

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Histología y Anatomía.



**Modelo predictivo de implantación embrionaria basado en el
perfil metabólico del medio de cultivo obtenido mediante
Resonancia Magnética Nuclear.**

Memoria de Tesis doctoral presentada por

Carla Olmedo Illueca.

Directores de tesis:

Dr. D. Joaquín Rueda Puente.

Dr. D. Daniel Monleón Salvado.

Dr. D. Juan Gilabert Estellés.



EDUARDO FERNANDEZ JOVER, Director del Departamento de Histología y Anatomía de la Universidad Miguel Hernández de Elche

DA SU CONFORMIDAD

A la lectura de la Tesis Doctoral presentada por Dña. Carla Olmedo Illueca, titulada "Modelo predictivo de implantación embrionaria basado en el perfil metabólico del medio de cultivo obtenido mediante RMN".

Para que conste y surta los efectos oportunos firma en presente certificado en Sant Joan d'Alacant, junio de 2015.


Fdo: Prof. Eduardo Fernández Jover





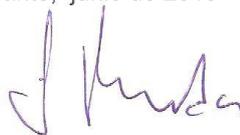
JOAQUIN RUEDA PUENTE, Catedrático de Biología Celular de la Universidad Miguel Hernández y Director Académico de la Cátedra de Biomedicina Reproductiva Clínica Vistahermosa, de dicha Universidad,

CERTIFICA

Que la memoria presentada para optar al grado de Doctor por la Universidad Miguel Hernández por Dña. Carla Olmedo Illueca, Licenciada en Biología, titulada "Modelo predictivo de implantación embrionaria basado en el perfil metabólico del medio de cultivo obtenido mediante RMN", ha sido realizada bajo mi dirección y la de los Drs. Daniel Monleón Salvado y Juan Gilabert Estellés

Que ha supervisado los contenidos científicos y aspecto formales del trabajo y da su conformidad para su presentación y defensa pública.

Alicante, junio de 2015



Fdo: Prof. Joaquín Rueda Puente







DANIEL MONLEÓN SALVADÓ, Doctor en Química, Investigador Principal del Grupo de Metabólica del Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA y Profesor Asociado del Departamento de Patología de la Universidad de Valencia.

CERTIFICA

Que la memoria presentada para optar por el grado de Doctor por la Universidad Miguel Hernández por Dña. Carla Olmedo Illueca, Licenciada en Biología, titulada “Modelo predictivo de implantación embrionaria basado en el perfil metabólico del medio de cultivo obtenido mediante Resonancia Magnética Nuclear”, ha sido realizada bajo mi dirección y la del Dr. Joaquín Rueda Puente y del Dr. Juan Gilabert Estellés.

Que ha supervisado los contenidos científicos y aspectos formales del trabajo y da su conformidad para la presentación y defensa pública.

Y para que así conste, a efectos de su presentación para optar al Grado de Doctor, expido la presente.

Valencia, de Junio de 2015

Fdo: Dr. Daniel Monleón Salvadó





VNIVERSITAT
D VALÈNCIA

Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología
Facultad de Medicina

JUAN GILABERT ESTELLÉS, Profesor Asociado de Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia y Jefe de Área Maternoinfantil del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia,

CERTIFICA

Que la memoria presentada para optar al grado de Doctor por la Universidad Miguel Hernández por Dña. Carla Olmedo Illueca, Licenciada en Biología, titulada "Modelo predictivo de implantación embrionaria basado en el perfil metabólico del medio de cultivo obtenido mediante RMN", ha sido realizada bajo mi dirección y la de los Drs. Daniel Monleón Salvado y Joaquín Rueda Puente.

Que ha supervisado los contenidos científicos y aspecto formales del trabajo y da su conformidad para su presentación y defensa pública.

Valencia, Junio de 2015

Fdo: Prof. Juan Gilabert Estellés





Esta tesis ha sido financiada parcialmente gracias a la Ayuda para Proyectos de Investigación Intramural “Premios López Trigo” en la Convocatoria de Promoción de la Investigación 2010 del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia y al Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA de Valencia.



A mis tesoros, Martin y Aitana.





*"Lo que sabemos es una gota de agua;
lo que ignoramos es el Océano"*

Isaac Newton.





AGRADECIMIENTOS.





Agradecimientos.

Quiero dar las gracias a todas y cada una de las personas que de alguna manera han ayudado a que esta tesis sea una realidad.

En primer lugar y como no podía ser de otra manera me gustaría dar las gracias a mi director el Dr. Joaquín Rueda. Porque desde que nos conocimos en 2007 siempre has confiado en mí, aún sin conocerme. Gracias por tu amistad, porque te considero un amigo. Gracias por estar siempre disponible y por sacar tiempo de no sé donde para contestar mis *emails* aunque sea fin de semana. Gracias por animarme siempre y transmitirme esa tranquilidad que sabes transmitir. Contigo hasta un “vamos mal de tiempo” suena de otra manera. Saber que contaba contigo y que confiabas en mí lo ha hecho todo mucho más fácil.

Al Dr. Juan Gilabert por su apoyo y aportaciones a esta tesis. El amor y la entrega por su trabajo son un referente y un punto guía. En momentos de desánimo y cansancio, admirar su dedicación y vocación es una inestimable fuente de energía.

Al Dr. Daniel Monleón. Porque un día un amigo común me dio tu *email* y me contestaste rápidamente a la idea de colaborar juntos en lo que ha sido el tema de esta tesis. Sin ese *email* nada de esto habría sido posible. Desde el principio me escuchaste y creíste que merecía la pena colaborar. Me llevo de ti el rigor que pones a las cosas que haces.

A mis dos amores, Martín y Aitana. A ti Martín te debo tanto. Te lo debo todo. Gracias por quererme tanto. Eres el motor de mi vida. El mejor compañero de viaje y un padre diez. No puedo pedir más. A mi hija Aitana, gracias por ser una niña tan maravillosa y no tenerme en cuenta el tiempo que te he robado para escribir esta tesis.

A mi familia, mis padres y mi hermano. Por apoyar siempre mis decisiones. Por todo vuestro cariño. Por hacer de mí lo que soy. A ti mamá, abuela y mejor amiga, por hacerme siempre ver que era capaz de todo lo que me propusiera.

A mi familia política. Hasta vosotros habéis querido poner vuestro granito de arena y me habéis ofrecido ayuda para lo que fuese. Qué suerte la mía por poder contar también con vosotros.

A José Manuel Morales, elemento indispensable en esta tesis. Cuantos ratos delante del ordenador viendo que hacían los “ratolines”. Ha sido divertido. Gracias por tu apoyo, tus clases particulares de RMN, tu paciencia, tu ánimo siempre, tus consejos, tus correcciones exprés. Soy consciente de la dedicación que te he pedido.

A todo el equipo que forma la Unidad de Reproducción Humana. Gracias a todos y cada uno de vosotros. Miguel Barea, Javier Díaz, Susana Royo, Irene Cuevas, Nieves, Mila y María. Desde que llegué allí no he parado de aprender y no sólo a nivel académico. Siempre me he considerado muy afortunada por formar parte de vuestro equipo.

A Irene Cuevas. Tenía que hacer un apartado especial. Aún conservo aquel correo en el que siendo estudiante del máster te pedía si podía ir al hospital a mirar como lo hacíais. A partir de ahí mi vida dio un giro. Siempre te agradeceré esa oportunidad que me diste de estar ahí y aprender de ti.

A todos los becarios que como un día yo, habéis pasado por el laboratorio a hacer prácticas. Especialmente a Alba, Ana y Aila. Estoy muy orgullosa de todas vosotras.

A Manolo Mata, porque me diste el correo de Daniel Monleón y ahí empezó mi aventura con la resonancia.

A Margarita Castro, Marga. Por hacerme tan fácil toda la burocracia y ahorrarme tantos viajes a Alicante. Gracias por esa dulzura con la que me has tratado siempre.

Al personal de la Fundación del CHGUV, especialmente a Pilar Bañuls. Os pedimos ayuda con las diluciones y no dudasteis un minuto en ofrecérnosla.

A Miguel A. Conesa, mi profesor de ciencias del cole. Gracias por contagiarme ese amor por la ciencia. Por esa forma tan diferente de darnos clase y despertarnos la curiosidad. Ojalá mi hija tenga la suerte que yo tuve de tener un profesor así.

A Miguel A. Medina, mi profesor de bioquímica de la universidad. Porque al final superé esa relación de amor-odio con la bioquímica y ha acabado siendo de amor.

A mis compañeras y amigas de Quirón Valencia. Siempre interesándoos por cómo iba la tesis.

A Mónica García Simón porque aunque nos conocemos desde hace poco, no has parado de mandarme ánimos. A ti también te queda poquito.

A todos mis amigos, por teneros.

Gracias a todos por estar ahí.





ÍNDICE.





Índice

| | |
|--|----------|
| 1. Introducción | 3 |
| 1.1. Epidemiología de la infertilidad | 3 |
| 1.2. Embriogénesis | 7 |
| 1.2.1. Desarrollo embrionario | |
| 1.2.2. Metabolismo embrionario | |
| 1.2.2.1. Medios de cultivo en FIV | |
| 1.2.2.2. Pasado y presente de los medios de cultivo | |
| 1.3. Análisis de la problemática del embarazo múltiple | 16 |
| 1.3.1. Clasificación del embarazo múltiple | |
| 1.3.2. Riesgos asociados al embarazo múltiple | |
| 1.3.3. Consecuencias socio sanitarias | |
| 1.4. Criterios de selección en Embriología | 23 |
| 1.5. Criterios morfológicos de selección en Embriología | 23 |
| 1.5.1. Valoración morfológica del ovocito | |
| 1.5.2. Valoración morfológica del cigoto | |
| 1.5.3. Valoración morfológica del embrión | |
| 1.5.4. Valoración morfológica de la mórula y el blastocisto | |
| 1.5.5. Morfocinética como herramienta de mejora de la valoración morfológica | |
| 1.5.6. Problemática de la selección morfológica | |
| 1.6. Criterios no morfológicos de selección en Embriología | 42 |
| 1.6.1. Genómica | |

| | |
|--|-----------|
| 1.6.2. Proteómica | |
| 1.6.3. Transcriptómica | |
| 1.6.4. Actividad mitocondrial y análisis de la respiración | |
| 1.6.5. Análisis de carbohidratos | |
| 1.6.6. Recambio aminoacídico | |
| 1.6.7. Metabolómica | |
| 1.7. Metabolómica y Medicina | 54 |
| 1.7.1. Plataformas analíticas | |
| 1.7.2. Resonancia Magnética Nuclear | |
| 1.7.2.1. Fundamentos físicos de RMN | |
| 1.7.2.2. El espectrómetro de RMN | |
| 1.7.2.3. Resonancia Magnética Nuclear de ¹ H. | |
| 1.7.3. Técnicas exploratorias de datos. Análisis multivariable | |
| 1.7.4. Ventajas del empleo de la RMN | |
| 1.8. Modelos animales en investigación biomédica. | 66 |
| 1.9. La Metabolómica en el estudio de la viabilidad embrionaria. | 67 |
| 2. Objetivos | 73 |
| 3. Material y métodos | 77 |
| 3.1. Población de estudio | 77 |

| | |
|---|-----|
| 3.2. Procedimiento de obtención y recogida del medio de cultivo embrionario | 78 |
| 3.2.1. Estimulación ovárica controlada | |
| 3.2.2. Punción aspiración folicular | |
| 3.2.3. Fecundación <i>in vitro</i> | |
| 3.2.4. Cultivo embrionario | |
| 3.2.5. Recogida del medio de cultivo | |
| 3.3. Adquisición del perfil metabólico mediante RMN | 94 |
| 3.3.1. Preparación de la muestra para la medida de RMN | |
| 3.3.2. Protocolo y adquisición del espectro de RMN | |
| 3.4. Procesado de los espectros y análisis multivariable de los datos | 97 |
| 3.5. Validación mediante embriones de ratón como modelo animal | 98 |
| 3.6. Tratamiento estadístico de los datos | 102 |
| 4. Resultados | 107 |
| 4.1. Datos demográficos y clínicos | 107 |
| 4.2. Muestras | 115 |
| 4.3. Obtención del perfil metabólico | 115 |
| 4.3.1. Análisis mediante RMN del medio de cultivo de embriones humanos | |
| 4.3.2. Análisis del espectro de RMN del medio de cultivo de embriones humanos mediante métodos quimiométricos | |
| 4.3.3. Validación cruzada | |

4.4. Empleo de embriones de ratón como modelo animal para la validación del biomarcador obtenido a partir del análisis mediante RMN del medio de cultivo embrionario. 130

4.4.1. Evolución de los embriones de ratón a lo largo del cultivo con los distintos metabolitos y concentraciones.

4.4.1.1. Grupo control

4.4.1.2. Glutamato 1 Mm

4.4.1.3. Glutamato 0.1 mM

4.4.1.4. Butirato 1 mM

4.4.1.5. Butirato 0.1 mM

4.4.1.6. Arginina 1 mM

4.4.1.7. Arginina 0.1 mM

4.4.2. Análisis mediante RMN del medio de cultivo de embriones de ratón

5. Discusión. 171

6. Conclusiones. 191

7. Bibliografía. 195

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.





Índice de Tablas

Tabla 1. Gestaciones y multiplicidad de partos por embrión transferido.

Tabla 2. Sumario de las características clínicas de las pacientes.

Tabla 3. Sumario de las características morfológicas de los embriones humanos.

Tabla 4. Regiones espectrales con mayor contribución al modelo discriminante.

Tabla 5. Regiones espectrales con contribución importante al modelo discriminante.

Tabla 6. Resultados de la validación cruzada.

Tabla 7. Valoración morfológica tras 24 horas de los embriones de ratón y sus puntuaciones tras la progresión.

Tabla 8. Valoración morfológica de los embriones de ratón tras 96 horas.

Tabla 9. Puntuaciones obtenidas por los grupos de embriones tras 96 horas en cultivo.

Tabla 10. Puntuaciones de los grupos de embriones en porcentajes a las 96 horas de cultivo.

Tabla 11. Resultados del test de Fisher tras comparar los distintos grupos con el grupo control.

Tabla 12. Concentraciones relativas de los metabolitos identificados tras el análisis del medio de cultivo de los embriones suplementado con butirato 0,1mM.

Tabla 13. Concentraciones relativas de los metabolitos identificados tras el análisis del medio de cultivo de los embriones suplementado con glutamato 0,1mM.

Tabla 14. Concentraciones relativas de los metabolitos identificados tras el análisis del medio de cultivo de los embriones suplementado con arginina 0,1mM.

Tabla 15. Resumen de metabolitos cuyo valor promedio destaca sobre el grupo.



Índice de Figuras

Figura 1. Regiones del blastocisto expandido.

Figura 2. Metabolismo del ovocito fecundado.

Figura 3. Glicolisis anaerobia. Efecto Warburg.

Figura 4. Evolución en la multiplicidad de partos.

Figura 5. Evolución de la política de transferencia embrionaria.

Figura 6. Clasificación de la gestación gemelar.

Figura 7. Ovocito en estadio madurativo de metafase II.

Figura 8. Ovocitos con granulosa central.

Figura 9. Diferencias entre ovocito con REL y vacuola.

Figura 10. Ovocitos con anomalías en la zona pelúcida.

Figura 11. A Ovocito con espacio perivitelino aumentado. B Ovocito con CP gigante.

Figura 12. A Cigoto con dos pronúcleos (Fecundación correcta). B Cigoto con tres pronúcleos.

Figura 13. Esquemas de gradación pronuclear.

Figura 14. Embriones en día 2 y 3 de cultivo.

Figura 15. Embriones con grado de fragmentación entre 11-25%.

Figura 16. Relación entre el tamaño de las blastómeras y el pronóstico.

Figura 17. Embriones multinucleados.

Figura 18. Embrión compactado y embrión con signos de adhesión celular temprana.

Figura 19. Embriones compactados en estadio de mórula.

Figura 20. Morfología del blastocisto.

Figura 21. *Microarray* Genechip®.

Figura 22. Movimientos orbital, espín y de precesión.

Figura 23. Estados de espín.

Figura 24. Proceso de formación del espectro. Aplicación de la FT para pasar de FID al espectro de RMN.

Figura 25. Esquema de espectrómetro de RMN.

Figura 26. Representación del gráfico de scores de un análisis PCA del análisis por RMN de suero de individuos controles (B) y después de la administración de un fármaco (T).

Figura 27. CCCO y ovocito tras ser decumulado.

Figura 28. Capacitación espermática mediante gradientes de densidad.

Figura 29. Grados de madurez ovocitarios.

Figura 30. Técnica de capacitado seminal *swim up*.

Figura 31. Microinyección. Formación del cono.

Figura 32. Ovocito fecundado.

Figura 33. Clasificación en base a criterios morfológicos ASEBIR.

Figura 34. Capilares de 1 mm de diámetro.

Figura 35. Equipo de RMN Bruker Avance 600MHz equipado con robot SampleJet.

Figura 36. Soporte de vitrificación de embriones de ratón con polímero de algodón.

Figura 37. Microtubos con numeración y coloración específica para el estudio.

Figura 38. Espectro de ^1H RMN representativo de las muestras de medio de cultivo embrionario donde se señalan las dos grandes regiones en que se divide el espectro (alifática y aromática).

Figura 39. Espectro de ^1H RMN representativo (parte alifática) de las muestras de medio de cultivo embrionario para un caso negativo de implantación (rojo) y otro positivo (verde).

Figura 40. Detalle ampliado de la zona aromática del espectro de ^1H RMN representativo de las muestras de medio de cultivo embrionario para un caso negativo de implantación (rojo) y otro positivo (verde).

Figura 41. Secuencia TOCSY 2D de correlación $\text{H}_1\text{-H}_1$ utilizada en la asignación e identificación de picos.

Figura 42. Diagrama de puntuaciones del PCA.

Figura 43. Diagrama de cargas del PCA de la región alifática.

Figura 44. Diagrama de puntuaciones del análisis PLS-DA.

Figura 45. Diagrama de cargas del PLS-DA completo

Figura 46. Curva ROC obtenida de la validación cruzada del modelo PLS-DA

Figura 47. Imágenes de microscopio invertido del desarrollo de embriones de ratón del grupo control cultivados en medio sin suplementar.

Figura 48. Imágenes de microscopio invertido del desarrollo de embriones de ratón del grupo de medio de cultivo suplementado con glutamato 1mM.

Figura 49. Imágenes de microscopio invertido del desarrollo de embriones de ratón en el grupo de medio de cultivo glutamato 0,1mM.

Figura 50. Imágenes de microscopio invertido del desarrollo de embriones de ratón en el grupo de medio de cultivo butirato 1mM.

Figura 51. Imágenes de microscopio invertido del desarrollo de embriones de ratón en el grupo de medio de cultivo butirato 0,1mM.

Figura 52. Imágenes de microscopio invertido del desarrollo de embriones de ratón en el grupo de medio de cultivo arginina 1mM.

Figura 53. Imágenes de microscopio invertido del desarrollo de embriones de ratón en el grupo de medio de cultivo arginina 0,1mM.

Figura 54. Calidad de los embriones de ratón en los distintos grupos tras 96 horas de cultivo.

Figura 55. Concentraciones relativas de metabolitos embriones cultivados hasta día 2 en medio suplementado con butirato 0,1 Mm frente al control.

Figura 56. Concentraciones relativas de metabolitos de los embriones cultivados en día 5 en medio suplementado con butirato 0,1 mM frente a su correspondiente control.

Figura 57. Representación gráfica de la diferencia de composición metabólica promedio entre el medio suplementado con butirato 0,1mm de día 5 y el de día 2.

Figura 58. Concentraciones relativas de metabolitos embriones cultivados hasta día 2 en medio suplementado con glutamato 0,1 Mm frente al control.

Figura 59. Concentraciones relativas de metabolitos de los embriones cultivados en día 5 en medio suplementado con glutamato 0,1 mM frente a su correspondiente control.

Figura 60. Representación gráfica de la diferencia de composición metabólica promedio entre el medio suplementado con glutamato 0,1mm de día 5 y el de día 2.

Figura 61. Concentraciones relativas de metabolitos embriones cultivados hasta día 2 en medio suplementado con arginina 0,1 Mm frente al control.

Figura 62. Concentraciones relativas de metabolitos de los embriones cultivados en día 5 en medio suplementado con arginina 0,1 mM frente a su correspondiente control.

Figura 63. Representación gráfica de la diferencia de composición metabólica promedio entre el medio suplementado con arginina 0,1mm de día 5 y el de día 2.

ABREVIATURAS.





Abreviaturas.

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AMPc: Adenosín monofosfato cíclico

ANOVA: Análisis de la varianza

ARN: Ácido ribonucleico

ASEBIR: Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción

ATPasas: Adenosín trifosfatasas

AUC: *Area under the curve* o Área bajo la curva

CHGUV: Consorcio Hospital General Universitario de Valencia

CIR: Crecimiento intrauterino restringido

CP: Corpúsculo polar

CXCL13: Quimiocina CXC ligando 13

DGP: Diagnóstico Genético Preimplantacional

EOD: Esterilidad de origen desconocido

ESHRE: *European Society of Human Reproduction and Embriology*

FID: Caída libre de la inducción, *Free Induction Decay*

FIGO: Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia

FISH: Hibridación fluorescente *in situ*

FIV: Fecundación *in vitro*

FSH: Hormona folículo estimulante

FT: Transformada de Fourier

GC-MS: Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

GM-CSF: Factor estimulante de colonias de Granulocitos y Macrófagos

GnRH: Hormona liberadora de gonadotropina

hCG: Gonadotropina coriónica humana

HLA-G: Antígeno de histocompatibilidad G

HOXA10: Homeobox A10

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia

ICS: *International Chemometrics Society*

ICSI: Inyección intracitoplasmática de espermatozoides

IL-10: Interleukina 10

IR: Infrarroja

LC-MS: Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas

LH: Hormona luteinizante

LOOCV: *Leave-one-out cross-validation*

MAP-K: Proteín kinasas activadas por mitógenos

MCI: Masa celular interna

MEA: *Mouse embryo assay*

MIP 1 β : Proteína inflamatoria de macrófagos

MS: Espectrometría de masas

MSP α : Mouse Sp

mtDNA: ADN mitocondrial

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida

NIR: Infrarroja cercana

NO: Óxido nítrico.

