. PAGANUZZI-STAMMATI, A., V. SILANO i F. ZUCCO (1981). Toxicology investigations with cell culture systems. **Toxicology.** 20: 91-153.
170. PARINAUD, J., J. M. REME, X. MONROZIES, S. FAVRIN, M. F. SARRAMON i G. PONTONNIER. Mouse system quality control is necessary before the use of new material for *in vitro* fertilization and embryo transfer. **J. in Vitro Fert. Embryo Transfer.** 4: 56-61.
171. PAPAIONNOU, V. E. i K. M. EBERT (1986). Development of fertilized embryos transferred to oviducts of immature mice. **J. Reprod. Fertil.** 76: 603-609.
172. PETERS, T. (1975). The Plasma Proteins; Serum albumin. Ed. Putman CF., Academic Press, Nova York. pp. 133-181.
173. POMP, D., E. S. CITSER i J. J. RUTLEDGE (1988). Lower sodium lactate in Whitten's medium improves *in vitro* development capacity of one-cell mouse embryos. **Theriogenology.** 29: 1019-1025.
174. PONSODA, X., R. JOVER, J. V. CASTELL i M. J. GÓMEZ-LECHÓN (1989). *In vitro* toxicity to two cellular systems of the first ten chemicals on the MEIC List. **Atla.** 17: 218-224.
175. POUHEYMIROU, W. T., J. C. CONOVER, i R. M. SCHULTZ (1989). Regulation of mouse preimplantation development: differential effect of CZB medium and Whitten's medium on rates and patterns of proteins synthesis in 2-cell embryos. **Biol. Reprod.** 41: 317-322.
176. PRIESTLEY, J. B. i O. L. BLACK (1988). Co-culture of pre-implantation mouse embryos with oviduct epithelial cells. **Biol. Reprod.** 38: 12. (Supl. 1).
177. PURDY, J. M. (1982). Human Conception *in vitro*. Methods for fertilization and embryo culture *in vitro*. Eds. Edwards RG, JM Purdy, Academic Press. Londres. pp. 135-148.
178. QUINN, P. i R. G. WALES (1973). Growth and metabolism of preimplantation mouse embryos cultured in phosphate-buffered medium. **J. Reprod. Fert.** 35: 289-300.
179. QUINN, P. i J. D. STANGER (1980). Effect of purification of BSA on the interaction of human serum with mouse ova *in vitro*. **Biol. Reprod.** 22: 134-140.
180. QUINN, P., i D. G. WHITTINGHAM (1982). Effect of fatty acids on fertilization and development of mouse embryos *in vitro*. **J. Androl.** 3: 640-645.
181. QUINN, P. (1982). Embryo transfer in cattle, sheep and goats; Fertilization and culture of embryos: factors which have a major influence on embryo survival *in vitro*. Eds. Shelton JN, AO Trounson, NW Moore, JW James. Society for Reproductive Biology, Sidney, Australia. p.47.
182. QUINN, P., C. BARROS i D. G. WHITTINGHAM (1984). Preservation of hamster oocytes to assay the fertilizing capacity of human spermatozoa. **J. Reprod. Fert.** 66: 161-168.
183. QUINN, P., G. M. WARNES, J. F. KERIN i C. KIRBY (1984). Culture factors in relation to the success of human *in vitro* fertilization and embryo transfer. **Fertil. Steril.** 41: 202-207.
184. QUINN, P. J. F. KERIN i G. M. WARNES (1985). Improved pregnancy rates in human *in vitro* fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. **Fertil. Steril.** 44: 493-499.
185. QUINN, P., G. M. WARNES, J. F. KERIN i C. KIRBY (1985). Culture factors affecting the success rate of *in vitro* fertilization and embryo transfer. **Ann. NY Acad. Sci.** 442: 195-203.
186. RIDDELL R. J., D. S. PANACER, S. M. WILDE, R. H. CLOTHIER i M. BALLS (1989). The importance of exposure period and cell type in *in vitro* cytotoxicity tests. **Atla.** 14: 86-92.
187. RINEHART, J. S., B. D. BAVISTER i M. GERRITY (1988). Quality control in the *in vitro* fertilization laboratory: comparison of bioassay. **J. in Vitro Fert. Embryo Transfer.** 5: 335-339.
