

J.A. de León^{a,c}
L. Ortiz^a
J.A. Clavero^a
C. de León^b
J. Santolaya-Forgas^c

177

Actividad biológica de los compartimientos extraembrionarios

Biological activity of the extraembryonic compartments

^aDepartamento de Obstetricia y Ginecología. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid. España. ^bFacultad de Medicina. Universidad de la Laguna. Santa Cruz de Tenerife. España. ^cDivision of Reproductive's Genetics. Fetal Medicine and Ultrasound. Texas Tech University. Texas. Estados Unidos.

Este trabajo ha sido financiado por el Amarillo Women's Health Research Institute, Texas Tech University. El Dr. Juan Antonio de León Luis es actualmente becario del Fondo de Investigación Sanitaria (BEFI 02/9305).

Correspondencia:

Dr. J.A de León Luis.
Texas Tech University Health Sciences Center.
Division of Reproductive's Genetics, Fetal Medicine
and Ultrasound.
Department of Obstetrics and Gynecology.
1400 Coulter. Amarillo, TX 79106. Estados Unidos.
Correo electrónico: jleon@ama.ttuhsc.edu

Fecha de recepción: 28/11/03

Aceptado para su publicación: 1/4/04

RESUMEN

Los avances en los equipos ecográficos y la realización de técnicas invasivas durante el primer trimestre del embarazo han permitido un acercamiento sin precedentes al entendimiento del desarrollo embrionario. Durante el primer trimestre del embarazo, el análisis de las muestras procedentes de suero materno, celoma extraembrionario, saco vitelino y saco amniótico, obtenidas tanto en humanos como en modelos animales, han puesto de manifiesto los cambios sucesivos que se producen en las características fisicoquímicas de estos líquidos en respuesta al desarrollo del propio embrión y sus anejos.

PALABRAS CLAVE

Ecografía transvaginal. Saco vitelino. Celoma extraembrionario. Celocentesis.

ABSTRACT

Advances in ultrasonographic equipment and the use of invasive techniques in the first trimester of pregnancy have allowed unprecedented knowledge of embryo development. In the first trimester of pregnancy, analysis of samples from maternal serum, extraembryonic celom, vitelline sac and amniotic sac both from humans and from animal models have revealed the successive changes in the physicochemical characteristics of these fluids in response to the development of the fetus and the extraembryonic compartments.

KEY WORDS

Transvaginal ultrasound. Vitelline sac. Extraembryonic celom. Celocentesis.

178 INTRODUCCIÓN

En los años cincuenta, tanto el embrión como las estructuras extraembrionarias humanas sólo podían estudiarse en muestras obtenidas tras histerotomías o histerectomías realizadas en mujeres gestantes^{1,2}. Estos estudios demostraron que la implantación se producía 2 semanas después de la fecundación del ovocito y que, en ese momento, el blastocisto estaba compuesto morfológicamente por 2 grupos celulares: las células del embrioblasto y la capa de células citotrofoblásticas, que rodean la cavidad blastocelómica^{2,3}.

La embriología comparada supuso, sin duda, un gran avance en el conocimiento de cada una de las estructuras presentes en el comienzo del embarazo. Sin embargo, este avance estaba limitado por la dificultad de acceso *in vivo* al entorno embrionario. Hoy día, la ecografía permite no sólo la identificación de embarazos desde la semana 3 posfecundación sino también el reconocimiento de las estructuras presentes en el saco gestacional durante el primer trimestre del embarazo (embrión, sacos amniótico y vitelino, y el celoma extraembrionario)⁴⁻⁷. Además de la descripción física de estos componentes *in vivo*, técnicas ecoguiadas han permitido el estudio de muestras provenientes de cada uno de los compartimientos extraembrionarios^{2,3}.

En este estudio se presentan una revisión del desarrollo de las estructuras extraembrionarias humanas y un resumen de los gradientes de solutos existentes entre el suero materno y los compartimientos extraembrionarios.

DESARROLLO EMBRIOLÓGICO DE LAS ESTRUCTURAS EXTRAEMBRIONARIAS

En el momento de la implantación el blastocisto está formado por 2 tipos celulares que forman el embrioblasto y las células citotrofoblásticas que rodean el saco gestacional^{3,8}. Aunque se desconoce cómo se diferencia el embrioblasto humano, la biología comparada ha demostrado que éste se esface en 2 capas celulares: *a*) el epiblasto, formado por células de la porción dorsal con características epiteliales y con membrana basal, y *b*) el hipoblasto, formado por células cuboideas adyacentes a la cavidad blastocelómica^{2,9}.