OMS: Organización Mundial de la Salud

OT: Obstrucción tubárica

PAF: Factor 1-alkilglicerofosfolina O-acetiltransferasa

PC: *Principal components*

PCA: Análisis de componentes principales

PFK: Fosfofructokinasa

PLS-DA: Análisis Discriminante por Mínimos Cuadrados Parciales, *Partial Least Squares Discriminant Analysis*.

ppm: Partes por millón

REL: Retículo endoplasmático liso

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

ROC: *Receiver operating characteristic* o Característica operativa del receptor

RT-PCRq: PCR cuantitativa a tiempo real

SCF: Complejo *S-box*

SEF: Sociedad Española de Fertilidad

SEGO: Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia

SET: Transferencia única embrionaria

SGD: Defectos genéticos simples

SGP: Screening Genético Preimplantacional

SNPs: Polimorfismos de un solo nucleótido

SOP: Síndrome de ovarios poliquísticos

TMS: Tetrametilsilano

TNF: Factor de necrosis tumoral

TOCSY 2D: *Two dimensional Total Correlation Spectroscopy*

TRA: Técnicas de Reproducción Asistida

TRAILR3: Inductor de apoptosis relacionado con TNF ligando receptor 3

UCI: Unidad de Cuidados Intensivos



INTRODUCCIÓN.





1. Introducción.

La motivación principal de esta tesis es contribuir a la mejora de los criterios de selección embrionarios actuales que se emplean en reproducción asistida.

Para ello se propone la búsqueda de un perfil metabólico del embrión antes de su implantación a través de técnicas de alta resolución que permitan obtener biomarcadores relacionados con la viabilidad embrionaria.

De esta forma este primer capítulo introduce la infertilidad y toda la problemática asociada para seguir con conceptos básicos de desarrollo embrionario. A continuación se tratarán los criterios de selección en Embriología tanto morfológicos como no morfológicos y nos centraremos en la Metabolómica puesto que es el criterio de selección a estudio en esta tesis. La Metabolómica necesita plataformas de análisis para poder llevarse a cabo. Por ello en este capítulo se dará un repaso a las opciones disponibles y nos centraremos en la técnica seleccionada, la Resonancia Magnética Nuclear. Por último y para finalizar la introducción se tratará de forma breve el empleo de un modelo animal en investigación biomédica ya que hemos empleado el ratón como modelo para la validación de los resultados obtenidos en esta tesis.

1.1. Epidemiología de la esterilidad.

La esterilidad es la incapacidad de concebir, y a pesar de no ser vital para la persona, sí lo es para la especie y siempre ha ocupado un importante lugar en la Sociedad. La media de edad del primer embarazo cada vez es mayor y actualmente el elevado porcentaje de parejas que no consiguen gestación tras un año de relaciones sexuales no protegidas convierte el problema de la esterilidad en un verdadero problema de Salud Pública.

Según datos del registro europeo realizado por la *European Society of Human Reproduction and Embryology* (ESHRE) una de cada seis parejas en el Mundo experimenta algún problema de esterilidad a lo largo de su vida reproductiva. La prevalencia de esterilidad se estima en alrededor del

9% en mujeres con edades comprendidas entre los 20 y los 44 años. (*Assisted reproductive technology and intrauterine inseminations in Europe, 2011: results generated from European registers by ESHRE, 2014*)

La causa más común de esterilidad es el aumento de edad a la que la mujer busca gestación, seguida de causas fisiológicas masculinas, causas femeninas, causas mixtas a partes iguales y 10-20% sin causa conocida (Matorras, 2008).

Se estima que desde el nacimiento de Louise Brown en 1978 mediante fecundación *in vitro* (FIV) han nacido más de 5 millones de niños en todo el Mundo. Europa está en cabeza del Mundo en ciclos de técnicas de reproducción asistida (TRA) iniciados, aproximadamente el 55%. En 2011, último año del que se dispone de datos, se realizaron 588.629 en 33 países europeos (*Assisted reproductive technology and intrauterine inseminations in Europe, 2011: results generated from European registers by ESHRE, 2014*).

Las tasas de embarazo en 2011 por embrión transferido en Europa fueron del 33.2% tras FIV, 31.6% tras inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), 23.4% tras transferencia de embriones congelados y 47.5% tras donación de ovocitos. En mujeres menores de 35 años esas tasas aumentan.

A pesar del creciente uso de las TRA, aproximadamente 2 de cada 3 ciclos fracasa y 8 de cada 10 embriones transferidos no implantan (SEF 2013). Este fracaso en las TRA parece debido en parte a nuestra incapacidad de determinar el embrión o embriones con mayor potencial de implantación y por tanto de conseguir gestación.

Para minimizar estos fracasos y aumentar las tasas de embarazo los centros de reproducción asistida han optado por transferir varios embriones, asumiendo el riesgo de embarazos múltiples.

En Europa la tasa de parto múltiple ha decrecido desde 2000 de 26.9% a 19.4% en 2011 comparado con el 30% en Estados Unidos. Este descenso se debe principalmente al número de embriones transferidos en TRA. Existen muchas diferencias entre países en el número de embriones transferidos. Suecia es el país con menor tasa de parto múltiple en el Mundo debido a que en la mayoría de los casos se transfiere un solo embrión. Pero aunque la tendencia es a transferir pocos embriones, con un número medio de 1.75 por transferencia, se sigue estando alejado de la deseable transferencia de un único embrión.

En España según el registro de la Sociedad Española de Fertilidad (SEF) de 2012, más de 25000 pacientes se sometieron a TRA, concretamente FIV/ICSI. Al 72% de estas pacientes les fueron transferidos 2 embriones, a un 8.4% de ellas se transfirieron 3 embriones y al 19.6% un solo embrión. Todo ello para conseguir una tasa de gestación por ciclo de un 27.5% y por transferencia de un 37.7%. Del total de ciclos en los que se transfirieron 2 embriones un 26,5% acabó en parto gemelar. Y en el caso de la transferencia de 3 embriones un 26.8% acabó en parto gemelar y un 3,5% en parto triple (véase Tabla 1) (Registro SEF 2012). El artículo 3.2 de la Ley 14/2006, de 26 de mayo, sobre técnicas de reproducción humana asistida cita textualmente: *'En el caso de la fecundación in vitro y técnicas afines, sólo se autoriza la transferencia de un máximo de tres preembriones en cada mujer en cada ciclo reproductivo'*.

| Ovocitos propios: Gestaciones y multiplicidad de los partos en función del nº de embriones transferidos | | | | |
|---|-----------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------|
| | 1 embrión transferido | 2 embriones transferidos | 3 embriones transferidos | Total |
| Total de transferencias | 5.042 (19,6%) | 18.505 (72,0%) | 2.149 (8,4%) | 25.696 (100,0%) |
| Total de transferencias electivas | 1.396 (11,9%) | 10.361 (88,1%) | - | 11.757 (100,0%) |
| Gestaciones con 1 saco | 1.174 (98,9%) | 5.642 (73,2%) | 545 (69,8%) | 7.361 (76,1%) |
| Gestaciones con 2 sacos | 13 (1,1%) | 2.046 (26,5%) | 209 (26,8%) | 2.268 (23,4%) |
| Gestaciones con ≥ 3 sacos | 0 (0,0%) | 21 (0,3%) | 27 (3,5%) | 48 (0,5%) |
| Total gestaciones | 1.187 (100,0%) | 7.709 (100,0%) | 781 (100,0%) | 9.677 (100,0%) |

| Ovocitos propios: Gestaciones y multiplicidad de los partos en función del nº de embriones transferidos | | | | |
|---|-----------------------|--------------------------|--------------------------|----------------|
| | 1 embrión transferido | 2 embriones transferidos | 3 embriones transferidos | Total |
| % de implantación | 23,5% | 26,4% | 16,2% | 24,8% |
| % gestación por transferencia | 23,5% | 41,7% | 36,3% | 37,7% |
| | 1 embrión transferido | 2 embriones transferidos | 3 embriones transferidos | Total |
| Partos con feto único | 669 (98,7%) | 3.434 (75,5%) | 331 (70,3%) | 4.434 (77,8%) |
| Partos gemelares | 9 (1,3%) | 1.107 (24,3%) | 130 (27,6%) | 1.246 (21,9%) |
| Partos triples o más | 0 (0,0%) | 10 (0,2%) | 10 (2,1%) | 20 (0,4%) |
| Total partos | 678 (100,0%) | 4.551 (100,0%) | 471 (100,0%) | 5.700 (100,0%) |
| Ectópicos y heterotópicos | 25 (2,7%) | 158 (2,7%) | 14 (2,2%) | 197 (2,6%) |
| Abortos | 223 (24,1%) | 1.242 (20,9%) | 145 (23,0%) | 1.610 (21,4%) |
| Gestaciones con evolución desconocida | 261 (22,0%) | 1.758 (22,8%) | 151 (19,3%) | 2.170 (22,4%) |

Tabla 1. Gestaciones y multiplicidad de partos por embrión transferido. Adaptado de Registro de la SEF de 2012.

1.2. Embriogénesis.

1.2.1. Desarrollo embrionario.

El desarrollo humano comienza con la fecundación que se inicia con el contacto entre un ovocito secundario y un espermatozoide y termina con la fusión de los núcleos materno y paterno. Ocurre en una serie de etapas que comienzan con el paso del espermatozoide a través de la corona radiata que rodea la zona pelúcida del ovocito. Esta unión hace que el espermatozoide libere el contenido del interior del acrosoma, la hialuronidasa, que dispersa las células de la corona y junto con los movimientos ejercidos por la cola consigue penetrar en la corona. Una vez se encuentra en el interior tiene lugar la reacción acrosómica inducida por un complejo formado por una glicoproteína, una proteína progesterona-dependiente por parte de las células del cúmulo, y un péptido activo como componente de la zona pelúcida secretado por parte del ovocito. Se producen cambios en la composición de la capa de glicoproteínas y el paso masivo de calcio a través de la membrana que acompaña una entrada de sodio y una salida de protones que eleva el pH intracelular. En la siguiente fase tiene lugar la fusión de las membranas celulares del ovocito y espermatozoide. Los receptores del espermatozoide (lectinas) se unen a las integrinas del ovocito.

Para evitar la entrada de más de un espermatozoide, fenómeno conocido como polispermia, el ovocito dispara un mecanismo de bloqueo rápido que consiste en cambiar el potencial de membrana del ovocito pasando de -70 mV a $+10$ mV, y uno lento que libera calcio haciendo que los gránulos corticales se fusionen con la membrana plasmática del ovocito.

A continuación el ovocito culmina su maduración con la segunda división meiótica que se manifiesta morfológicamente con la extrusión del segundo corpúsculo polar. Se produce la descondensación de los cromosomas maternos y el núcleo femenino pasa a designarse pronúcleo femenino. Por otro lado el núcleo masculino crece en el citoplasma del ovocito para formar el pronúcleo masculino gracias a la descondensación de la cabeza del espermatozoide. El pronúcleo masculino aparece en primer lugar en posición central y a continuación el femenino cerca del segundo corpúsculo polar. Ahora los pronúcleos se acercan y aumentan de tamaño y se fusionarán produciendo la singamia.

En ella además se condensan los cromosomas y se acomodan para dar la división mitótica. El ovocito fecundado es unicelular, y pasa a llamarse cigoto. Su contenido es de 46 cromosomas, 23 en cada pronúcleo.

El desarrollo embrionario se inicia mediante la estimulación del cigoto a experimentar una serie de divisiones mitóticas sucesivas conocidas como *cleavage* o segmentación. En la primera división el cigoto se divide en dos células o blastómeras. El citoplasma se divide en dos produciendo un estrangulamiento. Rápidamente se divide para formar cuatro células, ocho células y así sucesivamente hasta alcanzar aproximadamente dieciséis células formando lo que se conoce como mórula alrededor del cuarto día postfecundación. Justo antes de formar la mórula, al tercer día, es cuando el genoma embrionario empieza a ser funcionalmente activo (Torelló *et al.*, 2011).

Como resultado de la segmentación el embrión va cambiando su aspecto, pasando de ser una estructura ordenada de blastómeras en los tres primeros días de desarrollo a una masa donde las células son indistinguibles, la mórula, una vez se está produciendo lo que se conoce como compactación. Para ello las blastómeras se unen a través de uniones tipo *gap*, *adherens*, *tight junctions* y desmosomas. Cada una juega un papel fundamental en la comunicación celular, adhesión y diferenciación.

La primera evidencia de esta compactación se refleja con la polarización de las blastómeras de la periferia y la reorganización de componentes citoplásmicos. Con este proceso las células pierden su totipotencia como resultado de sus interacciones con otras y se cree que esto marca el principio de la transcripción de ADN embrionario.

Tras la compactación, el embrión se expande y comienza a formar espacios que se llenan de fluido entre las blastómeras centrales constituyendo el blastocele. Es un estadio esencial de desarrollo donde se diferencia el trofoectodermo y la masa celular interna (Figura 1). El aumento de la superficie de contacto entre células durante la compactación, hace que las células situadas en el exterior formen el trofoectodermo. La cavitación, que es como se conoce a esta etapa, se caracteriza por el aumento de fluido en el blastocele transportado por células del trofoectodermo. Se produce transporte de sodio a través de células epiteliales del trofoectodermo que difunde por canales apicales que funcionan con la ayuda de adenosín trifosfatasa (ATPasas).

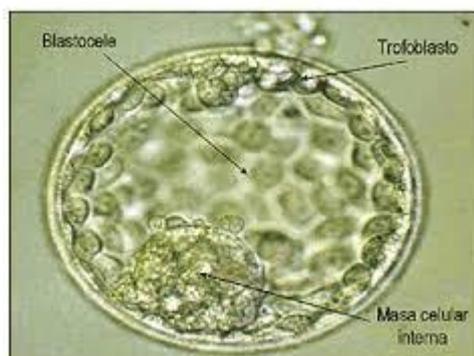


Figura 1. Regiones del blastocisto expandido.

Durante la formación del blastocisto las células del trofoectodermo se vuelven elípticas y exhiben polarización, mientras que la masa celular interna permanece morfológicamente indiferenciada. La posición y el desarrollo del trofoectodermo y la masa celular interna están marcados desde la fecundación. Por lo tanto, tenemos por un lado una estrecha capa de células que constituye el trofoblasto y que constituirá la futura placenta y por otro la masa celular interna en el centro del blastocisto, que dará lugar al embrión.

1.2.2. Metabolismo embrionario

La regulación de la producción energética es fundamental para la supervivencia y la propagación de cualquier célula. (Gardner *et al.*, 2013).

Una alteración en una ruta metabólica de un nutriente aunque sea durante poco tiempo puede desembocar en un cambio importante que incluso produzca el desarrollo inadecuado de un embrión. Por lo tanto, es evidente que el análisis del metabolismo embrionario es una buena forma de evaluar la salud embrionaria y predecir la viabilidad.

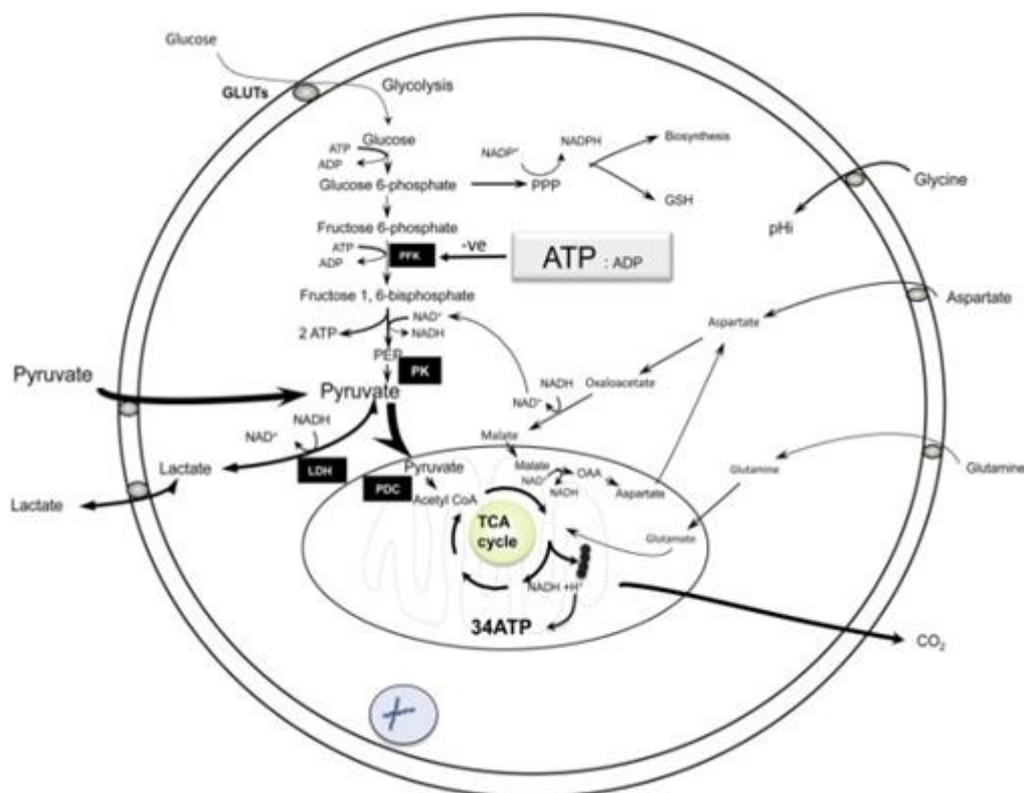


Figura 2. Metabolismo del ovocito fecundado. Adaptado de Gardner, 2013

Un ovocito fecundado consume poco oxígeno (Trimarchi *et al.*, 2000) y tiene una capacidad limitada de usar la glucosa como fuente de energía (Biggers *et al.*, 1967) (Figura 2). De hecho la actividad glicolítica está restringida tanto en este momento como en las primeras etapas de desarrollo por una regulación alostérica de la enzima fosfofructokinasa (PFK) a causa del alto ratio ATP/ADP (Leese *et al.*, 1984). Ese ratio es consecuencia de la baja demanda energética en estas etapas, reflejando un estado de inactividad por parte del ovocito fecundado del que deriva. En ausencia de aminoácidos la energía proviene de la oxidación del piruvato y del lactato. En presencia de

aminoácidos, el embrión puede usar el lactato como fuente de energía a través de la conversión en piruvato (Lane *et al.*, 2005).

Con el aumento de las mitosis en las divisiones celulares y la biosíntesis, después de la activación del genoma embrionario la necesidad de energía aumenta considerablemente y se produce un descenso en el ratio ATP/ADP. El ATP se consume rápidamente y se activa la PFK facilitando el flujo de glucosa a través de la glicolisis.

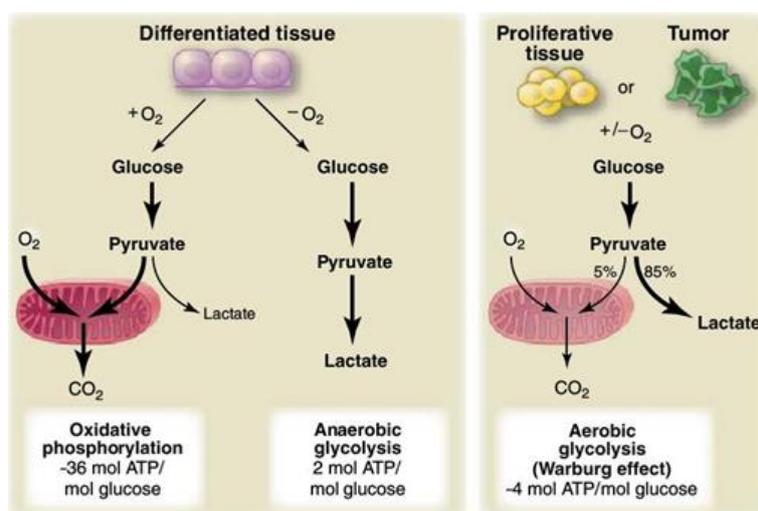


Figura 3. Glicolisis anaerobia. Efecto Warburg. Adaptado de [http:// sciencemarg.org](http://sciencemarg.org)

A pesar de que el blastocisto consume mucho más oxígeno que el embrión durante la segmentación (Mills *et al.*, 1967; Thompson *et al.*, 1996; Houghton *et al.*, 1996), prefiere convertir el 50% de la glucosa en lactato en presencia de oxígeno para completar la oxidación a glucosa. Este fenómeno se conoce como “glicolisis aeróbica”, que es característico del cáncer y la proliferación celular, también llamado efecto *Warburg* (Vander Hiden *et al.*, 2009; Warburg *et al.*, 1956) (Figura 3). La glucosa además de fuente de energía es necesaria para sintetizar triacilgliceroles, fosfolípidos y como precursor de azúcares complejos. El metabolismo de la glucosa a través de la vía de la pentosa fosfato necesita nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida (NADPH). Este además es necesario para la metilación del ácido desoxirribonucleico (ADN) y la reducción del glutatión intracelular, un importante antioxidante en el embrión.

Fuentes de energía alternativas a las presentes en los medios de cultivo (glucosa, piruvato y lactato) incluyen ácidos grasos y aminoácidos. Los ácidos grasos juegan un rol esencial en el desarrollo embrionario de muchas especies, aunque poco se sabe todavía a cerca de su impacto en el metabolismo embrionario. Sin embargo, los aminoácidos tienen efectos beneficiosos demostrados en el cultivo embrionario. Son importantes precursores biosintéticos, tampones del pH intracelular, antioxidantes y fuentes de energía que además se encuentran presentes de forma natural en la trompa y en los fluidos uterinos.

Por estos motivos su inclusión en los medios de cultivo ha demostrado tener un efecto beneficioso para el desarrollo embrionario temprano y por ello se han usado en múltiples estudios como biomarcadores no invasivos para predecir la viabilidad embrionaria.

Sin embargo, la búsqueda de biomarcadores no es sencilla y requiere años de validaciones antes de su aplicación. Los biomarcadores además deben reunir una serie de características para poder ser útiles. Deben ser fácilmente medibles en un fluido biológico, predictivos, económicos y sensibles al punto de ser capaz de detectar cambios sutiles.