188. ROBLERO, L. S. i M. D. RIFFO (1986). High potassium concentration improves preimplantation development of mouse embryos *in vitro*. **Fertil. Steril.** 45: 412-418.
189. SAITO, H., R. P. MARRS, T. BERGER, J. BROWN i D. R. MISHELL (1983). Enhancement of *in vitro* embryo development by specific serum supplements. **Fertil. Steril.** 39: 423-428.
190. SAITO, H., T. BERGER, J. BROWN, D. R. MISHELL i R. P. MARRS (1984). Effect of variable concentration of serum on mouse embryo development. **Fertil. Steril.** 39: 460-465.
191. SAITO, H., T. BERGER, J. BROWN, D. R. MISHELL i R. P. MARRS (1984). The effect of serum fractions on embryo growth. **Fertil. Steril.** 41: 761-766.
192. SAKKAS, K., A. TROUNSON i I. KOLA (1989). *In-vivo* cleavage rates and viability obtained for early cleavage mouse embryos in co-culture with oviduct cells. **Reprod. Fertil. Dev.** 1: 127-136.
193. SCHMELL, E. D. i B. J. GULYAS (1980). Ovoperoxidase activity in ionophore treated mouse eggs. II. Evidence for

- the enzyme's role in hardening the zona pellucida. **Gamete Res.** 3: 279-290.
194. SHINI, S. A. i B. D. BAVISTER (1988). Two-cell block to development of cultured hamster embryos is caused by phosphate and glucose. **Biol. Reprod.** 39: 1183-1192.
 195. SCHROEDER, A. C. i J. J. EPPIG (1984). The developmental capacity of mouse oocytes that matured spontaneously *in vitro* is normal. **Devl. Biol.** 102: 493-497.
 196. SCHUMACHER, A. i B. FISCHER (1988). Influence of visible light and room temperature on cell proliferation in preimplantation rabbit embryos. **J. Reprod. Fert.** 84: 197-204.
 197. SCHULZ, R. M., G. E. LETOURNEAU i M. M. WASSARMAN (1979). Program of early development in the mammal. Changes in patterns and absolute rates of tubulin and total protein synthesis during oogenesis and early embryogenesis in the mouse. **Dev. Biol.** 68: 341-359.
 198. SCHULZ, G. A., P. L. KAYE, D. J. McKAY i M. H. JOHNSON (1981). Endogenous amino acid pool sizes in mouse eggs and preimplantation embryos. **J. Reprod. Fert.** 61: 387-393.
 199. SEIBERT, H. i M. KOLOSSA (1987). Alternatives to Animal Experiments in Risk Assessment: Quantitative structure-toxicity relationships of substituted phenols determined *in vitro* with a sperm motility assay. Ed. Scherag AG. Berlin. p. 135.
 200. SEIBERT, H. (1988). Messung der Benegungsaktivität der Spermatozoen von Mensch und Rind mit Hilfe von Videomikrographie und Computerbildanalyse. **Fertilität.** 4: 215-218.
 201. SEIBERT, H., M. KOLOSSA i O. WASSERMANN (1989). Bovine spermatozoa as an *in vitro* model for studies on the cytotoxicity of chemicals: effects of chlorophenols. **Cell. Biology and Toxicology.** 5: 315-330.
 202. SEIBERT, H. i U. GOSCH (1989). A short-term bovine sperm cell assay for evaluation of the *in vitro* cytotoxicity of chemicals. **Atla.** 17: 228-233.
 203. SHAW, J., K. HARRISON, L. WILSON, T. BREEN, G. SHAW, J. CUMMINGS i J. HEMMESSEY (1987). Results using medium supplemented with either fresh or frozen semen in human *in vitro* fertilization. **J. in Vitro Fertil. Embryo Transfer.** 3: 215-217.
 204. SHIRLEY, B., J. W. E. WITMYER, M. CONDON-MAHONEY i G. FORT (1985). Effects of human serum and plasma on development of mouse embryos in culture medium. **Fertil. Steril.** 43: 129-134.