Al proliferar el epiblasto se van creando lagunas líquidas intercelulares que, tras ir confluyendo, desplazan un grupo de células hacia el exterior; este grupo de células se diferenciará en amniocitos^{10,11}. Hacia el día 9 posfecundación, células del hipoblasto embrionario comienzan a migrar y a tapizar la superficie de la vesícula blastocelómica formando el endodermo extraembrionario. La vesícula rodeada de este endodermo constituye, desde ahora, el saco vitelino primario^{1,2}. Hacia los 11 días posfertilización se puede identificar el mesodermo extraembrionario. Las células mesodérmicas se originan a partir de las porciones más distales del embrión y se sitúan entre el endodermo extraembrionario y el citotrofoblasto, y rodean todas las estructuras de origen embrioblástico². Algunos autores han sugerido que la cavidad extracelómica se forma como consecuencia de la rotura del mesodermo extraembrionario, por su incapacidad para seguir la rápida expansión del citotrofoblasto dentro de la decidua materna (origen trofoblástico)¹². Otros autores sugieren que la coalescencia de múltiples lagunas intercelulares es lo que crea la cavidad extracelómica dentro del mesodermo extraembrionario (origen mesodérmico)^{2,3,13}.

Durante la semana 3 del desarrollo, el saco vitelino secundario (SV) queda configurado como una vesícula que protruye de la porción ventral del embrión, con una pared compuesta por mesodermo y endodermo extraembrionario¹⁴. Despues de los sucesivos plegamientos tridimensionales del embrión se comienzan a crear las estructuras intraembrionarias. Estos plegamientos, además, producen la contricción de la base del SV y dan lugar al conducto vitelino. La progresiva elongación del conducto vitelino hace que eventualmente el SV aparezca como un globo inmerso en la cavidad extracelómica unido por el conducto vitelino a la pared abdominal del embrión. Dentro de la porción mesodérmica de la pared del SV se crean “islotes” celulares hemangiocitoblasticos^{15,16}. Las células centrales de estos islotes se diferencian en células hematopoyéticas mientras que las más periféricas dan lugar a las células endoteliales de los vasos sanguíneos extraembrionarios que conectarán, más adelante, con el sistema circulatorio del propio embrión^{17,18}.

Caudal al SV se unen el mesodermo embrionario y el extraembrionario, y crean un tallo; dentro de este tallo mesodérmico se sitúa la segunda vesícula de origen hipoblastico, llamada alantoides. Tanto el

conducto vitelino como el alantoides se convertirán en estructuras vestigiales más allá del primer trimestre. De este tallo de conexión también surgirá el cordón umbilical (fig. 1)^{19,20}.

Las células citotrofoblásticas, después de una serie de cambios estructurales, forman el tejido corial, que establece la comunicación entre el saco gestacional y la decidua materna^{8,21}. Inicialmente, se forman las vellosidades coriales primarias, compuestas por columnas citotrofoblásticas rodeadas de una fina capa de sincitiotrofoblasto. Posteriormente, el mesodermo extraembrionario se introducirá entre las células citotrofoblásticas y dará lugar a las vellosidades secundarias. Dentro de este soporte mesenquimal se formarán los vasos sanguíneos placentarios, que darán funcionalidad a las vellosidades llamadas terciarias^{22,23}. Desde la semana 6 de gestación, pueden observarse vellosidades de tipo primario, secundario y terciario, y conforme avance el embarazo, el porcentaje de vellosidades terciarias será el más importante.

A medida que el saco amniótico crece y contacta con las vellosidades coriales, éstas degeneran, formando el corion leve. Las vellosidades asociadas a la decidua basal, no en contacto con el saco amniótico, proliferan y forman el corion frondoso o placa definitiva (fig. 1)¹.

ECOGRAFÍA Y DESARROLLO DE LAS ESTRUCTURAS EXTRAEMBRIONARIAS

El saco gestacional puede detectarse entre los días 15 y 21 posfecundación como una imagen eco-negativa, esférica, de 2-3 mm de diámetro, situada dentro de la pared endometrial (fig. 2a)^{24,25}. El saco vitelino es la primera estructura inequívocamente embrionaria que puede visualizarse por ecografía a partir de los 21 días posfecundación, inmerso en el espacio extracelómico (fig. 2b)^{26,27}. La imagen característica es de un «anillo» de 3 a 6 mm. El SV desaparece ecográficamente entre las 9-10 semanas posfecundación²⁸⁻³⁰. Varios estudios prospectivos han analizado el valor clínico de las mediciones de los sacos gestacional y vitelino, con resultados a veces contradictorios³¹⁻³³. Sin embargo, parece que existe consenso en señalar que la ausencia de SV en presencia de un saco gestacional mayor de 20 mm, o la presencia de un SV con un diámetro mayor de 7