1.2.2.1. Los medios de cultivo en FIV

Los avances en el mundo de la reproducción asistida en las últimas décadas han sido notables. Las tasas de éxito en las TRA, concretamente en FIV son tan elevadas que han llevado a algunos en la comunidad científica a cuestionarse si son mejores que la propia naturaleza (Vatja *et al.* 2010). Una parte importante de ese éxito se puede atribuir a la gran mejora en las condiciones de cultivo. Hasta los años 80 los embriólogos fabricaban los medios de cultivo de forma casera. Esto llevaba consigo unos limitados controles de calidad. El primer medio de cultivo comercial para FIV vio la luz de la mano de Medicult[®] (Dinamarca) y desde entonces no han dejado de producirse distintos medios de cultivo específicos para cada técnica. La comercialización de los medios de cultivo ha creado un mercado de gran competencia. En comparación con los medios de producción casera, están fabricados pasando estrictos controles de calidad, minimizando las diferencias entre lotes y la contaminación (Karamalegos y Bolton, 1999; Quinn, 2004). Desde 2013 todos los medios de cultivo producidos en la Unión Europea (UE) deben incluir marcado CE (*Conformité Europééne*) y se testa su embriotoxicidad pasando ensayos de tipo MEA (*Mouse embryo assay*). El marcado CE fue creado en

1993 e indica que el fabricante cumple los requisitos que marca la UE. Los medios de cultivo para FIV fueron clasificados como recursos médicos de clase III por la UE bajo la directiva 93/42/EEC, ya que son indirectamente usados para seres humanos. Fuera de Europa, la *Food and Drug Administration* (FDA) clasifica los medios de cultivo para FIV como recursos médicos de clase II por estar en contacto directo con gametos humanos o embriones.

La importancia de los medios de cultivo en los resultados de la FIV es cada vez mayor. Existe evidencia de la importancia de las condiciones de cultivo no solo para el resultado de la FIV sino también su impacto en el desarrollo pre y postimplantación y posiblemente la salud del recién nacido (Dumoulin *et al.*, 2010; Nelissen *et al.*, 2013; El Haij y Haaf, 2013; Mantikou *et al.*, 2013).

1.2.2.2. Pasado y presente de los medios de cultivo

Un medio de cultivo es una solución que cuenta con los nutrientes necesarios para permitir, en condiciones favorables de pH y temperatura, el crecimiento de virus, microorganismos, células o tejidos.

Históricamente, ha sido habitual el uso de medio de cultivo que permitiese el cultivo de embriones durante 2 o 3 días hasta alcanzar 4 u 8 células, momento en el que eran transferidos a la paciente (Biggers *et al.*, 2003).

Edwards y colaboradores en 1970 cultivaron *in vitro* ovocitos humanos obtenidos mediante laparoscopia en un medio con solución de Tyrode, albúmina sérica bovina (BSA), penicilina, piruvato sódico, rojo fenol y bicarbonato. Los embriones del primer nacimiento mediante FIV del Mundo fueron cultivados en solución salina simple suplementada con piruvato y suero de la paciente de fabricación casera.

No fue hasta 1984 cuando el equipo de Ménézo cuestionó la necesidad de añadir al medio de cultivo un suero completo y formuló el medio B3 que contenía albúmina y aminoácidos sin hallar efectos negativos sobre el desarrollo de los embriones o la tasa de embarazo. Este medio era una modificación del anteriormente formulado medio B2 diseñado para embriones bovinos basado en la composición de los fluidos reproductivos y el suero (Ménézo, 1976). Los grupos de Quinn y Ménézo crearon así los cimientos para la comercialización de los medios de cultivo especializados para FIV.

Un capítulo importante en la historia del cultivo de embriones es el cocultivo de células somáticas embrionarias. Utilizando embriones de ratón cultivados con células de las trompas fueron capaces de completar su desarrollo *in vitro* hasta estadio de cigoto (Biggers *et al.*, 1962). El cocultivo de embriones humanos con fibroblastos uterinos fetales bovinos o células tubáricas humanas parece mejorar el cultivo convencional, mejorando la morfología embrionaria, la implantación y la tasa de embarazo (Bongso *et al.*, 1989; Wiemer *et al.*, 1989). El metaanálisis más reciente sobre este tema encontró el cocultivo beneficioso para las tasas de implantación, las tasas de embarazo clínico y el embarazo evolutivo (Kattal *et al.*, 2008).

En las primeras décadas de la FIV, la mayoría de ciclos se realizaban con transferencias en día 2 debido a que los medios eran pobres y no podían soportar el desarrollo del embrión hasta estadio de blastocisto. Pero la actividad investigadora continuó con el objetivo de encontrar la formulación ideal que hiciese de la transferencia de embriones en estadio de blastocisto una opción posible (Gardner and Lane, 1997). Finalmente la búsqueda siguió dos estrategias: la llamada “vuelta a la naturaleza” y la “estrategia simple de optimización”. La primera estrategia estudia los fluidos reproductivos y en base a ello formula la composición de los medios. El ambiente que rodea al embrión cambia de forma natural a lo largo del tiempo que permanece en el sistema reproductivo. Gardner y colaboradores en 1996 recolectaron fluido tubárico y uterino en diferentes momentos del ciclo menstrual y demostraron el cambio cíclico en las concentraciones de lactato y glucosa. Esto contribuyó a la creación de los medios secuenciales G1 y G2 (Gardner *et al.*, 1996). Las necesidades metabólicas del embrión cambian en diferentes estadios como se ha demostrado con la glucosa y el piruvato y su efecto en el desarrollo (Conaghan *et al.*, 1993; Gardner, 1998). Sin embargo, este análisis es incompleto y laborioso, aporta información de importancia desconocida (Leese, 2002; Summers y Biggers, 2003). La estrategia simple usa un sofisticado software que valora los componentes y sus interacciones de manera simultánea (Spendley *et al.*, 1962; Lawitts y Biggers, 1991). Esto fue aplicado a embriones de ratón y dio lugar al medio KSOM (medio simple optimizado suplementado con potasio) cuya composición y concentración daba máxima respuesta pero no necesariamente los mejores resultados en cuanto a tasas de gestación (Summers y Biggers, 2003).

Todo ello hizo que desde 1997, el cultivo hasta blastocisto comenzara a extenderse. Una de las principales razones es que permite una selección embrionaria más robusta permitiendo la transferencia de menor número de embriones y reduciendo así la tasa de embarazos múltiples. Más

adelante, el empleo del DGP (diagnóstico genético preimplantacional) con biopsia de blastómera en día 3 de cultivo, hizo necesaria la extensión del cultivo hasta día 5 para tener a tiempo los resultados del análisis antes de la transferencia, por lo que el cultivo hasta el estadio de blastocisto se ha ido incrementando en los últimos años.

Se pueden emplear tres tipos de protocolos para el cultivo hasta estadio de blastocisto: protocolo de cultivo ininterrumpido empleando un solo medio (protocolo con medio único sin renovación), el mismo protocolo pero con renovación del medio al tercer día (protocolo con medio único con renovación) y protocolo de cultivo empleando dos medios distintos usados de forma secuencial (protocolo con medio secuencial).

Existe poca evidencia científica de que el empleo de protocolo secuencial sea mejor que el único. Los argumentos a favor se basan en que las necesidades energéticas del embrión cambian y que la glucosa podría tener un efecto inhibitor del desarrollo para el embrión en estadios tempranos. Por otro lado la acumulación de amonio producida por la rotura de la L-glutamina en solución acuosa podría tener también efectos no deseados. Además el papel de los aminoácidos en estadios preimplantacionales parece ser importante. También se desaconseja el empleo de ácido EtilenDiaminoTetra-acético (EDTA) en la formulación de los medios por su efecto inhibitor en el desarrollo de blastocistos. Pero hay que tener en cuenta que la mayoría de estudios en medios de cultivo humanos para FIV se han hecho empleando embriones de ratón.

Aunque en muchas ocasiones se ha manifestado que el medio secuencial es superior al medio único son muchos los autores que han comparado los tres tipos de protocolos sin hallar diferencias significativas entre ellos. Aunque los medios secuenciales son suficientes para soportar el desarrollo preimplantacional de un embrión de ratón hasta estadio de blastocisto no es necesario su empleo y pueden reemplazarse por un protocolo con medio único sin renovación del mismo. La única justificación de la renovación del medio sería para eliminar las sustancias tóxicas acumuladas en el medio y derivadas de los plásticos empleados. Hay que añadir además que otros equipos argumentan que los cambios en las condiciones de cultivo crean un estrés adicional al embrión. No existe una evidencia sólida a día de hoy sobre la superioridad del medio secuencial (Basile *et al.*, 2012; Quinn, 2012). Actualmente está adquiriendo popularidad el medio único gracias a la tecnología *time-lapse* cuyo fundamento no se entiende sin el uso de este tipo de medio.

1.3. Análisis del problema del embarazo múltiple.

Desde el comienzo de la utilización de las TRA la investigación en modelos animales y humanos no ha cesado. Pronto se vio que las tasas de gestación estaban relacionadas con el número de ovocitos obtenidos. Para ello era necesaria la administración de gonadotropinas exógenas para sobreponer el descenso de FSH en suero, responsable de limitar el número de folículos antrales en fase folicular temprana. Así, es posible mantener el crecimiento de un gran número de folículos que de otra forma habrían acabado en atresia y obtener más ovocitos maduros, es decir en metafase II, para ser fecundados. Los protocolos de estimulación fueron adquiriendo complejidad con la introducción de los análogos de la GnRH para prevenir la ovulación prematura. Todo ello para aumentar las tasas de éxito de la FIV.

Sin embargo, estas tasas de éxito se consiguen mediante la transferencia de múltiples embriones en la mayoría de casos. De hecho la transferencia de dos o tres embriones suele ser la norma, incluso llegando a transferirse cinco o seis embriones en países como Estados Unidos. Esto causó una epidemia iatrogénica de embarazos múltiples tal y como se refleja en la Figura 4 donde según datos del Registro SEF el parto doble en el año 2000 en España era cercano al 30% en ciclos en fresco y casi del 40% en ciclos de ovodonación.

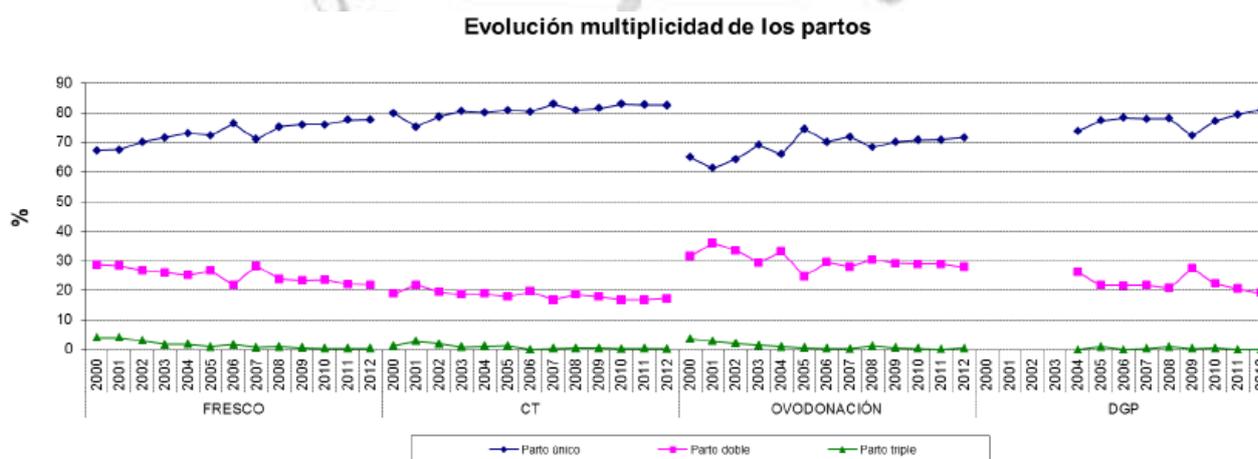


Figura 4. Evolución en la multiplicidad de partos. Registro SEF 2012.

¿Por qué supone un problema?

El embarazo gemelar es aquel en el que se desarrolla, simultáneamente, más de un embrión en la cavidad uterina.

Su importancia radica en que a pesar de la disminución de la mortalidad perinatal en todo el Mundo en las últimas décadas, estas cifras en el embarazo gemelar no siguen un descenso paralelo. Aunque poco más del 1-2% de las gestaciones son gemelares, estas son responsables del 10-14% de la mortalidad perinatal, una tasa de 5 a 10 veces mayor que en los embarazos únicos.

Por otro lado, la incidencia de embarazos gemelares y múltiples se ha visto incrementada en los países desarrollados a partir de la década de 1980 debido al uso, cada vez más frecuente, de fármacos inductores de la ovulación para las TRA. Tanto es así, que la SEF y otras sociedades científicas europeas optaron por recomendar la limitación del número de embriones a transferir (Figura 5). La Ley 14/2006 del 26 de mayo sobre técnicas de reproducción humana asistida fija el número máximo de embriones a transferir en 3.

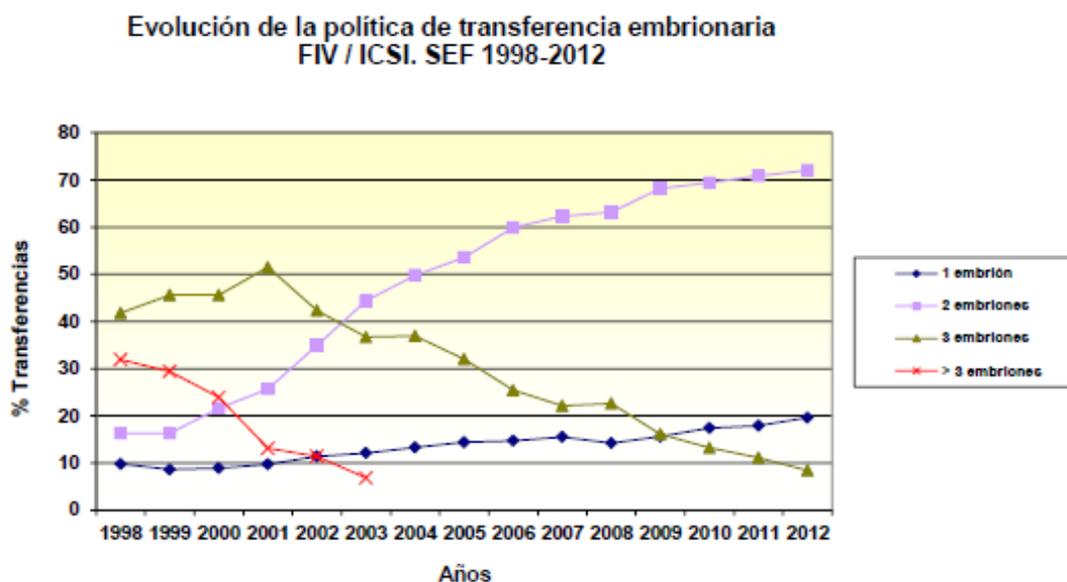


Figura 5. Evolución de la política de transferencia embrionaria. Registro SEF 2012.

El objetivo de la FIV debe ser lograr una gestación única sana a término. Simplemente limitando el número de embriones transferidos se solucionaría el problema de las gestaciones múltiples de FIV a excepción de las gestaciones monocoriales monoamnióticas.

1.3.1. Clasificación de la gestación gemelar.

Existen dos tipos de embarazo gemelar, monocigótico o univitelino y dicigótico o bivitelino. Los gemelos monocigóticos se desarrollan a partir de la fecundación de un solo ovocito con la posterior división del cigoto en dos embriones idénticos; pueden ser monocoriales o bicoriales. Los dicigóticos, también llamados falsos gemelos se originan a partir de la fecundación de dos ovocitos, y siempre darán lugar a gestaciones bicoriales (Figura 6).

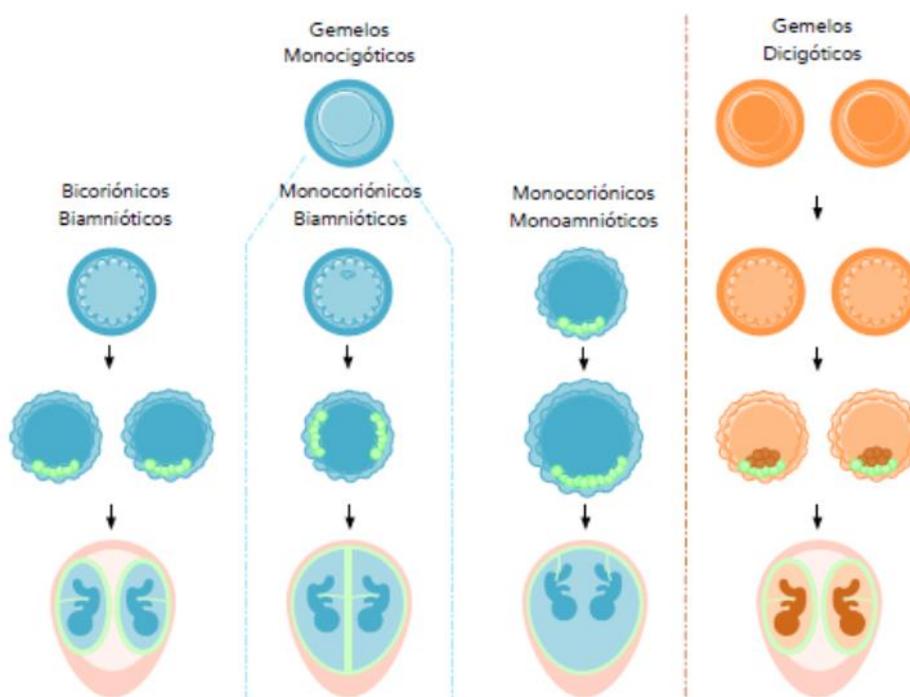


Figura 6. Clasificación de la gestación gemelar. Imagen de J.M.Moreno (2014)

La incidencia de gestaciones gemelares dicigóticas se ve influida por distintos factores como el empleo de inductores de la ovulación y las TRA. Aproximadamente dos terceras partes de las gestaciones gemelares son dicigóticas, de las cuales el 70-80% son bicoriales y el 20-30% son monocoriales. Además el aporte exógeno de FSH en las TRA permite a varios folículos madurar al mismo tiempo. También los niveles de FSH elevados se asocian a un mayor riesgo de embarazo gemelar. Este mecanismo explica que las etnias con FSH mayores (por ejemplo la etnia africana) y las mujeres de mayor edad presenten más embarazos gemelares.

Los gemelos presentan una tasa de mortalidad perinatal de 3 a 11 veces superior a la de los fetos únicos debido a una mayor incidencia de prematuridad, defectos congénitos o retraso de crecimiento.

1.3.2. Riesgos asociados al embarazo múltiple.

Prematuridad

Según la Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia (SEGO) de forma genérica podemos decir que el término "prematuridad" se acuñó para los niños que nacían con inmadurez de una o varias de sus funciones que se traduce en la clínica en una dificultad para adaptarse a la vida extrauterina. Según la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), se denomina parto pretérmino al que tiene lugar entre la 22 y 37 semanas de gestación, es decir entre 154 y 258 días. Las 22 semanas completas de gestación suele corresponder a fetos con 500 g. de peso, mientras que el límite superior que es antes de las 37 semanas completas tiene un rango de peso más amplio.

La prematuridad es la complicación más frecuente de las gestaciones múltiples. Distintos estudios estiman que entre un 39,5% y un 48,2% de ellas acaban en parto pretérmino (Huertas Fernández. MA, González Bermejo AI 2010).

El ser humano está adaptado para una gestación única, por lo que una gestación gemelar supondrá un reto tanto a nivel fisiológico como anatómico para la madre.

La duración media de la gestación es menor cuanto mayor es el número de fetos. Cuando son dos los fetos la edad gestacional media al parto es de 35 semanas. La incidencia de prematuridad es 7 veces mayor que en un embarazo único y afecta a la mitad de los gemelares.

La alta tasa de partos pretérmino se ve favorecida por el mayor volumen fetoplacentario. Además la sobredistensión uterina aumenta la dinámica uterina espontánea y la rotura prematura de membranas. A estos factores deberíamos añadir la finalización anticipada de la gestación por indicación médica.

Discordancia ponderal y crecimiento intrauterino restringido (CIR)

Hasta la semana 32-33 de gestación el aumento de peso en los gemelos es similar al de una gestación única. Sin embargo, a partir de este momento se producen discordancias entre el peso de los fetos únicos y de los gemelares, que serán preocupantes si hay discordancia ponderal entre ambos gemelos, pues se asocia a mortalidad perinatal y morbilidad neurológica, aumentando el riesgo de muerte intraútero proporcionalmente a la discordancia. La diferencia media entre un recién nacido gemelo y uno de gestación única es de 610 gramos.

Por otro lado el CIR se observa entre un 12-47% de las gestaciones gemelares frente a un 5-7% en las únicas. Es la causa más importante de morbimortalidad. El 50% de los gemelos tendrán un peso al nacer inferior al percentil 10.

Mortalidad perinatal

El 14% de la mortalidad perinatal es producida en gestaciones múltiples. Principalmente las monocoriales monoamnióticas (alrededor del 50%). Esto viene condicionado por la alta incidencia de prematuridad, defectos congénitos, CIR, bajo peso, pero también influye la mayor frecuencia de malformaciones fetales, patología placentaria o traumatismo obstétrico.

Malformaciones congénitas

Las malformaciones del feto (estructurales y cromosómicas) en gestaciones múltiples son entre 1,5 y 3,5 veces superiores que en únicas. Este aumento se debe en parte a la edad más avanzada de las mujeres. Las malformaciones pueden ser concordantes, de base genética, en cuyo caso afectan a los dos fetos y tienen una frecuencia similar a la de la gestación única, o bien discordantes, de origen ambiental, que afectan sólo a uno de los dos fetos.

Dentro de las malformaciones debidas a un factor genético encontramos el labio leporino, el paladar hendido, la polidactilia y anomalías cromosómicas. Son un ejemplo de malformaciones debidas a un factor ambiental las malformaciones neurológicas, urogenitales, esqueléticas y fetos acardios.

Muerte intraútero de uno de los gemelos

A partir de la semana 22 de gestación este hecho ocurre entre el 0,5 - 6,8% de las gestaciones gemelares, con una incidencia 3 o 4 veces superior en gemelos monocoriales que en bicoriales y aumenta con el número de fetos. Independientemente de la causa, la muerte intraútero de uno de los dos gemelos expone al gemelo superviviente a un importante riesgo de muerte y de lesiones neurológicas graves.

Hipertensión y preeclampsia maternas

Existe una relación directa entre el modo de concepción y la hipertensión gestacional y preeclampsia en el embarazo gemelar. Son más elevadas en gestaciones por reproducción asistida.

En la mayoría de estudios se ha detectado un aumento significativo de la incidencia de la preeclampsia respecto al embarazo único, con aparición más precoz y cuadro clínico más severo.