 205. SHIRE, J. G. M. i W. K. WHITTEN (1980). Genetic variation in the timing of first cleavage in mice: effect of paternal genotype. **Biol. Reprod.** 23: 363-368.
 206. SILVER, I. A. (1981). Progress in clinical and biological research. Some effects of *Escherichia coli* endotoxin on cells in culture. Eds. Majde JA, RJ Person, Liss AR. Nova York. p. 86.
 207. SILVERMAN, I. H., C. L. COOK, J. S. SANFILIPPO, M. A. TUSSMAN, G. S. SCHULTZ i F. H. HILTON (1987). Ham's F-10 constituted with tap water supports mouse conceptus development *in vitro*. **J. in Vitro Fertil. Embryo Transfer.** 4: 185-190.
 208. SNYMAN, E. i J. V. VAN DER MERWE (1986). Endotoxin-polluted medium in human *in vitro* fertilization program. **Fertil. Steril.** 46: 273-276.
 209. STADTLANDER, K. i H. LAWOHNUS (1989). Yeast cells as a test system for evaluating the toxicity of chemicals. **Atla.** 17: 203-207.
 210. STEPTOE, P. C. i R. G. EDWARDS (1983). Current success of human *in vitro* fertilization in relation to the implantation of embryos. **Lancet.** ii: 1265-1269.
 211. STEWART-SAVAGE, J. i D. B. BAVISTER (1988). Deterioration of stored culture media as monitored by a sperm motility bioassay. **J. in Vitro Fertil. Embryo Transfer.** 5: 76-81.
 212. SOKOLOSKI, J. E. i D. P. WOLF (1984). Human fertilization *in vitro*; Laboratory conditions for human *in vitro* fertilization. Eds. Wolf DP, MM Quigley, Plenum Press. Nova York. p. 182.
 213. SPINDLE, A. I. i PEDERSEN, R. A. (1973). Hatching, attachment and outgrowth of mouse blastocysts *in vitro*: fixed nitrogen requirements. **J. Exp. Zool.** 186: 305-318.
 214. SPINDLE, A. I. (1990). *In vitro* development of one-cell embryos from outbred mice: influence of culture medium composition. **In Vitro Cell. Dev. Biol.** 25: 151-156.
 215. STAESSEN, C., E. VAN DEN ABBEEL, I. KHAN, P. DEVROEY i A. C. VAN STEIRTEGHEM (1990). Comparison between human serum and Albuminar-20(TM) supplement for *in vitro* fertilization. **Human Reprod.** 5: 336-344.
 216. THOMSON, J. L. (1988). Effect of two non-steroidal antifertility agents on pregnancy in mice. I. Comparison of *in-vitro* and *in-vivo* effects on zygotes. **J. Reprod. Fertil.** 15: 223-228.
 217. TÖRRÖNEN, R., K. PELKONEN i S. KÄRENLAMPI (1989). Cytotoxic and Enzyme-inducing effects of rodent diets and cage bedding materials: evaluation by a cell culture study. **Atla.** 17: 182-187.
 218. TOYODA, Y. i M. C. CHANG (1974). Fertilization of rat eggs *in vitro* by epididymal spermatozoa and the development of eggs following transfer. **J. Reprod. Fertil.** 36: 9-14.
 219. TOYODA, Y., M. YOKOYAMA i T. HOSHI (1971). Studies on the fertilization of mouse eggs *in vitro*. I. *In vitro* fertilization of eggs by fresh epididymal sperm. **J. Anim. Reprod.** 16: 147-151.
 220. TROUNSON, A. (1983). Fertilization of the human egg *in vitro*: Factors controlling normal embryo development and implantation of human oocytes fertilized *in vitro*. Eds. Beier HM, HR Lindner. Springer-Verlag. Berlin-Heidelberg. p. 235.
 221. TROUNSON, A. i A. CONTI (1984). Research in human *in vitro* fertilization and embryo transfer. **Br. Med. J.** 285: 244-248.
 222. TSAFRIRI, A. (1978). The vertebrate ovary. Oocyte maturation in mammals. Ed. Jones RE. Plenum Press. Nova York. pp. 409-469.

223. UEDA, M., K. SAITO, K. HIROSE i M. SAITO (1969). Cytotoxic effects of inorganic, phenyl and alkyl mercuric compounds on Hela cells. **J. Exp. Med.** 39: 47-58.