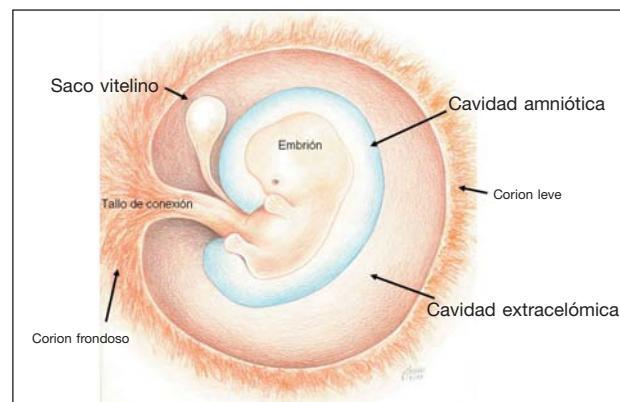


Figura 1. Representación gráfica de un embrión y de las estructuras extraembrionarias humanas en torno a la quinta y sexta semanas de gestación.

mm, asocian un riesgo elevado de pérdida del embarazo (fig. 2c)³¹. Aunque la ecografía tridimensional y el Doppler color han descrito el volumen y la vascularización del SV, su utilidad clínica no está clara, ya que existe la posibilidad de que estas técnicas hayan podido aumentar de forma iatrogénica la tem-



Figuras 2a y b. Imágenes ecográficas de embarazo normales a las 2 y 4 semanas posfecundación.



Figura 2c. Saco vitelino anormal dentro del saco gestacional durante la quinta semana posfecundación, en un embarazo que terminó en aborto espontáneo.

peratura local y afectar, de esta forma, el desarrollo normal del embarazo^{20,31,34}.

La cavidad extracelómica se visualiza ecográficamente como el espacio entre la superficie corial del saco gestacional y la cavidad amniótica en desarro-

llo³⁵. A las 5 semanas posfecundación ocupa más de la mitad del saco gestacional. Posteriormente, y debido a la rápida expansión de la cavidad amniótica, el porcentaje del saco gestacional ocupado por la cavidad extracelómica va disminuyendo hasta desaparecer hacia la semana 12 posfecundación (fig. 3).

El saco amniótico se puede visualizar por ecografía a partir de la semana 4 posfecundación. Aparece como una membrana que se expande alrededor del embrión y termina por obliterar la cavidad extracelómica al final del primer trimestre (fig. 3)^{4,5,36,37}. Para acumular líquido, el saco amniótico tiene que ser prácticamente impermeable. La expansión del saco amniótico entre las semanas 5 y 14 de gestación se correlaciona con la expansión de la superficie embrionaria⁵. Más allá de la semana 12 de gestación, la circulación fetoplacentaria, el sistema urogenital, el aparato digestivo y los pulmones fetales son los mayores determinantes de la producción de líquido amniótico^{5,38}.

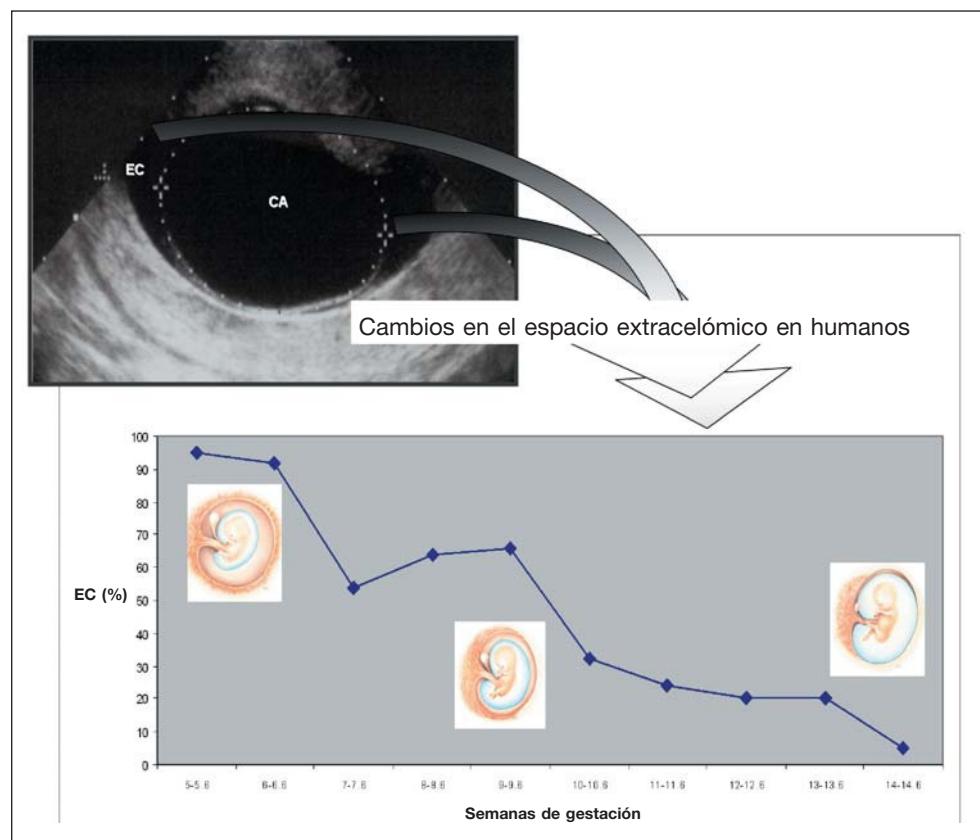


Figura 3. Visualización ecográfica de la cavidad amniótica (CA) y el espacio extracelómico (EC). La gráfica demuestra el porcentaje del saco gestacional ocupado por el EC entre las semanas 5 y 14 de gestación.