Morbilidad materna en embarazo gemelar

- Leve: ocasiona distensión abdominal, absentismo laboral a causa de la permanencia del neonato en Unidad Cuidados Intensivos (UCI) neonatal, distrés respiratorio y elevada β -hCG que se asocia a mayor hiperemesis.
- Moderada: elevada tasa de cesáreas.
- Grave: la estancia en UCI es 7 veces más frecuente.

1.3.3. Consecuencias socio sanitarias.

El embarazo múltiple es la causa más común de morbilidad y mortalidad asociada a la FIV. La edad gestacional al nacimiento es aproximadamente 35 semanas para gemelos y 32 para triples, ello supone una elevada tasa de embarazos pretérmino.

En Estados Unidos por ejemplo suponen el 13% de los nacimientos pretérmino antes de las 37 semanas de gestación y el 25% de los niños de muy bajo peso al nacer. Pero la elevada tasa de nacidos pretérmino no solo compromete su supervivencia sino también el riesgo de discapacidad, lo que incluye también problemas neurológicos. El riesgo de parálisis cerebral es significativamente más frecuente en niños nacidos de gestaciones múltiples debido a la prematuridad. Mientras que la incidencia de parálisis cerebral en la población general es de 2 por cada 1000 nacidos, se estima que aumenta a 9, 31 y 111 por 1000 nacidos en gemelares, triples y cuádruples respectivamente.

Los costes derivados de los embarazos múltiples están directamente relacionados con las complicaciones médicas descritas anteriormente.

En un estudio realizado por Luke *et al.*, en 2005 se analizó el coste de la asistencia sanitaria del embarazo gemelar. Se analizaron 1486 gestaciones asistidas entre 1995 y 2002 en distintos hospitales estadounidenses; la duración media de la gestación fue 35,4 semanas. El 25% de las mujeres precisaron hospitalización preparto con una media de 4,7 días y un coste de 7547 dólares. La estancia hospitalaria en el parto fue 5,7 días con un coste de 10251 dólares. La hospitalización del recién nacido osciló entre 12,4 y 14,6 días, lo que supone un coste de 29797 y 37443 dólares respectivamente.

Cuando la edad gestacional era menor aumentaban significativamente los costes. Por ello podemos decir que la gestación múltiple constituye la situación obstétrica que más recursos socio sanitarios consume.

Se estima que en Estados Unidos el coste sanitario de un neonato pretérmino es de 51600 dólares. Incluyendo la etapa prenatal, perinatal, cuidados neonatales y costes de cuidados especiales de atención temprana hasta los 5 años.

1.4. Criterios de selección en Embriología.

La eficiencia de las TRA es todavía baja y muchos de los embriones que se transfieren no llegan a implantar. Por esa razón hay que elegir muy bien los embriones que van a ser transferidos. Para ello hemos de valernos de criterios de selección embrionaria. La evaluación de los embriones de forma objetiva es una tarea difícil y precisa de la ayuda de criterios de selección desarrollados tras múltiples estudios realizados por grupos de interés de distintas sociedades científicas desde hace décadas. Sin embargo, ninguno de los criterios de los que disponemos hasta la fecha tiene un valor predictivo elevado. Actualmente, la evaluación de la calidad embrionaria se basa principalmente en criterios de selección morfológicos que consisten en la valoración mediante microscopio invertido de los embriones en unos momentos concretos de su desarrollo.

En los siguientes capítulos vamos a revisar los distintos criterios de selección de los que disponemos actualmente dada la importancia del tema en esta tesis.

1.5. Criterios morfológicos de selección en Embriología.

La evaluación morfológica ha sido la primera herramienta usada por los embriólogos para seleccionar el mejor embrión para transferir.

Los parámetros clásicos se basan en el número de células y el grado de fragmentación, pero existen numerosas características a examinar como la morfología de los pronúcleos, la división temprana a dos células o la evaluación del blastocisto.

En los siguientes apartados vamos a basarnos en la clasificación propuesta por el grupo de interés en calidad embrionaria de ASEBIR en 2008. Esta clasificación fue creada para unificar criterios de valoración morfológica.

1.5.1. Valoración morfológica del ovocito.

El proceso de maduración ovocitaria incluye cambios tanto a nivel citoplasmático como nuclear que ni siempre son sincrónicos ni ocurren con el mismo grado de maduración. Los ovocitos con maduración nuclear en metafase II (Figura 7) podrían presentar deficiencias en su maduración citoplasmática que comprometerían el desarrollo adecuado del preembrión (Scott, 2003).



Figura 7. Ovocito en estadio madurativo de metafase II

El ovocito maduro puede presentar alteraciones o dimorfismos que nos permitirían realizar una valoración morfológica. Según su localización, dichas alteraciones morfológicas se clasifican en citoplasmáticas o extracitoplasmáticas.

Alteraciones morfológicas citoplasmáticas:

- Agrupación de granulosidad localizada en el centro del ovocito (Figura 8).

Se trata de una alteración frecuente del citoplasma del ovocito que podría describirse al microscopio óptico como una masa individual y oscura con un contenido excesivo de gránulos, normalmente situada en la porción central del ovocito aunque también puede situarse en la periferia.

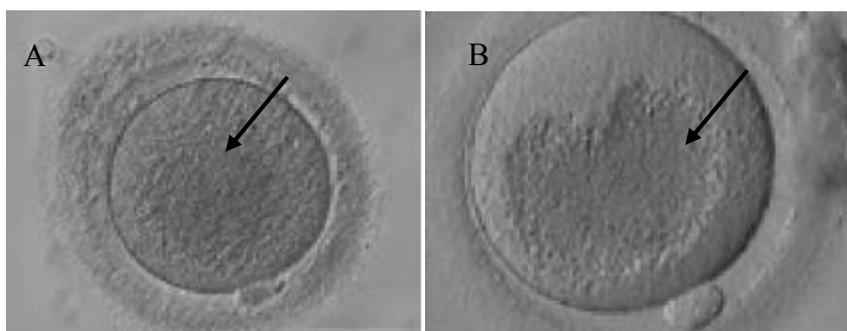


Figura 8. Ovocitos con granulosidad central. Cuadernos ASEBIR.

- Agregación de retículo endoplasmático liso (REL) (Figura 9A)

Visto al microscopio óptico, se trata de un tipo de inclusión citoplasmática individual, de dimensiones semejantes a un pronúcleo. Es el resultado de una acumulación masiva de sáculos del REL.

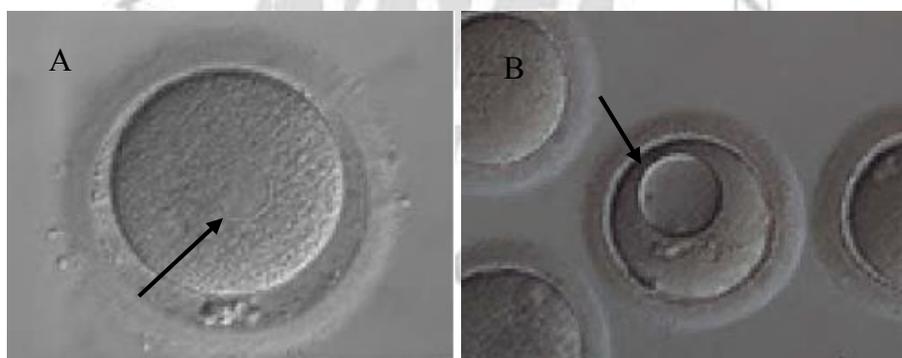


Figura 9. Diferencias entre Ovocito con REL y vacuola. A REL. B Vacuola.

- Vacuolas (Figura 9B)

Son un tipo de inclusiones citoplasmáticas rodeadas de membrana y llenas de fluido, claramente distinguibles al microscopio. Su número y tamaño varía considerablemente entre ovocitos. Estas

vacuolas podrían formarse espontáneamente o bien mediante una fusión de vesículas preexistentes derivadas de retículo endoplasmático liso o del aparato de Golgi.

- Inclusiones citoplasmáticas

Se incluyen diversos tipos de características citoplasmáticas, consideradas como pequeñas áreas de necrosis, las cuales incluirían cuerpos refringentes de ~10 µm de diámetro, compuestos de lípidos y gránulos densos que pueden agruparse o quedarse aislados.

Alteraciones morfológicas extracitoplasmáticas:

- Exudados en el espacio perivitelino

La presencia de granulosidad o detritus en el espacio perivitelino se considera una anomalía extracitoplasmática. Este detritus se ha relacionado con un deterioro de la zona pelúcida interna y su incremento podría afectar a la capacidad fecundante del ovocito tras la realización de FIV convencional (Veeck, 1999). Este detritus podría ser un signo de “sobredosis” de gonadotropinas empleadas en los ciclos de estimulación ovárica, aunque su presencia no parece relacionarse con la calidad embrionaria o las tasas de fecundación, división, embarazo o implantación (Hassan-Ali *et al.*, 1998). Por tanto, este dimorfismo podría ser un fenómeno relacionado con la maduración fisiológica del oocito (Balaban y Urman, 2006).

- Anomalías de la zona pelúcida (Figura 10)

La zona pelúcida sufre cambios en el grosor y en la apariencia de bicapa desde el momento de la fecundación hasta el día 2 de cultivo. Pero otras anomalías como el contorno no circular, abultamientos o septos, se mantienen a lo largo del desarrollo y pueden ser detectadas con más facilidad en el momento de la microinyección.



Figura 10. Ovocitos con anomalías en la zona pelúcida.

- Espacio perivitelino aumentado (Figura 11A)

Es un dimorfismo que se visualiza claramente al microscopio debido a un incremento del espacio perivitelino, que hace que el ovocito quede “flotando” en el interior de la zona pelúcida.

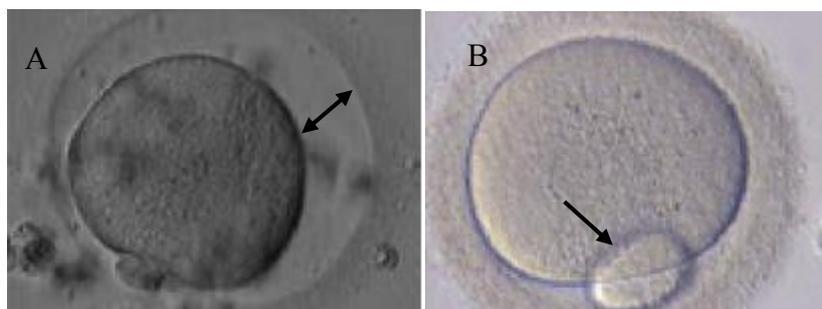


Figura 11. A Ovocito con espacio perivitelino aumentado. B Ovocito con CP gigante.

- Alteraciones del primer corpúsculo polar (Figura 11B)

Parece ser que la morfología del primer corpúsculo polar (CP) cambia tras unas horas de cultivo *in vitro*. De hecho, se ha detectado una correlación positiva entre el porcentaje de fragmentación del CP y el tiempo transcurrido entre la denudación y la ICSI (Ciotti *et al.*, 2004).

Por otro lado, la variación en el tamaño del CP puede ser tratada como una condición anómala del ovocito. El factor determinante es probablemente, la posición del huso meiótico en relación con la superficie del ovocito. Estos ovocitos pueden dar lugar a alteraciones cromosómicas.

Valoración del complejo cúmulo-corona radiata-ovocito

El grado de madurez del complejo ha sido utilizado como indicador de la madurez ovocitaria, aunque la sincronía entre ambos es cuestionable. Esto puede ser debido a diferencias de sensibilidad de las células del complejo cúmulo-corona y del núcleo ovocitario a la maduración inducida por las gonadotropinas u otros factores foliculares (Balaban y Urman, 2006).

1.5.2. Valoración morfológica del cigoto.

Habitualmente se ha considerado la visualización del estadio de cigoto como una herramienta útil solo para discernir fallos o alteraciones de la fecundación. Sin embargo, el proceso de fecundación supone una serie ordenada de cambios morfológicos que afectan notablemente el aspecto celular.

Este hecho implica que la hora de observación de los pronúcleos es crucial para una valoración adecuada del cigoto. Márgenes de tiempo inadecuados para valorar la fecundación pueden conllevar diferentes problemas como la modificación en el tamaño de los precursores nucleolares, la variación del aspecto del citoplasma, la no visualización de los pronúcleos o la alteración de su tamaño y la valoración errónea de la yuxtaposición pronuclear.

Los márgenes horarios habituales en la observación de los pronúcleos oscilan entre las 16 y las 22 horas tras inseminación mediante ICSI. Este margen podría provocar que en las observaciones realizadas entre las 20 y las 22 horas se corriera el riesgo de desaparición de los pronúcleos o el cambio en su tamaño, por lo que se aconseja restringirlo a un rango preferente de 16 a 18 horas. Una hora más tarde si se trata de ovocitos inseminados mediante FIV convencional.

Los parámetros evaluados en el cigoto son las diferentes alteraciones morfológicas y la división temprana.

Alteraciones morfológicas:

- Corpúsculos polares

No existen evidencias de que el número de corpúsculos polares pueda ser incluido en la valoración morfológica. Sin embargo, su valoración es esencial a la hora de evaluar la ploidía conjuntamente con el número de pronúcleos.

La apariencia de los corpúsculos polares suele hacer referencia a las alteraciones en el tamaño o en la fragmentación de los mismos.

- Número pronuclear

La valoración conjunta del número de pronúcleos y el número de corpúsculos polares son esenciales para evaluar una fecundación anómala (Figura 12 A y B).



Figura 12. A Cigoto con dos pronúcleos (Fecundación correcta). B Cigoto con tres pronúcleos.

En cuanto al patrón nuclear no se ha encontrado consenso en la bibliografía cuando se trata de relacionar los distintos patrones pronucleares con las tasas de implantación, aunque hay tres características morfológicas que sí parecen tener relación con bajas tasas de implantación o con mala morfología embrionaria:

- Un solo precursor nucleolar en un pronúcleo.
- Pronúcleos separados.
- Pronúcleos de tamaño desigual.

La distribución de los precursores nucleolares dentro de los pronúcleos ha sido durante mucho tiempo un tema a debate del que derivaron distintas clasificaciones sin que finalmente, se llegase a ver una correlación clara con la calidad embrionaria. Entre los sistemas de clasificación propuestos destacan los de Tesarik y Greco, 1999, y Scott, 2000. (Figura 13).

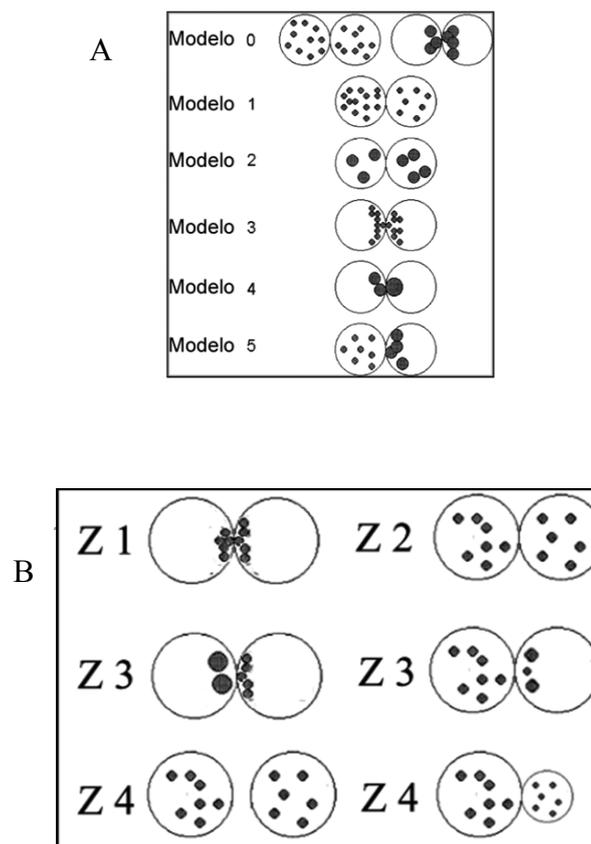


Figura 13. Esquemas de gradación pronuclear. A Propuesto por Tesarik y Greco, 1999. B Propuesto por Scott, 2000

- Halo citoplasmático

Es la presencia de un área cortical más clara que ocupa el citoplasma de forma total o parcial. Es una característica positiva, siempre y cuando no sea excesiva. Los cigotos con halo evolucionan hacia embriones de mejor calidad que aquellos que no lo tienen.

División temprana

La observación se realiza entre las 25 y las 27 horas postinseminación. Son numerosos los estudios que analizan este parámetro, pero nunca por sí solo, sino combinado con la morfología del cigoto (Chen y Kattera, 2006), la mononucleación en día 2 (Ciray *et al.*, 2005) o la morfología en día 3 de cultivo (Neuber *et al.*, 2003).

En la mayoría de publicaciones se aconseja utilizar la división temprana como parámetro secundario, para decidir entre embriones de calidad similar.

1.5.3. Valoración morfológica del embrión.

La valoración del embrión en este estadio ha constituido tradicionalmente la base de la determinación de la calidad embrionaria. Sin embargo, es difícil valorar embriones de calidades intermedias.

El intervalo de observación recomendado es entre 44-47 horas post-inseminación para día 2 de cultivo, y para día 3 entre 67-71 horas postinseminación (Figura 14).



Figura 14. De izquierda a derecha embriones en día 2 y 3 de cultivo.

Los parámetros evaluados en día 2 y 3 son los siguientes:

- Número celular y ritmo de división

Con los estudios actuales es posible agrupar los embriones en función de la tasa de implantación según el número de células observadas en día 2, de mejor a peor tasa de implantación:

- 4 células.

- 2 o 5 células.

- 3 o 6 células.

- 1 o más de 6 células.

Si bien no se encuentran diferencias evidentes entre 2 o 5 células, la presencia de 5 células tiende a aportar mejor tasa de implantación; situación que se repite en el siguiente grupo, 3 o 6 células.

La valoración del embrión en día 3 es dependiente del ritmo de división entre el día 2 y el 3, siendo la mejor tasa de implantación aquella que partiendo de un embrión en 4 células en día 2 pasa a 7-8 células en día 3 y la peor aquella en que se ha producido una única división y el embrión se encuentra en 5 células.

- Porcentaje y tipo de fragmentación celular (Figura 15)

La presencia de fragmentación es común en los embriones humanos y no siempre se correlaciona con una tasa de implantación baja. Cuando el grado de fragmentación es inferior al 20% la implantación no está comprometida (Hardarson *et al.*, 2001; Van Royen *et al.*, 1999; Ziebe *et al.*, 1997).

Además del porcentaje de fragmentos, también son importantes el tamaño y la distribución de los mismos. Cuando predominan los fragmentos de gran tamaño repartidos por todo el embrión, que pueden incluso confundirse con células, las posibilidades de implantación son escasas.

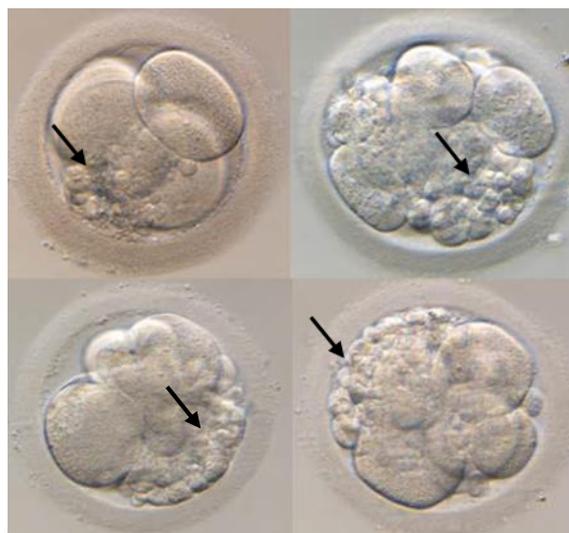


Figura 15. Embriones con grado de fragmentación entre 11-25%.

- Desigualdad en el tamaño de las blastómeras

Cuando el cigoto realiza las primeras divisiones mitóticas sus células no siempre se dividen de forma simétrica y sincrónica. Un embrión con divisiones sincrónicas y simétricas presentará 2, 4, 8 o 16 células de tamaño similar. La desigualdad de tamaño celular se asocia con una disminución de la capacidad de implantación del embrión.

Un embrión de 4 células con división asimétrica es aquel en el que la diferencia entre el diámetro de las blastómeras mayor y menor supera el 20% del diámetro del menor, relacionándose esta desigualdad en el tamaño celular con una disminución en el potencial implantatorio del embrión.

Cuando las divisiones celulares no son sincrónicas, es decir, cuando los embriones no se encuentran en 2, 4, 8 o 16 células, es evidente que coexisten células de dos ciclos celulares distintos. Esto implica que cuando vemos embriones de 3, 5, 6, 7, 9 blastómeras debemos esperar ver dos tamaños celulares diferentes (Scott, 2003). La desigualdad en el tamaño de las blastómeras no siempre es señal de mal pronóstico (Figura 16).

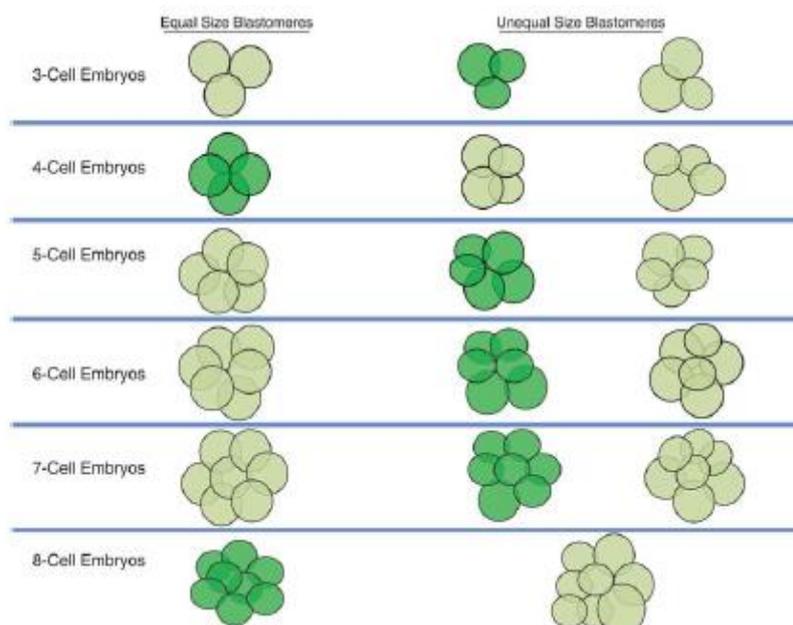


Figura 16. Relación entre el tamaño de las blastómeras y el pronóstico. En verde oscuro: embriones con buen pronóstico. En verde claro: embriones con mal pronóstico. (ESHRE 2012).