224. VAN WINKLE, L. J., N. HAGHIGHAT i A. L. CAMPIONE (1990). Glycine protects primplantation mouse conceptuse from a detrimental ellect on development of inorganic ions in oviductal fluid. **J. Exp. Zool.** 253: 215-219.
225. TSUNODAY, A. McLAREN (1983). Effect of various procedures on the viability of mouse embryos containing half the normal number of blastomeres. **J. Reprod. Fertil.** 69: 315-320.
226. WALES, R. G. (1970). Effects on ions on the development of the preimplantation mouse embryo *in vitro*. **J. Reprod. Fertil.** 33: 207-212.
227. WALES, R. G. i D. G. WHITTINGHAM (1973). The metabolism of specifically labelled lactate and pryuvate by two-cell mouse embryos. **J. Reprod. Fertil.** 33: 207-212.
228. WERB, Z., G. A. SCHULTZ, R. A. PEDERSEN i K. STURN (1989). Growth factor and growth factor receptor gene expression in peri-implantation mouse embryos. **J. Cell. Biochem. Supl.** 13B.CC009.
229. WHITTEN, W. K. i J. D. BIGGERS (1968). Complete development *in vitro* of the pre-implantation stages of the mouse in a simple chemically defined medium. **J. Reprod. Fertil.** 17: 399-401.
230. WHITTEN, W. K. (1957). Culture of tubal ova. **Nature.** 178: 1081.
231. WHITTEN, W. K. (1970). Nutrient requirements for the culture of preimplantation embryos *in vitro*. **Adv. Biosci.** 6: 129-139.
232. WHITTEN, W. K. i A. K. CHAMPLIN (1978). Methods in Mammalian Reproduction; Pheromones, estros, ovulation and mating. Ed. Daniel IC. Academic Press. Nova York, pp. 403-417.
233. WHITTINGHAM, D. G. (1967). Fallopiant tybe and early cleavage in the mouse. **Nature.** Londres. 213: 942-943.
234. WHITTINGHAM, D. G. i R. G. WALES (1969). Storage of two-cell mouse embryos *in vitro*. **Aust. J. Biol. Sci.** 22: 1065-1070.
235. WHITTINGHAM, D. G. (1971). Culture of mouse ova. **J. Reprod. Fert.** 14: 7-21.
236. WIEMER, K. E., J. COHEN, G. F. AMBORSKI, G. WRIGHT i S. WIKER (1989). *In vitro* development and implantation of human embryos following culture on fetal bovine uterine fibroblast colls. **Hum. Reprod.** 4: 475-480.
237. WILEY, L. M. (1984). Cavitation in the mouse preimplantation embryo. Na/K-ATPase and the origin of nascent blastocoele fluid. **Dev. Biol.** 105: 330-335.
238. WILLEY, L. M., S. YANAMI i D. VAN MUYDEN (1986). Effect of potassium concentration, type of protein supplement, and embryo density on mouse preimplantation development *in vitro*. **Fertil. Steril.** 45: 111-116.
239. WOOD, C., R. McMASTER, G. RENNIE, A. TROUNSON i J. LEETON (1985). Factors influencing pregnancy rates following *in vitro* fertilization and embrio transfer. **Fertil. Steril.** 43: 245-250.
240. WOOD, S. A. i P. L. KAYE (1989). Effects of epidermal growth factor on preimplantation mouse embryos. **J. Reprod. Fert.** 85: 575-582.
241. WRIGHT, R. W., J. G. WATSON i S. CHAYKIN (1978). Factors influencing the *in vitro* hatching of mouse blastocysts. **Anim. Reprod. Sci.** 1: 181-188.
242. YAMANE, I., O. MURAKAMI i M. KATO (1976). "Serum-free" culture of various mammalian cells and the role of bovine albumin. **Cell. Struct. Funct.** 1: 279-284.
243. YOVICH, J. L., W. R. EDIRISINGHE, J. M. TOVICH, J. D. STANGER i P. L. MATSON (1988). Methods of water purification for the preparation of culture media in an IVF-ET programme. **Hum. Reprod.** 3: 245-248.