HISTORIA DE LA CELOCENTESIS

Durante los años setenta la amniocentesis permitió el estudio del líquido amniótico y, con ello, el estudio del ambiente fetal. Estos estudios, realizados durante el segundo y el tercer trimestres de gestación, demostraron los cambios en las características fisicoquímicas del líquido amniótico y sus relaciones con los cambios que acontecían en el suero materno^{39,40}. En esos años, la cavidad extracelómica se veía como un espacio virtual muchas veces ignorado por los ecografistas. Por tanto, muchas de las muestras obtenidas tras amniocentesis hechas antes de la semana 14 desde la última regla proporcionaban resultados contradictorios en cuanto a la composición del líquido amniótico^{12,41}. La aparición de las sondas ecográficas transvaginales ha facilitado el reconocimiento de las estructuras existentes dentro del saco gestacional y, más concretamente, ha permitido visualizar de forma clara la membrana amniótica^{4,5,42}. Este avance ha permitido el abordaje correcto de cada uno de los compartimientos extraembrionarios, y el estudio de la distribución de diversos solutos a un lado u otro de éstos.

Los cambios ecográficos del espacio extracelómico se han descrito tanto en embarazos humanos como en el modelo *Papio anubis* (babuino) (figs. 2 y 3)^{5,6,11}. En primates no humanos, el momento más seguro para realizar la celocentesis se sitúa en torno a los 40 días posfecundación. Recientemente se ha sugerido que la celocentesis ecoguiada no sólo es reproducible sino que tiene una curva de aprendizaje relativamente corta. La celocentesis puede realizarse tanto por la vía transvaginal como la transabdominal, y tiene un riesgo de pérdida de embarazo estimado en un 3%^{11,43}. Al igual que la amniocentesis precoz y la biopsia de corion, la celocentesis ha permitido establecer el diagnóstico prenatal de enfermedades genéticas⁴³⁻⁴⁷.

EJEMPLOS DE LA PRESENCIA DE UNA DINÁMICA DE SOLUTOS ENTRE LA MADRE Y LOS DISTINTOS COMPARTIMIENTOS DEL SACO GESTACIONAL

El embrión está dentro del saco amniótico, y los sacos amniótico y vitelino están inmersos en el espacio extracelómico, y separados físicamente de la

superficie uterina (fig. 1). Para que progrese la gestación se han de desarrollar un flujo de solutos de la madre al embrión y del embrión a la madre. El espacio intersticial de la decidua materna, el tejido corial, la cavidad extracelómica, el SV y el saco amniótico compartmentalizan los solutos y solventes necesarios para el desarrollo del embarazo.

En primates no humanos y en humanos, la membrana coriodecidual es biológicamente semipermeable⁴⁸. Esto lo demuestra el hecho de que moléculas de bajo peso molecular, como la urea, la glucosa o los electrolitos, responsables de la osmolalidad, están distribuidas de forma similar en el suero materno y el líquido extracelómico. La distribución de proteínas en ambos fluidos es, por el contrario, significativamente distinta y con un gradiente global aproximado de 18:1 (suero materno, 18; líquido celómico, 1). Sin embargo, las proteínas tienen gradientes particulares dependiendo de su origen y, probablemente también, de las variaciones funcionales que van ocurriendo durante el embarazo^{49,50}. Así, por ejemplo, las proteínas totales y la prealbúmina aumentan en el líquido extracelómico durante el primer trimestre del embarazo, a pesar de que sus valores en el suero materno disminuyen debido a la hemodilución fisiológica que ocurre durante este período del embarazo. Estos hallazgos sugieren que los cambios proteínicos en el líquido extracelómico son independientes de los que ocurren en el suero materno^{37,51}. Más evidencia de cambios proteínicos selectivos se ha adquirido tras el análisis de una gran variedad de proteínas específicas de origen trofoblástico, como el lactógeno placentario, la activina A y la inhibina, que están más elevadas en el líquido extracelómico que en el suero materno. La gonadotropina coriónica humana (hCG) no sólo aumenta en el espacio celómico durante el primer trimestre del embarazo sino que alcanza valores que son 185 veces más elevados que en el suero materno. La vitamina B₁₂, la prolactina y la proteína placentaria 14, de origen decidual, se encuentran también más elevadas en el líquido celómico que en el suero materno. Los valores de estradiol y de progesterona, por el contrario, disminuyen en el líquido celómico durante el primer trimestre del embarazo^{52,53}.