En un embrión de 3 células, una de ellas debe corresponder a una blastómera de un embrión de 2 células que todavía no se ha dividido y que debe ser claramente más grande que las otras 2 células, el tamaño de las cuales ha de ser el esperado para las blastómeras en estadio de 4 células.

Si la citocinesis ha sido simétrica, en un embrión de 5 células tres de ellas deberían tener el tamaño del estadio de 4 células y dos el del estadio de 8 células. Es decir, lo esperable sería tener 3 células grandes y 2 pequeñas. Otras combinaciones de tamaños implican divisiones asimétricas con distribución anómala del citoplasma entre las dos células resultantes.

- Visualización de núcleos y grado de multinucleación

La presencia de dos o más núcleos o micronúcleos en una célula tiene una correlación directa con un incremento en la tasa de anomalías cromosómicas embrionarias (Hardarson *et al.*, 2001). La presencia de blastómeros multinucleados implica baja tasa de implantación y aumento en la tasa de aborto, aunque se han descrito niños nacidos de embriones con blastómeras multinucleadas (Figura 17).



Figura 17. Embriones multinucleados. Atlas of Human Embryology: from Oocytes to Preimplantation Embryos. Magli *et al.*, 2012.

- Anillo acitoplasmático

Se caracteriza porque el citoplasma se muestra retraído dejando un anillo en la periferia de la blastómera. Se relaciona con un proceso de lisis celular.

- Presencia de vacuolas

Se asocia con una disminución del potencial de desarrollo. Sin embargo, no existen evidencias bibliográficas que relacionen la cantidad de vacuolas, su tamaño o su distribución con la tasa de implantación. Aunque parece que si el tamaño de las mismas es inferior a 5 μm de diámetro pueden no comprometer el desarrollo del embrión.

- Zona pelúcida

Las anomalías en la zona pelúcida se relacionan con baja tasa de implantación, debido a la falta de eclosión. Una zona pelúcida sana es aquella con la silueta redonda, grosor aproximado de 17 μm , ausencia de doble capa por tabicación de la zona interna, ausencia de abultamientos y aspecto translúcido.

- Grado de compactación/adhesión celular temprana

La compactación temprana es un signo de activación embrionaria que conlleva contacto intercelular, la formación de uniones intercelulares y el inicio de la polarización embrionaria (Figura 18). Sin embargo, la bibliografía consultada no aporta datos suficientes para incluir este parámetro en la clasificación embrionaria, posiblemente por estar muy influenciado por el protocolo y los medios de cultivo utilizados.



Figura 18. De izquierda a derecha embrión compactado y embrión con signos de adhesión celular temprana. Atlas of Human Embryology: from Oocytes to Preimplantation Embryos. Magli *et al.*, 2012.

1.5.4. Valoración morfológica en estadio de mórula y blastocisto.

La transferencia en estadio de blastocisto está asociada a elevadas tasas de implantación, ya que en algunos casos, podría permitir una mejor selección embrionaria en la transferencia. El embrión en estadio de blastocisto presenta una estructura compleja, debido al gran número de células y a la organización de las mismas.

El intervalo de observación postinseminación en día 4, 5 y 6 es de 94-98 horas, 112-120 horas y 163-140 horas postinseminación.

Los parámetros evaluados son la compactación en mórula en día 4 y la organización del blastocisto en día 5, el grado de expansión del blastocele, el grosor de la zona pelúcida, el trofoectodermo, la masa celular interna, presencia de vacuolas o focos degenerativos y presencia de células fuera del trofoectodermo.

Compactación en mórula

La compactación celular es una característica que presentan los embriones alrededor del día 4 de cultivo, aunque se inicia en los estadios cercanos a las 8 células. Visualmente se caracteriza por la apariencia de una masa de células compactada (Figura 19). Esta compactación se debe a las fuertes uniones que se forman entre las células, impidiendo que se distingan los contornos de cada una claramente. En esta situación las células dejan de ser totipotentes, lo que corresponde a un embrión ya especializado. Por lo tanto, la compactación responde a un buen pronóstico de desarrollo.



Figura 19. Embriones compactados en estadio de mórula.

Organización del blastocisto

Se considera que un embrión cultivado *in vitro* adquiere el estadio de blastocisto en día 5 o 6. Los embriones con un ritmo de desarrollo más lento pueden llegar a este estadio en día 7 o incluso 8, lo que empeora el pronóstico. En el blastocisto es preciso diferenciar: (Figura 20)

- Grado de expansión del blastocele

En el interior de la mórula comienza a acumularse líquido creando una cavidad conocida como blastocele. El aumento del volumen del blastocele es un parámetro dependiente del tiempo.

En pocas horas el blastocisto es capaz de expandirse considerablemente, con el consiguiente adelgazamiento de la zona pelúcida. El alto grado de expansión del blastocele está relacionado con buenas tasas de implantación.

- Zona pelúcida

El grosor de la zona pelúcida puede presentar grandes variaciones a lo largo del desarrollo del blastocisto. A medida que se expande el blastocele se produce un afinamiento de la zona. Cuando el blastocisto está totalmente expandido el grosor de la zona es mínimo para facilitar la eclosión con la ruptura de la misma.

- Trofoectodermo

Esta estructura se caracteriza por presentar una monocapa de células cohesionadas que constituyen la pared del blastocele o cavidad del blastocisto.

El número, la forma y el grado de cohesión nos ayudarán a clasificar el blastocisto en las distintas categorías:

- Epitelio homogéneo con células elípticas.
- Epitelio irregular.
- Epitelio irregular con células escasas.

Los blastocistos con trofoectodermos subóptimos presentan buenas tasas de implantación siempre que la masa celular interna tenga una morfología normal.

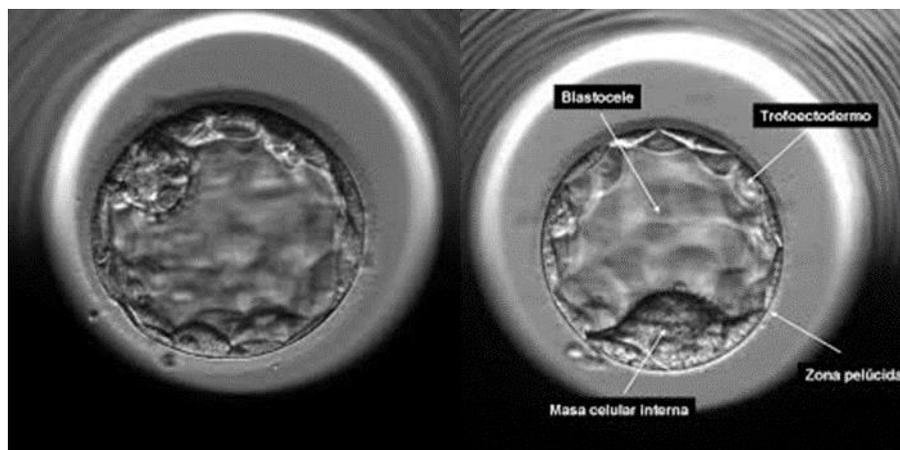


Figura 20. Morfología del blastocisto.

- Masa celular interna (MCI)

Este es el parámetro más importante para definir las distintas categorías de blastocistos. La MCI ha de tener una forma ovalada y sus células deben estar compactadas. El tamaño favorable varía entre 1.900 y 3.800 μm^2 . Tamaños inferiores implicarían un menor potencial implantatorio.

- Presencia de vacuolas

Parámetro indicativo de inicio de apoptosis, pero no hay referencias bibliográficas que lo relacionen directamente con fallos de implantación. La presencia de vacuolas es incompatible con una buena morfología del blastocisto y aquellos que las presenten quedarán relegados a la categoría de embriones de peor pronóstico.

1.5.5. Morfocinética como herramienta de mejora de la valoración morfológica.

La selección del mejor embrión a transferir puede ser una tarea muy complicada y subjetiva. Una de las posibles aproximaciones para el aumento de la tasa de gestación se asocia a la relación existente entre el desarrollo embrionario y la tasa de división. (McKiernan *et al.*, 1994). La división es un proceso dinámico en el que la morfología puede cambiar significativamente en pocas horas. Mediante la valoración morfológica convencional muchos de esos cambios como la primera división no llegan a visualizarse.

Uno de los parámetros propuestos como marcador de calidad embrionaria es la división temprana. Esta idea proviene de estudios en los que embriones que realizaban la primera división de forma temprana tenían mayor tasa de gestación e implantación (Sakkas *et al.*, 2001, Shoukir *et al.*, 1997).

Otro estudio propone como parámetro la reaparición sincrónica de los núcleos en las dos blastómeras formadas tras la primera división (Lemmen *et al.*, 2008, Wong *et al.*, 2010).

Una monitorización externa realizada por EmbryoViewer (Unisense Fertilitech, Dinamarca) usando un software de análisis por imagen, encontró tras anotar los tiempos de las divisiones embrionarias seis parámetros morfocinéticos relevantes. El momento en que se producía la división a dos, tres, cuatro y cinco células se llamó t2 a t5 respectivamente. Otro de los parámetros relevantes es la duración del segundo ciclo celular (cc2). Este se obtiene al restar el tiempo que tarda el embrión en realizar la división a tres células menos el tiempo que tarda en realizar la división a dos células ($cc2 = t3 - t2$). También importante es la segunda sincronía (s2). Es el paso de dos a cuatro células ($s2 = t4 - t3$). De todos los parámetros han adquirido mayor relevancia t5, cc2 y s2 por su correlación con la implantación embrionaria. (Escrich *et al.*, 2010).

La correlación establecida entre la morfocinética y la implantación embrionaria podría suponer el punto de inicio para la construcción de un árbol de decisiones y así mejorar la selección embrionaria. Esta clasificación jerárquica incluye seis categorías de la A a la F. La categorización comienza con un *screening* morfológico para descartar los embriones no viables (Clase F). Posteriormente el modelo excluye los embriones que cumplen alguno de los criterios de exclusión (Clase E). Los siguientes niveles siguen una jerarquía estricta basada en las variables t5, cc2 y s2. Si el valor de t5 se da dentro del intervalo óptimo de (48.8-56.6 h) el embrión será de categoría A o B, que corresponde a un buen embrión. Si el valor cae fuera de ese intervalo el embrión será C o D. Si s2 está dentro del

rango óptimo (≤ 0.76 h) será A o C dependiendo de t_5 . De la misma forma si $s_2 > 0.76$ h el embrión será B o C dependiendo de t_5 . Finalmente, el embrión tendrá un plus extra (+) si $cc_2 \leq 119$ h, es decir, A+/B+/C+/D+ o un menos (-) si $cc_2 > 119$ h, A-/B-/C-/D- (Meseguer *et al.*, 2011).

Por otro lado, no hay que olvidar la influencia que pueden ejercer distintos medios de cultivo sobre esos tiempos, así como la influencia propia del espermatozoide sobre la duración de la fase S del ciclo celular (Eid *et al.*, 1994). Esto hará necesario la realización de un estudio de distintas marcas de medio de cultivo para evaluar los efectos sobre dichos tiempos.

Otro de los puntos desventajoso es la permanente exposición a la luz a la que se ven sometidos dichos embriones. La valoración mediante morfocinética emplea una película cinematográfica a tiempo real creada a partir de instantáneas realizadas cada cinco minutos durante todo el desarrollo del embrión hasta día 5 conocida como *Time lapse*. La luz supone un estrés innatural que podría afectar al desarrollo del embrión. (Nakahara *et al.*, 2010).

La principal ventaja que aporta la morfocinética es la valoración permanente de los embriones sin necesidad de sacarlos del incubador durante todo el desarrollo. Además aporta otras importantes ventajas como son la estabilidad ambiental, de suma importancia en el cultivo *in vitro* embrionario ya que reduce significativamente el estrés. Esta estabilidad se refiere a la temperatura, CO₂, y por tanto el pH del medio en el que se encuentran. Otra de las ventajas es la reducción de costes en medios de cultivo y material fungible. Esto se debe a que al no ser necesario el cambio de placa para el refrescado de medio de cultivo durante todo el desarrollo se produce un ahorro importante. Por otro lado es importante mencionar que al limitarse a una la realización y cambio de placa de los embriones se reduce el error humano.

La introducción de la tecnología *time lapse* ha supuesto una gran ayuda en cuanto a la valoración tiempo-dependiente de los embriones (Meseguer *et al.*, 2011). Sin embargo, en términos de tasa de embarazo todavía no existen beneficios documentados en cuanto a la evaluación mediante el empleo de morfocinética (Kirkegaard *et al.*, 2013).

Otros autores en estudios más recientes concluyen que no hay todavía datos de calidad que defiendan el uso de esta tecnología (Kaser *et al.*, 2014).

1.5.6. Problemas de los criterios de selección morfológicos.

A pesar de que la morfología ha sido utilizada casi de forma exclusiva para la selección embrionaria en los últimos 30 años, sigue resultando una técnica subjetiva. Nunca ha sido validada como técnica y existen muchos casos en los que embriones catalogados como “de mala calidad” han dado recién nacidos vivos sanos. En cuanto a la evaluación de las divisiones poco más se ha aportado desde la publicación de algunos artículos en los ochenta.

Los avances en los laboratorios de reproducción asistida han permitido el crecimiento de embriones hasta quinto o sexto día de desarrollo y formar blastocistos, uno de los mayores indicadores de viabilidad de todos los parámetros morfológicos. Aunque la realidad es que actualmente la mayoría de centros optan por transferir embriones en estadios más tempranos. Según el registro de la SEF 2012, el 67.4% de los centros de reproducción asistida realizaron transferencia embrionaria en día 3 de cultivo y cerca de un 24% en día 5 o superior. El resto de transferencias son en día 2 y día desconocido.

Además de la subjetividad, otro de los puntos débiles de la selección basada en criterios morfológicos es que no aporta ningún dato acerca de la fisiología del embrión.

La precisión de los criterios morfológicos menor a la deseada junto con el avance de las llamadas Ómicas (genómica, proteómica, transcriptómica y Metabolómica) han supuesto nuevas estrategias de selección embrionaria invasivas y no invasivas.

1.6. Criterios no morfológicos de selección en Embriología.

Las limitaciones existentes en los sistemas de clasificación actuales han provocado que los distintos grupos de investigación persigan tecnologías que ayuden a mejorar la capacidad de valorar el potencial implantatorio del embrión y así poder seleccionar el mejor embrión a transferir. Los avances recientes en las tecnologías ómicas, así como otras técnicas de análisis no invasivo han permitido investigar esas nuevas vías distintas a la morfología para la selección embrionaria.

1.6.1. Genómica.

El Diagnóstico Genético Preimplantacional (DGP) es el estudio de los embriones en estadios tempranos de desarrollo con el fin de seleccionar y así poder transferir un embrión sano. Existe una clasificación propia de la ESHRE en la que dividen los casos de DGP en dos categorías en función del riesgo de los pacientes. El primer grupo incluiría a pacientes con alto riesgo de transmisión de enfermedades genéticas a los hijos, como son los desórdenes monogénicos, anormalidades cromosómicas, enfermedades ligadas al cromosoma X y enfermedades autosómicas tanto dominantes como recesivas. El segundo grupo incluiría a los pacientes con bajo riesgo de transmisión o lo que hoy día conocemos como *Screening* Genético Preimplantacional (SGP), como son la selección de sexo, los pacientes infértiles que se encuentran realizándose un ciclo de FIV y desean aumentar la tasa de gestación, pacientes con repetidos fallos de implantación, edad materna avanzada, factor masculino severo y aquellos con cariotipo normal pero abortos recurrentes.

Aproximadamente el 20% de todos los embarazos acaba en aborto. Un gran porcentaje de ellos debido a aneuploidías que se relacionan con la edad materna elevada. El 57% de los cariotipos fetales anormales pertenecen a mujeres menores de 35 años frente a un 82% en mujeres mayores de 35 (Hogge *et al.*, 2003) (Ljunger *et al.*, 2005). Por este motivo parece lógico el uso de SGP en pacientes con edad materna elevada y fallos repetidos de FIV.

EL SGP es una técnica segura y eficiente de selección embrionaria basada en la biopsia de una blastómera del embrión en día 3 postfecundación o de un grupo de células del blastocisto en día 5. A pesar de ser un método invasivo, la biopsia embrionaria no supone un aumento de anormalidades congénitas asociadas a la técnica. La biopsia de blastómeras tiene mayor impacto sobre el desarrollo de los embriones que si se realiza en células del trofoectodermo. Hay estudios que consideran que el potencial reproductivo se puede ver reducido a causa de la técnica incluso en un 39% debido a la biopsia (Treff *et al.*, 2011).

Muchos grupos han dejado de realizar las biopsias en día 3 postfecundación debido al mosaicismo. Entre el 40%-60% de los embriones son mosaico lo que aumenta los casos de falsos positivos y falsos negativos resultantes de SGP (Colls *et al.*, 2007; De Ugarte *et al.*, 2008; Hanson *et al.*, 2009). Una alternativa para reducir los falsos positivos o negativos es biopsiar el corpúsculo polar o células del trofoectodermo. El problema de la biopsia de corpúsculo polar es que nos proporciona información

únicamente de la carga genética materna, mientras la biopsia de células del trofoectodermo nos da información materna y paterna.

Otro de los factores a tener en cuenta es que los embriones en blastocisto presentan menos mosaicismo que los embriones en día 3 de desarrollo. Esto es debido seguramente a que el desarrollo hasta blastocisto les permite corregir por sí mismos las aneuploidías tempranas (Daphnis *et al.*, 2005) (Baart *et al.*, 2006) (Li *et al.*, 2005).

El principal problema de biopsiar en estadio de blastocisto es la necesidad de criopreservar los embriones hasta tener los resultados del análisis y realizar posteriormente una descongelación y transferencia de los seleccionados. Por ello con el deseo de un análisis más rápido de células del trofoectodermo aparece una metodología que implica la PCR cuantitativa a tiempo real (RT-PCRq). Esto permite obtener resultados sin necesidad de vitrificar. Sin embargo, la necesidad de evaluar los genotipos parentales y la baja frecuencia de polimorfismos de un solo nucleótido o SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) en los que los padres son homocigóticos para los alelos contrarios dificulta su aplicación rutinaria. Existe un método en el que no existe necesidad de evaluar los *loci* polimórficos (Treff *et al.*, 2012). En un estudio randomizado para determinar la eficacia de la qPCR se estudiaron las células del trofoectodermo biopsiadas de pacientes de todas las edades con un ciclo previo de fallo de implantación de FIV y posterior transferencia de 1 o 2 embriones. En otro grupo se transfirieron embriones sin analizar. Los resultados indicaron un aumento en la tasa de gestación clínica para el grupo de embriones analizados por qPCR y un descenso en la tasa de aborto (Scott *et al.*, 2010).

Para caracterizar los 24 cromosomas del genoma se puede emplear la hibridación genómica comparada (CGH). En este método se marca el ADN de la blastómera biopsiada con un fluorocromo (verde generalmente). El ADN de referencia (euploide) se marca con distinto color (rojo), se hibridan y colocan en un cristal que porta los cromosomas en metafase. Cualquier diferencia de color indicará ganancia o pérdida de material genético. Sin embargo, es un método laborioso e inapropiado para la clínica diaria debido a que habitualmente con los protocolos estándar de DGP realizados en las clínicas se suele biopsiar el embrión en día 3 de cultivo para tener resultados en día 5 y poder transferir los embriones sanos, con lo que los resultados no estarían a tiempo. La única solución es congelar los embriones hasta tener los resultados y realizar posteriormente un ciclo de criotransferencia (Wilton *et al.*, 2001).

Los *arrays* de CGH (aCGH) se basan en el mismo principio que la CGH pero en formato de *microarrays*. En lugar de emplear como referencia metafases se usan fragmentos de ácidos nucleicos fijados en un cristal que cubren el genoma completo ya que cada fragmento cubre una región cromosómica diferente. La información escaneada mediante láser detecta las diferencias de color, que marcan ganancias o pérdidas de material. Estos *arrays* son capaces de detectar diferencias numéricas y desequilibrios en las células analizadas. Por esa razón pueden ser también aplicadas en la detección de traslocaciones o microdeleciones. La principal ventaja que aportan los *arrays* CGH respecto a una CGH normal es el ahorro de tiempo. Para realizar la hibridación se necesitan 48 horas en la CGH convencional y tan solo 3 horas con los *arrays*. Lo mismo sucede con el análisis de resultados, pasando de 45 minutos por muestra a tan sólo 5 minutos. Los primeros resultados de la aplicación de esta técnica de forma satisfactoria en el contexto de DGP son de 2008. El equipo de Hellani realizó un estudio empleando un *array* de Agilent Technologies® para detectar aneuploidías en blastómeras biopsiadas en día 3 de cultivo procedentes de embriones de ocho pacientes que habían realizado ciclos de FIV sin resultados. Aproximadamente el 60% de los embriones analizados tenían errores cromosómicos pero a pesar de ello seis de las pacientes tuvieron transferencia embrionaria de al menos un embrión sano y cinco de ellas quedaron embarazadas.

Rara vez se ofrece un DGP a pacientes sin aparente riesgo de aneuploidías en sus embriones. Sin embargo, un estudio de Yang *et al.*, 2012 justifica el uso de DGP mediante *arrays* CGH para mejorar los resultados en jóvenes pacientes en su primer ciclo de FIV. La razón es promover la transferencia única embrionaria (SET) reduciendo el embarazo múltiple y sus riesgos asociados. En este estudio, el primer randomizado de *array* CGH, las blastómeras fueron biopsiadas en día 5 de cultivo y se empleó el *array* CGH BlueGnome 24sure System®. El blastocisto euploide en cada caso fue transferido en día 6 de cultivo y se obtuvo, en comparación con el grupo control, mayor tasa de éxito. Esto se corresponde con otros estudios recientes en los que se ha observado que blastocistos de buena calidad morfológica pertenecientes a pacientes jóvenes de FIV son a menudo aneuploides (Fragouli *et al*, 2011) (Alfarawati *et al*, 2011). Otras de las ventajas que aporta la realización de esta técnica de selección embrionaria, además de las que aporta la SET por sí sola, es la reducción de embriones que son criopreservados innecesariamente y que probablemente fueran aneuploides. Supone también una reducción del tiempo hasta conseguir embarazo al no realizarse estas pacientes repetidas transferencias de embriones congelados no viables, dando lugar también a un importante ahorro de trastornos médicos y repercusiones psicológicas.

Otro tipo de *microarray* que se emplea para analizar el genoma completo es el *SNP array*. Los *SNP* representan a las variantes genéticas comunes encontradas en el genoma humano. Se han identificado más de diez millones en el genoma humano. Debido a su amplia distribución, estos polimorfismos se localizan en cualquier parte de la estructura de los genes y el genoma. Muchos ocurren en regiones no codificantes y no causan un fenotipo clínico. Sin embargo, de forma colectiva, contribuyen a las variaciones entre individuos y algunos están asociados a enfermedades.

Para DGP los *SNP arrays* se emplean en la detección de aneuploidías cromosómicas mediante cuatro estrategias distintas. La primera, desarrollada por Kearns *et al.*, consiste en amplificar el genoma completo a partir de células cromosómicamente normales. Esto permite detectar la aneuploidía a través del análisis de las características de los *SNP* de la misma forma que se haría con una muestra de ADN. En la práctica, esta estrategia es difícil de reproducir.

Una alternativa a este método, es la desarrollada por el equipo de Treff. Ellos proponen el empleo de métodos estadísticos para examinar la distribución del número de copias de todos los *SNPs* de un cromosoma concreto (Treff *et al.*, 2010). Hasta la fecha, esta estrategia no se ha utilizado en otras plataformas de *microarrays* de *SNP*. Hay que tener en cuenta que la aplicación clínica de *microarrays* de *SNP* es difícil de compaginar con el trabajo diario. Su uso se convierte en un desafío cuando se pretende realizar un *screening* embrionario para posteriormente realizar una transferencia en fresco de los mismos. Esto ha hecho que la mayoría de grupos opten por métodos de PCR cuantitativa mucho más rápidos.

La tercera estrategia desarrollada por Rabinowitz *et al.*, 2012 se basa en el uso de algoritmos bioinformáticos para mejorar el genotipado de *SNPs* en una única célula y detectar aneuploidías identificando haplotipos específicos paternos. Sin embargo, los resultados son muy similares a los proporcionados por otros métodos como la Hibridación fluorescente *in situ* (FISH).

Y por último, el *Kariomapping*, técnica que combina el análisis mendeliano con el genotipado de alta densidad mediante *SNPs*. Consiste en un método universal de análisis de defectos génicos simples (SGD) combinado con la detección de anomalías citogenéticas que incluyen trisomías, monosomías y deleciones (Handyside *et al.*, 2010). Se emplean *SNPs* para identificar el origen parental de cada *loci* afecto para cada embrión. Esto supone una ventaja de gran utilidad clínica sobre otros métodos como la CGH o RealTime-PCR donde el origen parental de la mutación no se

determina. Aproximadamente se utilizan unos 300000 SNPs que cubrirían cualquier SGD. Si el *loci* afecto en el ADN del portador de la mutación coincide con la sección del ADN del embrión, el embrión también será portador del desorden génico. Si la sección de ADN afecto no se ve en el embrión este estará libre de la mutación y podrá ser transferido.

Los *microarrays* capaces de genotipar más de un millón de SNPs constituyen una herramienta rápida y coste-efectiva de genotipado para gran cantidad de muestras. Existen más de cien métodos distintos de genotipado para SNPs. La plataforma ideal para el genotipado debería tener alta capacidad a precio asequible, ser simple y robusta, con baja tasas de error y un sistema automatizado de asignación de alelos.

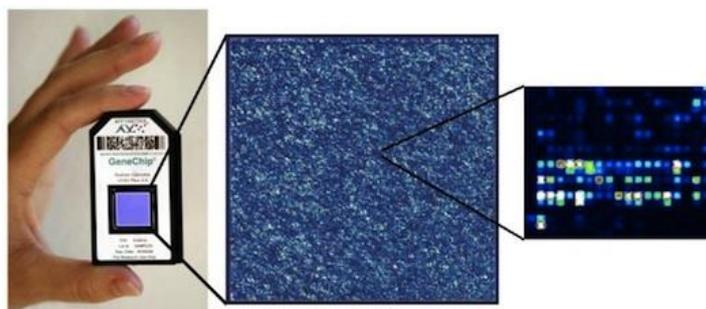


Figura 21. *Microarray* Genechip® (Affimetrix, CA, Estados Unidos)

Los más conocidos son las sondas TaqMan®, Genechip® (Figura 21), MassEXTEND® o los *Microspheres*.

El análisis del genoma completo muestra menor tasa de error que la FISH y mejora los resultados en términos de tasa de embarazo (Scott *et al*, 2012). Pero es necesario saber diferenciar la información que verdaderamente es útil a nivel clínico de la que solo sirve para complicar el tratamiento.

1.6.2. Proteómica.

La proteómica es una tecnología prometedora para el desarrollo de un método no invasivo de selección embrionario.

El proteoma es complejo y dinámico, con más de un millón de moléculas cambiando constantemente. Se conoce poco del proteoma embrionario a pesar de la tecnología existente. El estudio del proteoma humano puede proporcionarnos información de la fisiología celular y de su función. Además el análisis del secretoma (proteínas producidas y secretadas por el propio embrión) supone una aproximación no invasiva (Katz-Jaffe *et al.*, 2009) que nos ayudaría a comprender la embriogénesis temprana y el papel del embrión en la implantación. En fecundación *in vitro* el secretoma incluye las proteínas producidas y secretadas por el propio embrión al medio de cultivo que le rodea.

Los primeros estudios del secretoma humano analizaron de forma individual proteínas y moléculas. El factor 1-alkilglicerofosfolina O-acetiltransferasa (PAF) fue una de las primeras moléculas identificadas en el secretoma (O'Neill *et al.*, 2005). Está producida por embriones mamíferos en periodo preimplantatorio y actúa como factor de supervivencia.

Mientras se estudiaba la relación entre el endometrio y el embrión se vio que la leptina también establece un diálogo con el endometrio materno y los receptores de la leptina durante la ventana de implantación. Los blastocistos competentes secretan una alta concentración de leptina en el medio que los rodea (Gonzalez *et al.*, 2000) (Cervero *et al.*, 2005).

Otro factor expresado por las células del epitelio endometrial es el Homeobox A10 (HOXA10) y su regulación es modulada por moléculas solubles desconocidas secretadas por el blastocisto (Sakkas *et al.*, 2003).

El antígeno de histocompatibilidad G (HLA-G) desempeña un papel importante en la interfase materno-embionaria durante la implantación. Se detecta en el medio de cultivo embrionario (Jurisicova *et al.*, 1996) (Yao *et al.*, 2005). Su presencia está asociada al embarazo representando un posible marcador no invasivo de implantación embrionaria (Warner *et al.*, 2008). Sin embargo, varios estudios han observado que no existe correlación entre la HLA-G y la morfología (Noci *et al.*, 2005) y otro estudio más reciente concluye que no detecta asociación entre la expresión de HLA-G y las

tasas de implantación, pero sí que existe un descenso en las tasas de aborto cuando los embriones se seleccionaron morfológicamente junto con los niveles de HLA-G respecto a los casos en los que los embriones se seleccionaron únicamente por criterios morfológicos (Kotze *et al.*, 2010).

Con los recientes avances en proteómica y la mejora de la sensibilidad de las técnicas han aumentado las investigaciones del secretoma humano. Los *microarrays* de proteínas se han usado para caracterizar el secretoma. En un estudio retrospectivo de Domínguez *et al.*, 2008 se compararon dos medios de cultivo diferentes. Uno de los medios pertenecía a blastocistos que implantaron y el otro a los que no implantaron en ciclos de fecundación *in vitro* con transferencias embrionarias únicas. Un aumento en la expresión de Factor de necrosis tumoral (TNF) e interleukina 10 (IL-10), un descenso de Mouse Sp (MSP α), Complejo S-box (SCF), quimiocina CXC ligando13 (CXCL13), Inductor de apoptosis relacionado con TNF ligando receptor 3 (TRAILR3) y Proteína inflamatoria de macrófagos (MIP 1 β) se observó en el medio de embriones que implantaron. CXCL13 y factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófago (GM-CSF) (promotor del desarrollo embrionario y de la implantación (Robertson *et al.*, 2007)) indicaban un consumo de esas proteínas por parte del blastocisto.

1.6.3. Transcriptómica.

La transcriptómica estudia y compara transcriptomas, es decir, los conjuntos de ARN mensajeros o transcritos presentes en una célula, tejido u organismo.

Puede ser usada para varias aplicaciones relevantes en FIV. Desde una perspectiva analítica permite la comparación de diferentes estadios embrionarios. Desde una perspectiva clínica la identificación de embriones no deletéreos a nivel alélico o biomarcadores predictivos de implantación. El objetivo de muchos estudios de transcriptómica es identificar biomarcadores que se correlacionen con la fisiología, tales como el potencial del blastocisto.

La tecnología actual es más sensible para la caracterización de todo el ARN de la célula (transcriptoma) que para el contenido proteico. Los perfiles de expresión de ARN procedentes de blastómeras biopsiadas podrían usarse para un *screening* preimplantacional.

Niveles de transcritos de ciertos genes de células del cúmulo se han visto asociados a la calidad embrionaria (Cillo *et al*, 2007) y al embarazo (Assou *et al*, 2008) (Assidi *et al*, 2011).

El ADN complementario (cADN) puede ser amplificado de una blastómera para estudiar el transcriptoma de esa célula por *microarrays* (Kurimoto *et al*, 2007) por lo que el *screening* de blastocistos por *microarrays* es viable.

Por otro lado se ha visto que los ovocitos producidos de forma natural tienen una composición distinta a nivel de transcritos que los producidos por FIV. Lo que sugiere que los transcritos pueden variar y que es probable que algunos ovocitos tengan un perfil de expresión de ARN más próximo al natural. Por ello y aunque todavía existen ciertas limitaciones a la hora de identificar todas las moléculas del ARN de una célula, se postula que será posible distinguir el perfil transcrito de las células del ovocito con alta probabilidad de embarazo respecto de los de baja probabilidad (Uyar *et al*, 2013).

En el momento de decumular los ovocitos tras su captación se puede realizar el análisis de las células del cúmulo. Estas células han compartido microambiente con el ovocito por lo que la huella de ese microambiente folicular persistirá en su transcriptoma. Por lo tanto, basándose en el transcriptoma sería posible identificar ovocitos con alto riesgo de anomalías cromosómicas y así disminuir el número de abortos espontáneos y síndromes aneuploides (Bruce, C. Uyar, A. (2013).

Finalmente, hay que recordar que la fisiología de una célula es resultado de la estructura y función de sus proteínas, y más indirectamente de su ARN. Pero a pesar de ello la transcriptómica es una técnica prometedora para entender el desarrollo y la valoración embrionaria (Bruce, C. Uyar, A. (2013).

1.6.4. Actividad mitocondrial y análisis de la respiración.

Los ovocitos están enriquecidos en mitocondrias en comparación con otras células del cuerpo. Las mitocondrias contienen su propio genoma y se transmiten exclusivamente a través de la línea germinal femenina siendo su genoma muy susceptible a radicales libres. El ADN mitocondrial (mtADN) se localiza en el interior de la organela y cuando se generan radicales libres promueve mutaciones en el ADN y genera más mtADN dañado creando un círculo vicioso y acabando en muerte

celular. Esta acumulación de mtADN dañado durante la profase I proporciona una explicación convincente de los cambios ovocitarios relacionados con la edad. Los ovocitos con poco mtADN muestran un desarrollo pobre y se relacionan con la baja reserva ovárica. Las mutaciones del mtADN aumentan con la edad por lo que la edad avanzada reduce la capacidad mitocondrial para producir ATP, que es la principal función mitocondrial, y así la calidad del embrión también se verá afectada.

La medición del consumo de oxígeno podría evaluar de forma más directa y no invasiva la función mitocondrial. Las primeras mediciones de consumo de oxígeno en ovocitos y embriones de mamíferos fueron realizadas en los años cuarenta. La técnica demostró que los grupos de blastocistos consumían más oxígeno que los embriones en estadios más primitivos. Más tarde un estudio de Balaban *et al* demostró que el 50-70% del oxígeno consumido por el blastocisto deriva de la fosforilación oxidativa para generar ATP. Queda demostrado que los embriones sanos y en estadio de blastocisto consumen más oxígeno que aquellos bloqueados y abocados a la muerte celular.

En las etapas iniciales de muerte celular se dan cambios en las mitocondrias. El consumo de oxígeno puede indicar alteración en las mitocondrias y bajada en la competencia. Por lo tanto, la medición de oxígeno para evaluar la salud mitocondrial y la producción de ATP está directamente relacionada y determina de forma directa la competencia del ovocito y del embrión preimplantacional.

1.6.5. Análisis de carbohidratos.

La investigación de los carbohidratos en Embriología se ha centrado principalmente en el análisis del consumo de piruvato y glucosa y la producción de lactato. En 1989 Hardy *et al* describieron un alto consumo de piruvato en aquellos embriones que se desarrollan hasta blastocisto. Consecuentemente Conaghan *et al*, 1993 midieron el consumo de piruvato y lo relacionaron con la implantación y el embarazo clínico. Su estudio demostró que la implantación embrionaria tras transferencia en día 2 y 3 de cultivo era inversamente proporcional al consumo de piruvato en embriones de 2 a 8 células. Aunque estos hallazgos eran contrarios a los estudios iniciales parece que esa diferencia se debe a los resultados evaluados; la formación de blastocistos en uno de los estudios y la implantación en el otro.

Gardner *et al* 2001 investigaron también el metabolismo del piruvato en relación con la formación de blastocistos. Ellos sugieren que el consumo de piruvato en día 4 es significativamente más alto en embriones que forman blastocistos frente a los embriones que no los forman. Estos resultados se correlacionan con los estudios iniciales.

Otro de los aspectos fundamentales del metabolismo de los carbohidratos es el consumo de glucosa, reflejo de la actividad glucolítica. Se postula que el consumo de glucosa refleja el potencial de desarrollo del embrión. La mayoría de estudios que han analizado el consumo de piruvato también lo han hecho de glucosa simultáneamente. De acuerdo con los primeros hallazgos, desde día 2 a 4, el consumo de glucosa y conversión en lactato por el embrión que se desarrolla hasta blastocisto es igual al de los embriones que se detienen.

Sin embargo, otros grupos como el de Gardner sí que ven un aumento en el consumo de glucosa en día 4 y como consecuencia se produce la formación de blastocistos. Hay que tener en cuenta que la composición de los medios de cultivo utilizada en ambos estudios es distinta, lo que podría afectar al consumo de nutrientes y a la producción de metabolitos por parte del embrión.

Este factor, junto con otras variables relacionadas con el cultivo embrionario posiblemente justifiquen estos resultados contradictorios. En general, el metabolismo de los carbohidratos durante el periodo preimplantacional podría darnos información útil sobre el potencial de desarrollo de un embrión pero nunca solo como biomarcador de selección embrionaria, sino acompañado de los actuales criterios morfológicos.

1.6.6. Recambio de Aminoácidos.

El aumento en la tasa de formación de blastocistos se consiguió principalmente al añadir al medio de cultivo aminoácidos esenciales y no esenciales. Consecuentemente, el consumo o la producción de ciertos aminoácidos se convirtieron en objeto de estudio para la búsqueda de patrones específicos que se relacionaran con la formación de blastocistos.

Usando HPLC el equipo de Houghton examinó un total de 18 aminoácidos en diferentes etapas del desarrollo y demostraron que embriones que forman blastocistos reflejan un perfil aminoacídico diferente que aquellos embriones que se detienen. Concretamente, bajo consumo de glutamina,

arginina y metionina y baja producción de alanina y asparragina en embriones de día 2 y 3 en relación a la formación de blastocisto. En el mismo estudio en embriones en 8 células y mórula se encontró correlación entre desarrollo a blastocisto y bajo consumo de serina y baja producción de alanina y glicina (Houghton *et al.*, 2002). Además el recambio aminoacídico, obtenido al sumar la producción y el consumo de aminoácidos, es bajo en embriones que progresan frente a los que se detienen siendo coherente con la hipótesis de “*quite metabolism*” propuesta por Leese en 2002.

En un estudio posterior del mismo grupo, se correlacionó el recambio aminoacídico con la implantación y el embarazo cuando los embriones se seleccionaban de acuerdo a los criterios morfológicos en día dos de cultivo. Un descenso en los niveles de glicina y leucina, y un aumento en los de asparragina en el medio de cultivo se asociaron al embarazo clínico y la tasa de recién nacido vivo.

A día de hoy no existe plataforma ómica con valor predictivo real en clínica o validada de forma prospectiva que sea mejor que los criterios morfológicos. Sin embargo, la combinación de estas tecnologías junto con la morfología puede aportar grandes avances en la selección embrionaria.

1.6.7. Metabolómica.

Desde principios de la década de los noventa ha ido emergiendo con fuerza la Metabolómica. Esta ciencia estudia el conjunto de metabolitos presentes en un sistema biológico, en particular en biofluidos como orina, sangre, el fluido cerebroespinal, la saliva o incluso en tejidos o cultivos celulares. Uno de los padres de la Metabolómica el Dr. Jeremy Nicholson, acuñó el término Metabolómica, definiéndolo como la medida cuantitativa y multiparamétrica de la respuesta de un ser vivo a un estímulo fisiopatológico o a una modificación genética (Nicholson, 2008).

Los metabolitos son moléculas de bajo y medio peso molecular (< 1.500 Dalton) que intervienen en los procesos celulares y aportan información de cómo está funcionando el metabolismo en un ser vivo. La ausencia o presencia de algunos de estos metabolitos, así como su concentración, puede ser un indicador de enfermedad o de factores de predisposición a ella.

La Metabolómica pretende obtener de manera simultánea y global, los perfiles correspondientes a múltiples concentraciones de metabolitos y sus fluctuaciones. Sin embargo, medir el metaboloma es

un reto analítico debido a la complejidad química y heterogénea de algunos metabolitos, la matriz en la que se encuentran, su naturaleza lábil y la falta de técnicas automatizadas que permitan medir gran número de moléculas de naturaleza desconocida.

La primera aproximación consiste por tanto en la medida de la huella metabólica en un entorno biológico determinado. Normalmente dispondremos de un espectro de picos obtenido por RMN. El objetivo es comparar los espectros de distintas muestras aplicando métodos de reconocimiento de patrones, sin necesidad de conocer la naturaleza de los picos de los espectros y por lo tanto de los metabolitos involucrados. De esta forma veríamos como se agrupan las muestras, y nos permitiría separar individuos o muestras, y al mismo tiempo podríamos definir grupos.

Una vez hemos clasificado las muestras hay que averiguar cuáles son las regiones del espectro que provocan dicha agrupación. Si somos capaces de asociarlas a determinados metabolitos, estaremos identificando los biomarcadores que intervienen en el proceso.

La segunda aproximación utilizada es el perfilado metabolómico, que consiste en seleccionar, a priori, el conjunto de metabolitos con los que queremos trabajar, en general los relacionados con una determinada ruta, y analizar cómo evoluciona. Esta aproximación se denomina *metabolic targeting*, y se suele aplicar cuando tenemos bien definido el experimento y conocemos los marcadores involucrados en el proceso que estudiamos.

1.7. Metabolómica y Medicina.

La Metabolómica se ha postulado en los últimos años como una herramienta atractiva para la detección, caracterización y estudio de numerosas enfermedades. Los estudios metabolómicos son cada vez más utilizados en la evaluación de toxicidad de nuevos fármacos, en el seguimiento de pacientes sometidos a nuevas estrategias terapéuticas, en la detección de marcadores y de perfiles diferenciales tanto en el diagnóstico como en la evaluación de riesgos en distintas enfermedades. El creciente interés en la Metabolómica en la investigación de nuevos biomarcadores de apoyo clínico se refleja en el creciente número de publicaciones. El entusiasmo generado por la Metabolómica se deriva del hecho de que proporciona una visión instantánea de la fisiología y fisiopatología de un órgano, tejido, células o fluidos. El metaboloma se encuentra mucho más cerca del fenotipo que el

genoma, el transcriptoma o el proteoma. Los metabolitos están relacionados más directamente a las respuestas funcionales de la célula que los niveles de proteína o mRNA.

Se ha estimado que el metaboloma humano contiene alrededor de 8000 metabolitos endógenos incluyendo aquellos producidos por enzimas codificados en el genoma y los derivados de la flora intestinal. Desafortunadamente, estos metabolitos son muchos y muy diversos. Aunque el objetivo sea detectar todos los metabolitos presentes en una muestra, esto no es posible por el amplio espectro de concentraciones de los metabolitos y su gran diversidad en propiedades químicas. El resultado de un estudio metabolómico depende mucho o del proceso de extracción de los distintos componentes o de la abundancia natural de los metabolitos determinados.

La Metabolómica es una técnica que proviene del mundo farmacéutico, donde tradicionalmente se ha empleado para evaluar los perfiles farmacocinéticos/farmacodinámicos de compuestos en desarrollo en modelos animales. Esta aplicación, vigente hoy día, aporta una información fundamental en las fases de desarrollo preclínico, fundamentalmente en lo que se refiere a los productos resultantes de la degradación metabólica de los fármacos en el organismo. En los últimos años, los avances en el desarrollo de *hardware*, y el incremento de la sensibilidad de los equipos empleados, han permitido extender su aplicación al análisis de biofluidos animales/humanos (suero, sangre, orina, etc.) para todo tipo de aplicaciones clínicas. En la actualidad, se considera que es una de las técnicas que mejor refleja el estado fisiológico del individuo, lo que permite el estudio de cambios dinámicos en los organismos (presencia/ausencia de enfermedad, evolución del paciente, etc.).

Entre las aplicaciones actuales de la metabólica podemos encontrar la aplicación de la misma en las distintas etapas en el desarrollo de nuevos fármacos. También tiene un enorme potencial en la monitorización de intervenciones nutricionales, a partir de la medida del cambio provocado por un determinado alimento sobre determinados grupos de metabolitos. Además se ha visto su eficacia en la monitorización de los trasplantes de órganos (Li, 2013).

Un ámbito de aplicación emergente es el diagnóstico de enfermedades, especialmente en cáncer, enfermedades neurológicas y metabólicas, así como en la medicina personalizada. Actualmente, cuando elegimos un tratamiento para una persona enferma, conocemos muy poco sobre su fenotipo y sobre las reacciones frente al tratamiento elegido. El uso de las tecnologías "ómicas" como base

instrumental que sirva de impulso a la introducción de la medicina personalizada basada en perfiles específicos de los individuos constituye una prioridad temática.