El estudio del crecimiento embrionario ha llevado también al análisis del suministro de aminoácidos y factores de crecimiento, como los factores de crecimiento similares a la insulina (IGF) y sus *binding*

Tabla 1 Capas histológicas y cambios fisiológicos que tienen lugar en la pared del saco vitelino durante el primer trimestre de gestación

Endodermo	Hasta la quinta semana posfecundación es una monocapa de células cuboideas (10-20 mm de diámetro). Cordoncelulares de esta capa atraviesan la capa mesenquimal y alcanzan el mesotelio, formando un entramado tubular que facilita el transporte de fluido y sustancias a través de la pared. Esta estructura tubular es similar a la que se forma en el endodermo digestivo y pulmonar. Las células de esta capa endodérmica también tienen la capacidad de producir proteínas (prealbúmina, albúmina, α -fetoproteína, α -1 antitripsina y transferrina). A partir de la quinta semana posfecundación, las células endodérmicas disminuyen de tamaño y comienzan a mostrar cambios degenerativos, y su pared se torna irregular y pierde grosor
Mesodermo	Hasta la quinta semana posfecundación esta capa es la de mayor grosor. Está formada por hemangiocitoblastos, células de características fibroblásticas y macrófagos. Los hemangiocitoblastos tienden a agruparse en islotes donde las células periféricas darán lugar a los vasos sanguíneos (vasculogenia). Las células centrales darán lugar a las células madre hematopoyéticas (hematopoyesis primitiva). Los vasos sanguíneos están fenestrados y sin membrana basal. La hematopoyesis es fundamentalmente eritroide. También en esta capa aparecen las células progenitoras gonadales. Más allá de la quinta semana posfecundación esta capa comienza a involucionar y los vasos sanguíneos se hacen más tortuosos e irregulares
Mesotelio	Células de características epiteliales con una membrana basal discontinua. Inicialmente, las células de esta capa presentan abundantes complejos de Golgi y borde en cepillo. Durante el proceso de involución de toda la pared del saco vitelino dichas organelas van disminuyendo en número dentro del citoplasma

proteins (p. ej., IGFBP-1). Hoy día, sabemos que existe transporte activo de aminoácidos de la madre al embrión y que éstos se acumulan en el líquido extracelómico^{54,55}. También se ha demostrado que los IGF se encuentran en concentraciones más elevadas en el líquido celómico que en el suero materno⁵⁶⁻⁵⁹. Además, se sabe que en suero materno hay valores más elevados de la forma fosforilada de IGFBP-1, mientras que en el líquido celómico los valores de la IGFBP-1 no fosforilada son los más elevados. Esto indica una inhibición de la función biológica de IGF-II en la madre y disponibilidad de IGF-II en el líquido celómico⁵⁶.

La capa endodérmica del SV es también capaz de sintetizar proteínas similares a las que producirá el hígado fetal. Estas proteínas, que incluyen una isoforma de la α -fetoproteína (AFP), la α 1-antitripsina, la albúmina, la prealbúmina y la transferrina, son secretadas mayoritariamente al entorno embrionario, por lo que contribuyen muy poco al conjunto de las proteínas plasmáticas maternas^{60,61}. Por el contrario, la AFP embrionaria, que puede ser diferenciada de la producida por el SV, debido a su elevado peso molecular (\pm 70 kDa), se distribuye entre los líquidos amnióticos, extracelómicos y suero materno⁶². La pared del SV también tiene un potencial abortivo, ya que algunas enzimas y proteínas no producidas por el SV se encuentran en concentraciones si-

milares en los líquidos del saco vitelino y el espacio celómico antes de la semana 10 de gestación^{1,33}. En la tabla 1 se exponen las características histológicas de la pared del SV, así como los cambios que ocurren en ella según la edad gestacional.

Finalmente, moléculas tan variadas como las hormonas tiroideas maternas, el hierro, factores del complemento, la relaxina y algunas inmunoglobulinas específicas IgG, IgM e IgA contra *Toxoplasma gondii*, citomegalovirus o rubéola, también se han medido en el líquido celómico antes de las 12 semanas de gestación, lo que demuestra que pasan desde el suero materno, ya que ni el embrión ni el SV son capaces de sintetizar estos compuestos en este estadio del embarazo^{63,64}. La acumulación de hierro en el espacio extracelómico probablemente soporta la elevada eritropoyesis que tiene lugar durante este período embrionario^{65,66}. La presencia de inmunoglobulinas específicas en el espacio celómico demuestra la existencia temprana de inmunidad adquirida^{60,67,68}.