El conocimiento de las variables metabolómicas debería servir para predecir la reacción de un ser vivo a la administración de los medicamentos o nutrientes, de tal manera que el tratamiento podría adaptarse a cada individuo, eligiendo el mejor principio activo y dosis para este (Farmacometabolómica).

1.7.1. Plataformas analíticas.

Para analizar el perfil metabólico de un sistema biológico se necesita tecnología específica. Esta tecnología incluye herramientas como la Resonancia Magnética Nuclear (RMN), la Espectrometría de Masas (MS) o la Espectroscopía Vibracional.

La MS permite separar distintos metabolitos por su masa con gran precisión. Para ello, es necesario adaptar el proceso de preparación de muestra a los metabolitos que se pretende detectar mediante distintos protocolos de extracción y el uso de distintas columnas de cromatografía líquida (LC). Sus ventajas incluyen una alta sensibilidad (concentraciones nanomolares o inferiores) y la posibilidad de generar perfiles de miles de señales de los metabolitos en menos de 30 minutos por muestra. Las limitaciones de la técnica incluyen un proceso de preparación de muestra elaborado y dirigido a los metabolitos concretos a detectar y posibles dificultades en la cuantificación debido a las variaciones en la eficiencia de ionización. Estas limitaciones no afectan a la gran potencia de la LC-MS como técnica metabolómica. De hecho, la LC-MS no tiene rival en la caracterización de un grupo de metabolitos de alta relevancia como son los lípidos. Todo ello hace a la LC-MS ideal para los estudios metabolómicos dirigidos en los que se pretende estudiar grupos de metabolitos muy concretos para confirmar hipótesis mecanísticas y validar posibles biomarcadores.

Son técnicas altamente eficientes en la detección y cuantificación de metabolitos de bajo peso molecular. Sin embargo todas las técnicas cromatográficas consumen parte de la muestra. Son técnicas relativamente lentas, poco reproducibles y poco versátiles con identificación dificultosa de nuevos compuestos. Existen además ciertas limitaciones en la falta de estandarización de los métodos entre las diferentes plataformas y fabricantes, poca robustez y un tratamiento de muestra tedioso.

Otro grupo de técnicas analíticas son las incluidas en el grupo de la espectroscopía vibracional: Infraroja (IR) y Raman. Se basan en la absorción de energía y la vibración de los enlaces químicos de las moléculas al exponer una muestra a una radiación electromagnética.

La espectroscopía Raman mide la dispersión de la radiación electromagnética por las moléculas que vibran por el efecto de la exposición a longitudes de onda corta. La espectroscopía Raman, con un elevado coste económico, tiene la ventaja de que no sufre interferencias a causa del agua y por ello permite medir directamente fluidos biológicos.

Por otro lado, la IR es el resultado de la absorción de radiación electromagnética cuando la muestra es sometida a radiación IR. Esta espectroscopía se divide en función de la longitud de onda utilizada en NIR (infrarroja cercana) y FT-IR. La NIR ha sido una de las más utilizadas para analizar el medio de cultivo. Su principal ventaja es la cuantificación con alta sensibilidad. No permite la identificación de metabolitos sino que compara perfiles metabólicos. En cambio la FT-IR tiene baja sensibilidad y es poco selectiva en comparación con MS.

1.7.2. Resonancia Magnética Nuclear.

La RMN es un método relativamente moderno en comparación con otras espectroscopías pues data de 1946, año en el que Purcell de la Universidad de Harvard y Bloch y Packard de la Universidad de Stanford obtuvieron los primeros resultados y elaboraron la teoría. El primer espectro con señales separadas para una molécula orgánica se obtuvo en 1951. Desde entonces esta técnica no ha dejado de desarrollarse y convertirse en una herramienta analítica indispensable para la Medicina.

La RMN permite detectar un amplio número de metabolitos si se encuentran en suficiente abundancia natural y contienen átomos de hidrógeno. Entre sus ventajas destacan la alta reproducibilidad, la eficiencia de muestreo (10-15 minutos de medida por muestra), la poca preparación de muestra necesaria y su carácter no destructivo. Como desventajas, incluye la baja sensibilidad (límite de detección en el orden de milimolar), el alto grado de solapamiento de sus señales incluso a alto campo, y la falta de bases de datos sistematizadas que permitan la identificación unívoca de las señales. A pesar de ello, sus ventajas hacen de la RMN una técnica inigualable para el estudio de grandes series de muestras, estudios epidemiológicos, y detección de huellas metabólicas

con valor clasificatorio, diagnóstico, pronóstico o predictivo. Por otra parte, su carácter no destructivo permite que la muestra sea utilizada posteriormente para la realización de otros análisis. Todas estas características hacen de la RMN una técnica ideal para el estudio de la Metabolómica y la búsqueda de perfiles metabólicos diferenciales entre grupos con el objetivo de identificar posibles biomarcadores y establecer nuevas hipótesis.

1.7.2.1. Fundamentos físicos de RMN.

La resonancia es un fenómeno físico basado en las propiedades de los núcleos atómicos. Un átomo consta de un núcleo rodeado por electrones, los cuales presentan dos movimientos, el orbital alrededor del núcleo y el espín sobre sí mismo. Estos dos movimientos forman el momento angular. El movimiento orbital de las cargas dentro del núcleo es equivalente a una pequeña corriente eléctrica que genera un campo magnético. A este efecto se suma el aportado por el espín. Cuando los núcleos se colocan en un campo magnético externo, la rotación se convierte en una precesión (movimiento que describe un cono de giro) alrededor del campo magnético externo (Figura 22).

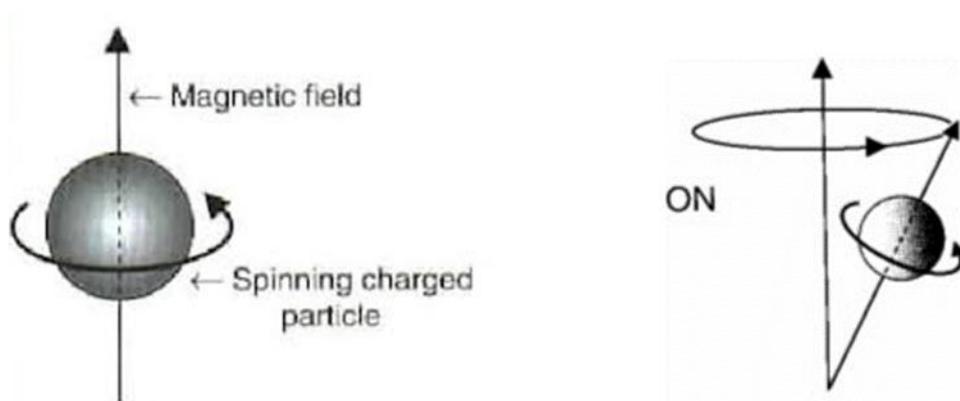


Figura 22. Movimientos orbital, espín y de precesión. Adaptado de <http://la-mecanica-cuantica.blogspot.com>

La RMN puede utilizarse sólo para estudiar núcleos atómicos con un número impar de protones o neutrones (o de ambos). Esta situación se da en los átomos de ^1H , ^{13}C , ^{19}F y ^{31}P . Este tipo de núcleos son magnéticamente activos, es decir poseen espín, igual que los electrones, ya que los núcleos tienen carga positiva y realizan un movimiento de rotación sobre un eje que hace que se comporten como si fueran pequeños imanes. En ausencia de campo magnético, los espines nucleares se orientan al azar. Sin embargo cuando una muestra se coloca en un campo magnético, tal y como se muestra en la Figura 23, los núcleos con espín positivo se orientan en la misma dirección del campo o en orientación paralela, en un estado de mínima energía denominado estado de espín α , mientras que los núcleos con espín negativo se orientan en dirección opuesta a la del campo magnético o antiparalela, en un estado de mayor energía denominado estado de espín β .

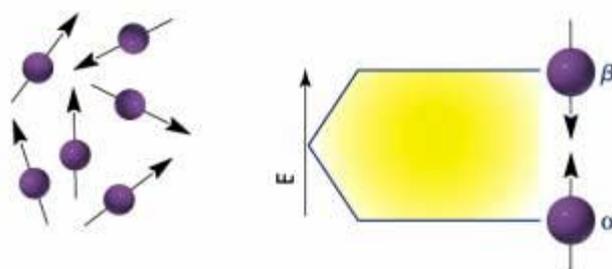


Figura 23. Estados de espín. Adaptado de <http://www.sinorg.uji.es/>

La diferencia de energía entre los dos estados de espín α y β , depende de la fuerza del campo magnético aplicado. Cuanto mayor sea el campo magnético, mayor diferencia energética habrá entre los dos estados de espín.

Cuando una muestra que contiene un compuesto orgánico es irradiada brevemente con energía electromagnética, los núcleos en el estado de espín α o de baja energía son promovidos al estado de espín β o de alta energía y viceversa. Para conseguir el paso de un nivel de energía a uno excitado se necesitan ondas de radiofrecuencia de baja intensidad. Esto convierte a la resonancia en una técnica inocua para su uso en organismos vivos.

Tras cesar el pulso, los espines nucleares vuelven a su estado de equilibrio y emiten señales cuya frecuencia depende de la diferencia de energía entre los estados de espín α y β . Esta relajación ocurre

mediante el movimiento de precesión en torno al campo magnético principal que genera una corriente oscilante en una bobina receptora. A medida que los núcleos regresan a la situación de equilibrio la señal disminuye hasta hacerse cero. Esta caída de la señal se conoce como caída libre de la inducción (*Free Induction Decay*) (FID) y da lugar a la señal de RMN. La FID es una onda dependiente del tiempo que puede convertirse en un espectro de señales en función de su frecuencia, utilizando una función matemática conocida como Transformada de Fourier (FT). El espectrómetro las transforma y registra como una gráfica de frecuencias frente a intensidad, que es el llamado espectro de RMN (Figura 24).

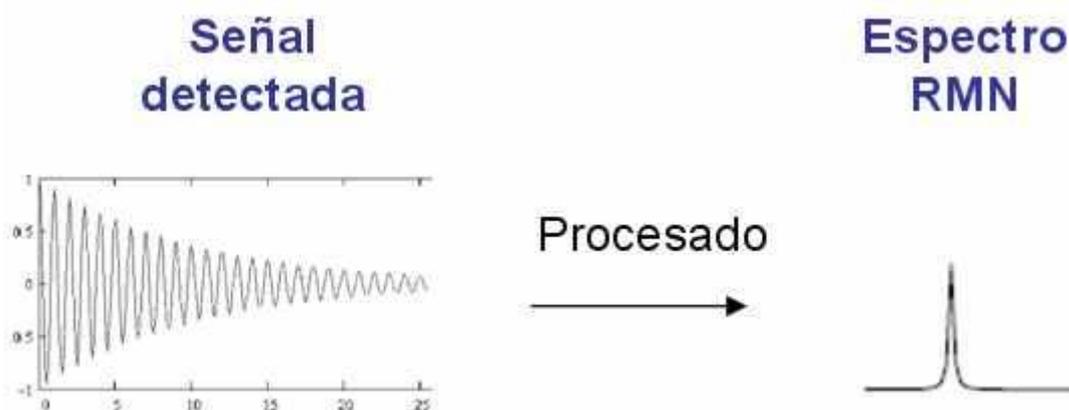


Figura 24. Proceso de formación del espectro. Aplicación de la FT para pasar de FID al espectro de RMN. Adaptado de <http://desoft03.usc.es/rmnweb/rmnspect.html#spect4>

1.7.2.2. El espectrómetro de RMN.

El espectrómetro de RMN tal y como se observa en la figura 25 consta de cuatro partes:

1. Un imán estable, con un controlador que produce un campo magnético preciso.
2. Un transmisor de radiofrecuencias, capaz de emitir frecuencias precisas.
3. Un detector para medir la absorción de energía de radiofrecuencia de la muestra.
4. Un ordenador y un registrador para realizar las gráficas que constituyen el espectro de RMN.

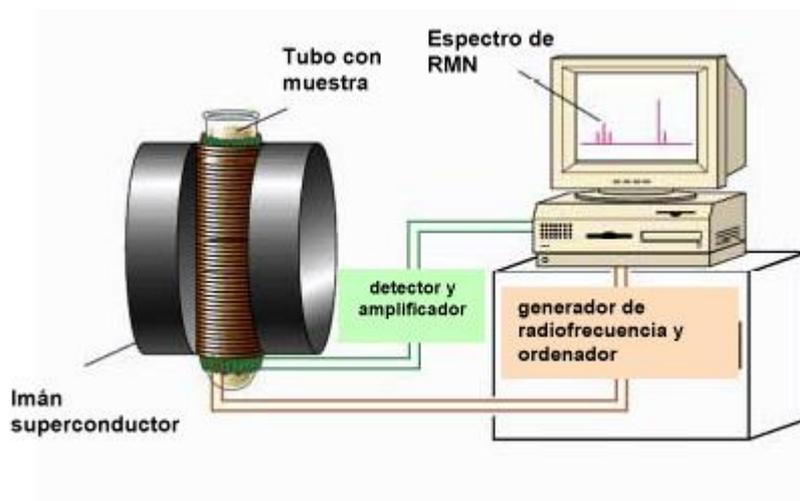


Figura 25. Esquema de espectrómetro de RMN. Adaptado de <http://www.sinorg.uji.es/>

1.7.2.3. Resonancia Magnética Nuclear de ^1H . Apantallamiento por los electrones.

Los núcleos, como pueden ser los protones o los carbonos que forman las moléculas orgánicas, no se encuentran aislados sino que están rodeados de electrones que los protegen parcialmente del campo magnético externo al que se ven sometidos. Los electrones se mueven generando un pequeño campo magnético inducido que se opone al campo magnético externo. El resultado de este hecho es que el campo magnético que realmente llega al núcleo es más débil que el campo externo, por tanto, se dice que el núcleo está apantallado. Este apantallamiento es muy importante desde el punto de vista experimental ya que el campo magnético efectivo que experimenta un protón dentro de una molécula es siempre menor que el campo externo, y por lo tanto, para que el núcleo entre en resonancia dicho campo externo debe ser mayor. Los efectos de apantallamiento de las nubes electrónicas que rodean a cada protón son diferentes, lo que provoca diferentes frecuencias de emisión. El resultado es un espectro de diversas frecuencias donde cada conjunto de núcleos específicos da origen a una señal única de RMN. Así pues, un espectro de RMN es una gráfica de la intensidad de señal en función de la frecuencia de la energía electromagnética que liberan los núcleos de una muestra.

Las variaciones en las frecuencias de absorción de RMN, que tienen lugar debido al distinto apantallamiento de los núcleos, reciben el nombre de desplazamientos químicos. En RMN de alta

resolución el desplazamiento químico es un parámetro relevante. Dicha técnica ofrece elevada sensibilidad debido a la alta resolución. Un método más exacto para expresar desplazamientos químicos es determinar el valor respecto a un compuesto de referencia que se añade a la muestra. El compuesto de referencia más común en resonancia magnética nuclear es el tetrametilsilano (TMS, $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$).

En las muestras biológicas, la señal recibida es una mezcla de agua y metabolitos en disolución. Por lo que para observar las señales de los metabolitos hay que suprimir la señal del agua sometiendo la muestra a radiofrecuencias de baja intensidad y cuya frecuencia sea igual al pico del agua. Este método se conoce como presaturación.

El campo magnético de los equipos de RMN utilizados en Metabolómica es en general muy alto (superior a 10 Teslas) y existen sondas que permiten la medida en fluidos y también en muestras semisólidas como cultivos celulares, biopsias o tejidos.

Los núcleos más comúnmente empleados en RMN son el protio (^1H , el isótopo más sensible y abundante en RMN), el ^{13}C y el ^{15}N , aunque los isótopos de núcleos de muchos otros elementos (^2H , ^{10}B , ^{11}B , ^{14}N , ^{17}O , ^{19}F , ^{23}Na , ^{29}Si , ^{31}P , ^{35}Cl , ^{113}Cd , ^{195}Pt) son también utilizados. Por lo tanto en una muestra biológica, todas las moléculas que contengan hidrógeno (la mayoría de metabolitos) darán lugar a un espectro de ^1H RMN, siempre y cuando estén presentes en concentraciones por encima de los límites de detección (Duarte *et al.*, 2002; Amaral *et al.*, 2005). El espectro resultante del análisis genera un perfil característico metabólico para cada mezcla biológica compleja. Si el estatus de un organismo dado cambia, como sucede ante una enfermedad o la exposición a una droga, el perfil metabólico reflejará este cambio.

1.7.3. Técnicas exploratorias de datos. Análisis multivariable.

Para analizar la información proporcionada por un perfil espectral es necesario usar métodos analíticos conocidos como métodos quimiométricos. En 1975, la *International Chemometrics Society* (ICS) definió la quimiometría como “la disciplina química que utiliza métodos matemáticos y estadísticos para diseñar o seleccionar procedimientos de medida y experimentos óptimos, y para proporcionar la máxima información química mediante el análisis de datos químicos”. La técnica

consiste en comparar los espectros de las muestras de interés con los espectros controles, de forma que se puedan determinar las características espectrales provocadas por factores externos. No es necesario conocer previamente las concentraciones de metabolitos ya que mediante este análisis se agrupan las muestras basándose en las diferencias entre las muestras control y la muestra problema. Una vez conocidas las diferencias, conocer las concentraciones puede ser útil. Por lo tanto, tras la identificación podrán usarse como marcadores bioquímicos.

El siguiente paso será el reconocimiento de patrones. Este se basa en procedimientos de análisis multivariable que permiten analizar mucha información incluso a partir de pocas muestras. Es una herramienta ideal para el análisis de datos provenientes de las ómicas.

La representación de los datos supone un problema debido al elevado número de muestras y variables. De manera que para reconocer los patrones se dispone de técnicas de análisis multivariable como el análisis de componentes principales (PCA) (Figura 26). El objetivo del análisis discriminante es clasificar a los pacientes en varios grupos basándose en un conjunto de características.

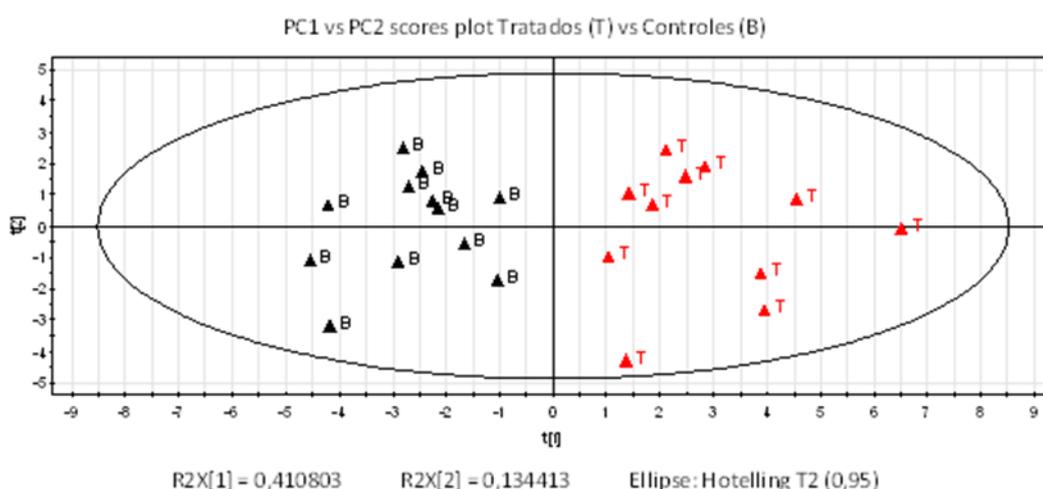


Figura 26: Representación del gráfico de scores de un análisis PCA del análisis por RMN de suero de individuos controles (B) y después de la administración de un fármaco (T).

La principal ventaja que ofrece el uso de esta técnica es la posibilidad de reducir conjuntos de datos multidimensionales a un nuevo conjunto de variables no correlacionadas mediante un análisis de covarianza entre factores. El PCA funciona descomponiendo una matriz X (que contiene el conjunto de datos original) como producto de dos matrices pequeñas, que son la de carga y de puntuación. La de carga da información sobre las variables y se compone de los Componentes Principales (PC), y la de puntuación informa sobre los objetos.

El PCA permite decidir cuantos PC se deben extraer. Normalmente los cuatro primeros explican más del 90% de la varianza. En patrones de datos espectroscópicos la mayoría de veces existe información redundante. Lo que significa que algunas variables estén correlacionadas. Así es posible reducir las variables observadas a un número menor de variables artificiales que son combinaciones de las originales y que representan a la mayoría sin perder información.

Los diagramas de *scores* de un análisis PCA permiten observar cómo se agrupan las muestras en función de la similitud o diferencia de su espectro de RMN y por tanto de su composición metabólica o de su metaboloma. En la técnica PCA el modelo se construye sin tener información previa de las muestras de una forma no supervisada (Rodríguez-Delgado MA *et al.*, 2002; Silva BM *et al.*, 2006).

Otra de las herramientas de análisis multivariable es el Análisis Discriminante por Mínimos Cuadrados Parciales (PLS-DA). Es un método de regresión lineal supervisado basado en la combinación de una matriz de datos espectrales y una matriz de valores cualitativos. El objetivo es encontrar variaciones relevantes en la matriz de datos espectrales que presenten un máximo de covarianza con el vector de información. El PLS-DA proporciona un método gráfico de fácil comprensión para identificar las regiones espectrales que marcan una separación entre clases, mostrando la bondad de la separación y la significancia estadística del resultado.

Sin embargo, las técnicas de análisis multivariable supervisado pueden dar lugar al sobreajuste debido al gran número de variables disponibles y el número reducido de grupos a clasificar. Para evitar esto, es necesario validar los resultados tanto experimental como estadísticamente. Tanto el PCA como el PLS-DA no permiten la identificación directa o cuantificación de los compuestos. Para identificar los compuestos se recurre a la comparación de los datos espectroscópicos obtenidos a partir de RMN de la muestra o librerías de referencia de datos espectroscópicos obtenidos a partir de

compuestos puros (Serkova *et al.*, 2007; Weljie *et al.*, 2006; Wishart, 2001). Una vez identificados los compuestos los datos se procesan estadísticamente (con PCA o PLS-DA) para identificar los biomarcadores más importantes o las vías metabólicas informativas (Weljie, 2006).