CONCLUSIÓN

La ecografía ha permitido demostrar que los compartimientos extraembrionarios y, en particular, el espacio extracelómico, son biológicamente selectivos y dinámicos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Pereda TJ, Motta PM. New advances in human embryology: morphofunctional relationship between the embryo and the yolk sac. *Med Electron Microsc* 1999;32:67-78.
2. Luckett WP. Origin and differentiation of the yolk sac and extraembryonic mesoderm in presomite human and rhesus monkey embryos. *Am J Anat* 1978;152:59-97.
3. Luckett WP. The development of primordial and definitive amniotic cavities in early Rhesus monkey and human embryos. *Am J Anat* 1975;144:149-67.
4. Jeanty P, Renoy P, Van Kerkem J, Dagnelie J, Struyven J. Ultrasonic demonstration of the amnion. *J Ultrasound Med* 1982;1:243-7.
5. Santolaya-Forgas J, De León-Luis J, D'Ancona RL, Morgan J, Kauffman RP. Evolution of the amniotic sac and extracelomic space as seen by early ultrasound examination. *Fetal Diagn Ther* 2003;18:262-9.
6. Santolaya-Forgas J, Vengalil S, Meyer W, Fortman J. Transvaginal ultrasonographic (TVS) evaluation of baboon gestation from 37-62 days postconception. *Am J Primatol* 1997;43:323-8.
7. Weissman A, Itskovitz-Eldor J, Jakobi P. Sonographic measurement of amniotic fluid volume in the first trimester of pregnancy. *J Ultrasound Med* 1996;15:771-4.
8. Burton GJ, Hempstock J, Jauniaux E. Nutrition of the human fetus during the first trimester—a review. *Placenta* 2001;22 (Suppl A):S70-7.
9. Bianchi DW, Wilkins-Haug LE, Enders AC, Hay ED. Origin of extraembryonic mesoderm in experimental animals: relevance to chorionic mosaicism in humans. *Am J Med Genet* 1993;46: 542-50.
10. Jones CJ, Jauniaux E. Ultrastructure of the materno-embryonic interface in the first trimester of pregnancy. *Micron* 1995; 26:145-73.
11. Santolaya-Forgas J, Vengalil S, Kushwaha A, Bieniarz A, Fortman J. Assessment of the risk of fetal loss after the coelocentesis procedure using a baboon model. *Fetal Diagn Ther* 1998;13:257-60.
12. Jauniaux E, Gulbis B, Jurkovic D, Campbell S, Collins WP, Ooms HA. Relationship between protein concentrations in embryological fluids and maternal serum and yolk sac size during human early pregnancy. *Hum Reprod* 1994;9:161-6.
13. Karabulut AK, Layfield R, Pratten MK. Growth-promoting effects of different fractions of extra-embryonic coelomic fluid on embryonic development. *Anat Histol Embryol* 2000;29:225-34.
14. Hesseldahl H, Larsen JF. Ultrastructure of human yolk sac: endoderm, mesenchyme, tubules and mesothelium. *Am J Anat* 1969;126:315-35.
15. Flake AW, Zanjani ED. In utero hematopoietic stem cell transplantation: ontogenetic opportunities and biologic barriers. *Blood* 1999;94:2179-91.
16. Huyhn A, Dommergues M, Izac B, Croisille L, Katz A, Vainchenker W, et al. Characterization of hematopoietic progenitors from human yolk sacs and embryos. *Blood* 1995; 86:4474-85.
17. González-Crussi F, Roth LM. The human yolk sac and yolk sac carcinoma. An ultrastructural study. *Hum Pathol* 1976;7:675-91.
18. Takashina T. Haemopoiesis in the human yolk sac. *J Anat* 1987;151:125-35.
19. Kurjak A, Kupesic S, Kostovic L. Vascularization of yolk sac and vitelline duct in normal pregnancies studied by transvaginal color and pulsed Doppler. *J Perinat Med* 1994;22:433-40.
20. Kurjak A, Kupesic S, Kos M. Three-dimensional sonography for assessment of morphology and vascularization of the fetus and placenta. *J Soc Gynecol Investig* 2002;9:186-202.
21. Burton GJ, Jauniaux E, Watson AL. Maternal arterial connections to the placental intervillous space during the first trimester of human pregnancy: the Boyd collection revisited. *Am J Obstet Gynecol* 1999;181:718-24.
22. Castellucc M, Kosanke G, Verdenelli F, Huppertz B, Kaufmann P. Villous sprouting: fundamental mechanisms of human placental development. *Hum Reprod Update* 2000;6:485-94.
23. Jauniaux E, Burton GJ, Moscoso GJ, Hustin J. Development of the early human placenta: a morphometric study. *Placenta* 1991;12:269-76.
24. Goldstein I, Zimmer EA, Tamir A, Peretz BA, Paldi E. Evaluation of normal gestational sac growth: appearance of embryonic heartbeat and embryo body movements using the transvaginal technique. *Obstet Gynecol* 1991;77:885-8.
25. Jurkovic D, Gruboeck K, Campbell S. Ultrasound features of normal early pregnancy development. *Curr Opin Obstet Gynecol* 1995;7:493-504.
26. Manton M, Pedersen JF. Ultrasound visualization of the human yolk sac. *J Clin Ultrasound* 1979;7:459-60.
27. Sauerbrei E, Cooperberg PL, Poland BJ. Ultrasound demonstration of the normal fetal yolk sac. *J Clin Ultrasound* 1980;8:217-20.
28. Mara E, Foster GS. Spontaneous regression of a yolk sac associated with embryonic death. *J Ultrasound Med* 2000;19:655-6.
29. Makikallio K, Tekay A, Jouppila P. Yolk sac and umbilicoplacental hemodynamics during early human embryonic development. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1999;14:175-9.
30. Stampone C, Nicotra M, Muttinelli C, Cosmi EV. Transvaginal sonography of the yolk sac in normal and abnormal pregnancy. *J Clin Ultrasound* 1996;24:3-9.

31. Figueras F, Torrents M, Muñoz A, Comas C, Antolin E, Echevarria M, et al. Three-dimensional yolk and gestational sac volume. A prospective study of prognostic value. *J Reprod Med* 2003;48:252-6.
32. Levi CS, Lyons EA, Lindsay DJ. Early diagnosis of nonviable pregnancy with endovaginal US. *Radiology* 1988;167:383-5.
33. Jauniaux E, Jurkovic D, Henriet Y, Rodesch F, Hustin J. Development of the secondary human yolk sac: correlation of sonographic and anatomical features. *Hum Reprod* 1991;6: 1160-6.
34. Kupesic S, Kurjak A. Volume and vascularity of the yolk sac assessed by three-dimensional and power Doppler ultrasound. *Early Pregnancy* 2001;5:40-1.
35. Campbell J, Wathen N, Perry G, Soneji S, Sourial N, Chard T. The coelomic cavity: an important site of materno-fetal nutrient exchange in the first trimester of pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 1993;100:765-7.
36. Robinson HP. "Gestation sac" volumes as determined by sonar in the first trimester of pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 1975;82:100-7.
37. Blackburn S, Loper D. Maternal, fetal, and neonatal physiology: a clinical perspective. 2nd ed. Philadelphia: Harcourt, 1992.
38. Gulbis B, Jauniaux E, Jurkovic D, Gervy C, Ooms HA. Biochemical investigation of fetal renal maturation in early pregnancy. *Pediatr Res* 1996;39:731-5.
39. Nagamani M, McDonough PG, Ellegood JO, Mahesh VB. Maternal and amniotic fluid steroids throughout human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1979;134:674-80.
40. Evans MI, Drugan A, Koppitch FC 3rd, Zador IE, Sacks AJ, Sokol RJ. Genetic diagnosis in the first trimester: the norm for the 1990s. *Am J Obstet Gynecol* 1989;160:1332-6; discussion 1336-9.
41. Wathen NC, Cass PL, Campbell DJ, Kitau MJ, Chard T. Early amniocentesis: alphafetoprotein levels in amniotic fluid, extraembryonic coelomic fluid and maternal serum between 8 and 13 weeks. *Br J Obstet Gynaecol* 1991;98:866-70.
42. Soothill PW, Nicolaides KH, Rodeck CH, Campbell S. Amniotic fluid and fetal tissues are not heated by obstetric ultrasound scanning. *Br J Obstet Gynaecol* 1987;94:675-7.
43. Makrydimas G, Kaponis A, Skentou C, Lolis D. Short-term safety of celocentesis for the mother and the fetus. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2002;19:243-5.
44. Jauniaux E, Cirigliano V, Adinolfi M. Very early prenatal diagnosis on coelomic cells using quantitative fluorescent polymerase chain reaction. *Reprod Biomed Online* 2003;6:494-8.
45. Cruger DG, Bruun-Petersen G, Kolvraa S. Turner's syndrome 45,X found by celocentesis. *Prenat Diagn* 1997;17:588-9.
46. Jurkovic D, Jauniaux E, Campbell S, Mitchell M, Lees C, Layton M. Detection of sickle gene by celocentesis in early pregnancy: a new approach to prenatal diagnosis of single gene disorders. *Hum Reprod* 1995;10:1287-9.
47. Makrydimas G, Georgiou I, Kranas V, Zikopoulos K, Lolis D. Prenatal diagnosis of beta-thalassaemia by celocentesis. *Mol Hum Reprod* 1997;3:729-31.
48. Santolaya-Forgas J, Duval J, Prespin C, Vengalil S, Kushwhala A, Wilson L, et al. Extracoelomic fluid osmometry and electrolyte composition during early gestation in the baboon. *Am J Obstet Gynecol* 1998;179:1124-7.
49. Burton GJ, Watson AL, Hempstock J, Skepper JN, Jauniaux E. Uterine glands provide histiotrophic nutrition for the human fetus during the first trimester of pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:2954-9.
50. Campbell J, Wathen N, Macintosh M, Cass P, Chard T, Mainwaring Burton R. Biochemical composition of amniotic fluid and extraembryonic coelomic fluid in the first trimester of pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 1992;99:563-5.
51. Jauniaux E, Gulbis B. Fluid compartments of the embryonic environment. *Hum Reprod Update* 2000;6:268-78.
52. Atkinson G, Campbell DJ, Cawood ML, Oakey RE. Steroids in human intrauterine fluids of early pregnancy. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1996;44:435-40.
53. Jauniaux E, Gulbis B, Jurkovic D, Schaaps JP, Campbell S, Meuris S. Protein and steroid levels in embryonic cavities in early human pregnancy. *Hum Reprod* 1993;8:782-7.
54. Steegers-Theunissen RP, Wathen NC, Eskes TK, Van Raaij-Selten B, Chard T. Maternal and fetal levels of methionine and homocysteine in early human pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 1997;104:20-4.
55. Jauniaux E, Sherwood RA, Jurkovic D, Boa FG, Campbell S. Amino acid concentrations in human embryological fluids. *Hum Reprod* 1994;9:1175-9.
56. Martina NA, Kim E, Chitkara U, Wathen NC, Chard T, Giudice LC. Gestational age-dependent expression of insulin-like growth factor-binding protein-1 (IGFBP-1) phosphoisoforms in human extraembryonic cavities, maternal serum, and decidua suggests decidua as the primary source of IGFBP-1 in these fluids during early pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:1894-8.
57. Nonoshita LD, Wathen NC, Dsupin BA, Chard T, Giudice LC. Insulin-like growth factors (IGFs), IGF-binding proteins (IGFBPs), and proteolyzed IGFBP-3 in embryonic cavities in early human pregnancy: their potential relevance to maternal-embryonic and fetal interactions. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;79:1249-55.
58. Miell JP, Jauniaux E, Langford KS, Westwood M, White A, Jones JS. Insulin-like growth factor binding protein concentration and post-translational modification in embryological fluid. *Mol Hum Reprod* 1997;3:343-9.
59. Karabulut AK, Layfield R, Pratten MK. Growth promoting effects of human placental lactogen during early organogenesis: a link to insulin-like growth factors. *J Anat* 2001;198:651-62.
60. Gitlin D, Perricelli A. Synthesis of serum albumin, prealbumin, alpha-foetoprotein, alpha-1-antitrypsin and transferrin by the human yolk sac. *Nature* 1970;228:995-7.

61. Shi WK, Hopkins B, Thompson S, Heath JK, Luke BM, Graham CF. Synthesis of apolipoproteins, alphafoetoprotein, albumin, and transferrin by the human foetal yolk sac and other foetal organs. *J Embryol Exp Morphol* 1985;85:191-206.
62. Gulbis B, Jauniaux E, Cotton F, Stordeur P. Protein and enzyme patterns in the fluid cavities of the first trimester gestational sac: relevance to the absorptive role of secondary yolk sac. *Mol Hum Reprod* 1998;4:857-62.
63. Contempre B, Jauniaux E, Calvo R, Jurkovic D, Campbell S, De Escobar GM. Detection of thyroid hormones in human embryonic cavities during the first trimester of pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;77:1719-22.
64. Calvo RM, Jauniaux E, Gulbis B, Asuncion M, Gervy C, Contempre B, et al. Fetal tissues are exposed to biologically relevant free thyroxine concentrations during early phases of development. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:1768-77.
65. Moritz KM, Lim GB, Wintour EM. Developmental regulation of erythropoietin and erythropoiesis. *Am J Physiol* 1997;273: R1829-44.
66. Campbell J, Wathen N, Lewis M, Fingerova H, Chard T. Erythropoietin levels in amniotic fluid and extraembryonic coelomic fluid in the first trimester of pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 1992;99:974-6.
67. Jauniaux E, Jurkovic D, Gulbis B, Liesnard C, Lees C, Campbell S. Materno-fetal immunoglobulin transfer and passive immunity during the first trimester of human pregnancy. *Hum Reprod* 1995;10:3297-300.
68. Gitlin D, Biasucci A. Development of gamma G, gamma A, gamma M, beta IC-beta IA, C 1 esterase inhibitor, ceruloplasmin, transferrin, hemopexin, haptoglobin, fibrinogen, plasminogen, alpha 1-antitrypsin, orosomucoid, beta-lipoprotein, alpha 2-macroglobulin, and prealbumin in the human conceptus. *J Clin Invest* 1969;48:1433-46.