Tal y como se describe en el párrafo anterior para evitar el sobreajuste es necesario validar los resultados obtenidos. Para ello se recurre a técnicas de validación cruzada. Estas técnicas se adoptan para evaluar la capacidad predictiva y seleccionar la cantidad óptima de variables. Consiste en repetir y calcular la media aritmética obtenida de las medidas de evaluación sobre diferentes particiones. Se utiliza en entornos donde el objetivo principal es la predicción y se quiere estimar cómo de preciso es un modelo. Una de las modalidades de validación cruzada se conoce como la validación cruzada en ventana veneciana (*Venetian Blinds*) en la que a partir de la matriz de experiencia se selecciona una muestra cada X muestras. La muestra seleccionada formará parte de los subconjuntos utilizados para construir el modelo. Por lo tanto, el número de subconjuntos para la validación cruzada es determinado por X.

1.7.4. Ventajas del empleo de la RMN.

Entre las múltiples ventajas de la RMN está la de permitir examinar tejidos y fluidos biológicos sin tener que ser destruidos y con la posibilidad de que las muestras sean recuperadas para un análisis posterior.

Ofrece gran cantidad de información tanto estructural como cuantitativa de forma simultánea.

Tiene capacidad de identificar metabolitos de mezclas complejas sin necesidad de separar o preparar la muestra (Lindon *et al.*, 2004).

Comparado con otras técnicas, la RMN es potencialmente no invasiva. Emplea ondas de radiofrecuencia de baja intensidad, lo que la hace inocua.

Es reproducible y universal, cualquier instrumento debería dar los mismos resultados si se analiza la misma muestra.

Disminuye drásticamente el tiempo que requiere adquirir un escaneado del espectro completo de RMN, ya que explora simultáneamente todo el rango de frecuencias.

Permite la detección simultánea de un amplio rango de metabolitos estructuralmente distintos y la detección de los mismos a bajas concentraciones. Por lo que la hace una herramienta óptima para analizar muestras complejas como son los medios de cultivo usados para TRA, debido al alto poder de separación de metabolitos y resolución de picos.

Por todos estos motivos junto con su coste bajo y su rapidez nos hemos decantado por esta técnica para realizar nuestro estudio.

1.8. Modelos animales en investigación biomédica. El ratón como modelo animal en Embriología.

La investigación del desarrollo embrionario humano depende principalmente de los embriones obtenidos mediante TRA que son desechados por ser de menor calidad. Sin embargo, esto supone aspectos controvertidos a nivel ético e introduce subjetividad a los estudios dado que los embriones empleados son los sobrantes, que poseen peor calidad embrionaria. Gracias a los avances en los laboratorios de FIV, tanto en la obtención de ovocitos como en el cultivo embrionario, y su fácil aplicación a modelos animales resulta muy útil el empleo de estos en investigación. La experimentación animal se hace si cabe más imprescindible.

Históricamente el ratón, debido a sus múltiples similitudes con los humanos a nivel fisiológico y molecular, ha sido el modelo mamífero de experimentación ideal.

Los humanos y los ratones son similares morfológicamente durante el desarrollo preimplantacional. Además se conoce la secuencia completa de su genoma y posee un origen ancestral común. Son relativamente económicos y fáciles de obtener. Es por ello, que su empleo en el estudio de estos estadios de desarrollo temprano ha aportado conocimientos clave.

Sin embargo, existen diferencias específicas de especie que podrían limitar la extrapolación de algunos resultados al desarrollo embrionario humano. Una de las diferencias es que la activación génica del embrión de ratón se produce cuando el embrión se encuentra en estadio de 2 células mientras que en humanos esto sucede en tercer día de desarrollo, cuando se encuentra en 8 células. Por otro lado la compactación y formación del blastocisto es tardía en humanos con respecto al ratón,

debido principalmente a que los embriones humanos realizan al menos una ronda más de división celular antes de la implantación.

A pesar de estas desventajas y teniéndolas en cuenta a la hora de interpretar los resultados el empleo de embriones de ratón en la investigación biomédica sigue siendo una herramienta valiosa.

1.9. La Metabolómica en el estudio de la viabilidad embrionaria.

El primer grupo en estudiar el metabolismo del embrión preimplantatorio fue el grupo de Hardy en 1989. Examinaron los embriones hasta blastocisto y analizaron los niveles de piruvato y glucosa mediante ultramicrofluorescencia. Los resultados concluyeron que existe consumo de piruvato desde el primer al cuarto día de cultivo y no existe consumo de glucosa. A partir del quinto día sin embargo aumenta el consumo de ambos metabolitos.

Un estudio similar y empleando la misma herramienta analítica fue el realizado por Gott *et al.*, en 1990 con la diferencia de que fue analizado también el lactato. En sus resultados obtuvieron, además de los de Hardy, una producción elevada de lactato desde el tercer al quinto día de cultivo.

Siguiendo esa misma línea Conaghan *et al.*, 1993, Turner *et al.*, 1994 y Gardner *et al.*, 2001 obtuvieron resultados similares a Hardy y Gott empleando también ultramicrofluorescencia salvo que el grupo de Conaghan defendía que los embriones que implantaban mostraban un menor consumo de piruvato.

Houghton *et al.*, 2002 utilizando HPLC cuantificaron los aminoácidos en el medio de cultivo. Se observó que existían distintos patrones de uso de los aminoácidos en los embriones que formaban blastocistos comparados con aquellos que se bloqueaban. La conclusión fue la existencia de un consumo menor de glutamina, arginina y metionina en el grupo de blastocistos que se desarrollaban correctamente y un descenso en la producción de alanina y asparragina cuando se midió el medio de cultivo en día 2. Para el medio analizado en día 3 los resultados fueron distintos. Existía un menor consumo de serina en los embriones que formaban blastocistos y una liberación menor de alanina y glicina. Estudios similares han sido realizados en nuestro medio (Moreno et al, 2007).

Brison *et al.*, 2004 determinaron los niveles de 18 aminoácidos en medio de cultivo donde permanecieron durante 24 horas embriones de dos células. Usando HPLC encontraron un elevado nivel de asparragina y un descenso en los niveles de glicina y leucina en embriones que dieron embarazo.

Seli *et al.*, publicaron en 2007 el primer estudio sobre viabilidad embrionaria utilizando como plataforma analítica la espectroscopía IR cercana y Raman para analizar el medio de embriones que implantaron frente a los que no implantaron. Aunque no encontraron marcadores específicos sí pudieron obtener espectros diferenciales entre los dos grupos. El mismo equipo en 2008 publica la primera identificación de marcadores de viabilidad utilizando esta vez para realizar el análisis RMN en un estudio con 34 pacientes. Ellos encuentran diferencias significativas en el glutamato entre ambos grupos de embriones.

Scott *et al.*, 2008 mediante el empleo de espectroscopía Raman correlacionaron la implantación con el perfil metabólico del medio de cultivo en día 3 y 5, que fueron los días en que los embriones se transfirieron. Vergouw *et al.*, en el mismo año obtuvo los mismos resultados empleando esta vez NIR.

En 2010 el equipo de Seli hizo un importante estudio con un tamaño muestral de 485 pacientes correlacionando la implantación con el perfil metabólico del medio de cultivo en día 2 y 3 y empleando NIR. Los resultados revelan que no existe relación alguna entre la morfología embrionaria y el perfil metabólico embrionario. Sin embargo, sí existe relación entre la implantación y el perfil metabólico. A raíz de estos resultados Ahlstrom *et al.*, 2011 repitieron el estudio pero utilizando medio de cultivo de embriones en día 5 concluyendo que el perfil metabólico tenía poder predictivo del potencial de implantación de un blastocisto.

Seli *et al.*, 2011 empleando también NIR realizaron un estudio similar al de Ahlstrom pero correlacionándolo con el embarazo en lugar de la implantación. Para ellos el perfil metabólico solo o en combinación con la clasificación morfológica tiene potencial para ser el mejor predictor de embarazo. Aunque el equipo de Hardarson tan solo un año después no encuentra diferencias significativas realizando el mismo estudio pero con un tamaño muestral de 327 frente a 198 del estudio de Seli.

Tampoco encuentran diferencias Vergouw *et al.*, 2012 ampliando el mismo estudio que realizaron ellos mismos en 2008 pero esta vez correlacionando el perfil con la tasa de nacimientos. Sfontouris *et al.*, 2011 a diferencia de los anteriores sí encuentra que la tasa de implantación aumenta cuando la selección embrionaria se hace basándose en el empleo del análisis metabólico.

El estudio más reciente corre a cargo del grupo de Kirkegaard en 2014. Ellos han analizado mediante RMN el perfil metabólico del medio de cultivo embrionario en día 3 y día 5 sin encontrar poder de predicción de embarazo mediante la técnica. Sin embargo, hay que destacar que la concentración de medio empleado así como la dilución realizada suponen limitaciones importantes en el estudio.

En la actualidad la selección de los embriones obtenidos mediante TRA se basa casi de forma exclusiva en criterios de selección morfológicos. Dada la subjetividad de los mismos y la baja efectividad son necesarios nuevos criterios de selección complementarios que ayuden a seleccionar los embriones con mayor potencial de implantación. La ineficiencia a la hora de seleccionar los embriones nos obliga a aumentar las tasas de embarazo a costa de transferir más de un embrión en la mayoría de casos. Esto conlleva un aumento de la tasa de gestación múltiple y como consecuencia un problema socioeconómico y sanitario importante. Una posible solución al problema es transferir únicamente un embrión, pero para ello y principalmente para elegir el adecuado es necesario mejorar los criterios de selección existentes. Entre las posibles tecnologías disponibles nos vamos a decantar por la Metabolómica como herramienta complementaria de selección embrionaria. Para el estudio de la Metabolómica usaremos la RMN como plataforma analítica y embriones de ratón como modelo animal para la validación de nuestro estudio.





OBJETIVOS.



2. Objetivos.

Objetivo principal

- Obtener un perfil metabólico del medio de cultivo embrionario mediante RMN.
- Identificar un biomarcador, definido como conjunto de metabolitos, relacionado con la implantación embrionaria en día 2 de cultivo.
- Construir, mediante técnicas quimiométricas de análisis discriminante, un modelo predictivo de implantación embrionario basado en el perfil metabólico obtenido.

Objetivo secundario

- Emplear embriones de ratón como modelo animal para la validación del biomarcador obtenido a partir del análisis mediante RMN del medio de cultivo embrionario.





MATERIAL Y MÉTODOS.



3. Material y métodos.

3.1. Población de estudio.

En base a los objetivos planteados nuestro estudio quedó dividido en dos partes. En la primera parte se emplearon medios de cultivo de embriones humanos para obtener el perfil metabólico mediante RMN, crear un modelo predictivo de implantación embrionaria y finalmente, identificar un conjunto de metabolitos que constituyan un biomarcador previo de implantación embrionaria. Basándonos en los resultados obtenidos en esta primera parte realizamos un segundo estudio en el que se usará un modelo animal para validar el biomarcador obtenido en la primera parte.

Para el estudio de los medios de cultivo embrionarios humanos se incluyeron un total de 78 muestras del medio de cultivo de 78 embriones procedentes de 40 pacientes que se encontraban realizándose ciclos de FIV en el Consorcio Hospital General Universitario de Valencia (CHGUV) entre los años 2010-2012. Dichas pacientes fueron incluidas en el estudio en base a los siguientes criterios de inclusión.

- Edad comprendida entre 18 y 40 años.
- Esterilidad primaria.
- Transferencias embrionarias realizadas en día 2 de cultivo.
- Sémenes no procedentes de donante.
- Sémenes no obtenidos mediante procedimiento quirúrgico.

Todas las pacientes incluidas en el estudio firmaron previamente a la realización de la TRA los consentimientos informados pertinentes.

Para la segunda parte del estudio se emplearon 56 embriones de ratón congelados en 10 pajuelas procedentes de un mismo lote (SFME-1-001-014) y proporcionados por la empresa Embryotools S.L (Barcelona, España). El transporte de los mismos se realizó por una empresa autorizada con servicio puerta a puerta en recipiente DryShipper 3.0 (MTG Bruckberg Alemania) hasta las instalaciones del laboratorio de FIV del CHGUV donde se llevó a cabo el experimento.

Los embriones fueron obtenidos mediante la inseminación *in vivo* de una ratona y congelados todos al mismo tiempo con fecha 20/06/2014 y en idénticas condiciones. De forma previa al estudio, se solicitaron y obtuvieron los permisos correspondientes para su realización por parte del comité de investigación y del comité de bioética del CHGUV.

No fue necesario pedir permiso al comité de ética para la experimentación animal al no considerarse experimentación animal el estudio realizado según el Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, *por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. Artículo 2. Ámbito de aplicación. 2. El presente real decreto se aplicará hasta que los animales contemplados en el primer apartado hayan sido sacrificados, realojados o reintegrados a un hábitat o sistema zootécnico conveniente. Se aplicará asimismo a los animales que se encuentren en una fase de desarrollo anterior si se va a permitir que el animal viva más allá de esa fase de desarrollo y como resultado de los procedimientos realizados sea probable que padezca dolor, sufrimiento, angustia o daño duradero después de haber alcanzado dicha fase de desarrollo.*

Basándonos en dicho real decreto en nuestro estudio se han empleado animales en su desarrollo anterior sin llegar a serle transferido al útero de la ratona por lo que no se considera experimentación animal.

3.2. Procedimiento de obtención y recogida del medio de cultivo embrionario.

Todos los procedimientos realizados son los habituales incluidos en los protocolos de reproducción asistida que realizamos en el laboratorio y en ningún caso se han cambiado. Este estudio no ha alterado ni el tiempo ni el protocolo de tratamiento de ninguna paciente.

3.2.1. Estimulación ovárica controlada.

Para la estimulación ovárica de la paciente se usaron protocolos distintos de gonadotrofinas con dosis ajustadas a edad, índice de masa corporal y características propias de cada paciente (Síndrome de ovario poliquístico, endometriosis, baja respuesta, abortadora de repetición, etc.) a criterio clínico.

Las pacientes fueron estimuladas mediante protocolo corto con hormona folículo estimulante (FSH) de origen recombinante o humana altamente purificada. En pacientes mayores de 38 años se realizó adición de hormona luteinizante (LH). El bloqueo hipofisario, para evitar el pico endógeno de LH, se realizó administrando a las pacientes antagonistas de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) cuando los folículos, controlados mediante ecografía vaginal, alcanzaron un tamaño de unos 15mm de diámetro.

El primer paso en la TRA consiste en la supresión hipofisaria mediante análogos de la GnRH. Puede tratarse de agonistas o antagonistas.

En una pauta de EOC con agonistas la liberación normal se produce de forma pulsátil y causa la liberación y síntesis de gonadotropinas. Para ello disponemos de tres tipos de protocolos en función de la duración del tratamiento:

- Protocolo largo

Comienza en la mitad de la fase lútea del ciclo anterior o en la fase folicular precoz. Se administra hasta inducir la ovulación. Causará desensibilización entre los días 8 y 21 posteriores evitando la luteinización precoz.

- Protocolo corto o *Flare-up*

Aprovecha el efecto inicial de estimulación administrándola entre los días 1 y 3 añadiendo en este último gonadotropinas que se mantendrán hasta la ovulación.

- Protocolo ultracorto

Sólo se administran agonistas los tres primeros días de ciclo y gonadotropinas desde el segundo o tercer día.

Protocolos utilizados en función de la dosis:

- Pauta con dosis inicial fija: la dosis se mantuvo fija durante cinco días y tras el primer control se modificó según la respuesta.
- Pauta Ascendente: se inició con baja dosis (75 UI FSH) y tras una evaluación de respuesta insuficiente se aumentó en pequeñas dosis añadiendo 37.5-75 UI FSH.
- Pauta Descendente: se comenzó con dosis altas (225-300 UI FSH) durante dos o tres días para ir bajándola los días posteriores.

En una pauta de EOC con antagonistas el objetivo es evitar el pico prematuro de LH que se produce durante la estimulación ovárica. Estos se unen de forma competitiva al receptor, bloqueándolo de forma inmediata y causando supresión hipofisaria.

Protocolos según la dosis:

- Múltiple: se administraron 0.25mg/día desde el sexto día de estimulación con gonadotropinas hasta el día de la inducción de la ovulación inclusive.
- Única: se administraron 3 mg cuando el folículo de mayor tamaño alcanzó 14mm de diámetro. Si tras 72 horas no se ha inducido la ovulación se puso una segunda dosis.

Para inducir la ovulación tanto en protocolos con agonistas como con antagonistas se empleó Gonadotropina Coriónica Humana recombinante (hCG). La administración se realizó 36 horas antes de la punción aspiración folicular cuando en la ecografía de control se observó la existencia de al menos dos folículos de 16-18mm, y el estradiol medido en suero fue de 300 pg/mL por folículo.

3.2.2. Punción aspiración folicular.

La Punción Aspiración Folicular (PAF) se realiza con ayuda de la ecografía transvaginal. Ésta permite una fácil localización de los folículos a puncionar debido a la reducida distancia hasta los ovarios.

Todo el proceso se realiza con presencia de anestésista en régimen ambulatorio y entorno quirúrgico.

Cada una de las pacientes que se sometió a la PAF acudió en ayunas, con la vejiga vacía y le fue prescrito antibiótico de amplio espectro, (habitualmente Azitromicina) la noche previa a la intervención.

Se colocó a la paciente en posición de litotomía y se realizó asepsia del campo operatorio mediante clorhexidina y posterior lavado con suero fisiológico del interior de la vagina.

A la sonda ecográfica se acopló una aguja de acero inoxidable con la que se aspiró el líquido folicular con la ayuda de la presión negativa de 180 mm de Hg que ejerce una bomba de vacío (Labotect GmbH, Alemania) conectada a un pedal con el que controlar la presión de aspiración. La aguja de 17 Gauges (G) de diámetro de luz, 35 cm de longitud y de extremo biselado Wallace™ (Smiths-Medical, EEUU) fue conectada a través de un tubo de teflón a un tubo de fondo redondo Falcon™ (Becton Dickinson, Bélgica) de 12 mL a su vez conectado a través de otro tubo de teflón con la bomba de vacío.

El biólogo esperó la llegada de los tubos con el líquido folicular en la campana de flujo laminar situada en el quirófano. El sistema óptico y las placas calefactables fueron calentadas a 37°C.

Tanto el sistema como la aguja fueron previamente purgados con medio tamponado G-MOPS Plus™ (Vitrolife, Suecia) precalentado a 37°C para evitar cambios bruscos de temperatura antes de su uso.

La sonda vaginal del ecógrafo provista de una guía y cubierta por una funda estéril se introdujo en la vagina de la paciente. Primero se localizó el útero, los ovarios y los vasos pélvicos. Una vez localizado el ovario más accesible se puncionó a través del saco vaginal. Sirviéndonos de la guía ecográfica se dirige la aguja hacia el interior del folículo. Se puncionó primero el folículo más cercano

a la aguja cuando presenta su diámetro mayor en pantalla y se aplica vacío una vez dentro, así sucesivamente se fueron puncionando y aspirando el resto de folículos sin sacar la aguja del ovario. Los tubos recogidos se mantuvieron en un bloque térmico a 37°C hasta que el biólogo los revisó.

Una vez finalizada la punción de ambos ovarios se comprobó que no existía hemorragia. En caso de existir líquido en el fondo del saco de Douglas se aspiró para evitar la irritación peritoneal. Además se mantuvo a la paciente en observación durante dos horas para vigilar si se producía algún tipo de complicación precoz. En caso necesario le fue administrado un analgésico por vía intravenosa. Trascorridas las dos horas se valoró de nuevo a la paciente y se dio el alta en caso de no existir signo o síntoma de complicación habiendo recuperado la paciente sus funciones fisiológicas.

Durante la PAF, el biólogo se situó en la cabina de flujo laminar Telstar (España) ubicada en el mismo quirófano. El líquido folicular obtenido de la punción ovárica que se fue depositando en tubos se vertió en placas de Petri Falcon 3003™ (Becton Dickinson, Bélgica), calentadas a 37°C con ayuda de una placa calefactable (Labotect GmbH, Alemania) y se fueron aislando los complejos cúmulo-corona-ovocito (CCCO) identificados en las placas de Petri bajo un microscopio (Nikon, Japón) con ayuda de pipetas Pasteur estériles. Una vez aislados fueron depositados en una placa de cultivo Nunc4well (Thermo-Fisher Scientific, EEUU) cubierta con medio tamponado G-MOPS™ donde se lavaron los CCCO con el fin de eliminar restos de sangre que pudiera causar un descenso del pH y afectar directamente a la viabilidad de los ovocitos. Una vez acabada la punción, los ovocitos se transportaron al laboratorio de FIV lo más rápido posible donde se cambiaron los folículos a una nueva placa de cultivo con medio sin tampón G-IVF Plus™ (Vitrolife, Suecia) preequilibrado a 6% CO₂, 37°C y humedad relativa del 100% y se introdujeron en el incubador c200 (Labotect GmbH, Alemania) donde permanecieron hasta el momento de su inseminación.

3.2.3. Fecundación *in vitro*.

Para realizar una fecundación *in vitro* existen actualmente dos técnicas en reproducción asistida, la fecundación *in vitro* convencional (FIV) o la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). Se realizaron una u otra técnica en función de la indicación de la pareja.

Cada una de las técnicas de FIV a emplear requiere un tratamiento diferente tanto del semen como de los ovocitos.

En caso de que la técnica requerida fuese una FIV convencional una vez realizada la PAF no fue necesario decumular lo ovocitos, es decir, eliminar las células de la granulosa que los recubren como se aprecia en la Figura 27. Estos permanecieron en el incubador hasta el momento de realizar la técnica.



Figura 27. CCCO y ovocito tras ser decumulado.

El semen utilizado para realizar las placas de FIV previamente se capacitó, es decir, se les dio la habilidad de fecundar. Para ello se realizó la técnica de los gradientes de densidad. La técnica se basa en la centrifugación de la muestra en distintos gradientes de densidad que discriminarán los espermatozoides en función de su movilidad y los separarán del plasma.

Se emplearon gradientes al 45% y al 90%. Los espermatozoides sin movilidad o con movilidad no progresiva fueron eliminados mediante esta técnica.

Para capacitar la muestra seminal empleando gradientes de densidad Pure Sperm (Nidacon, EEUU) necesitamos un tubo cónico Nunc™ (Thermo-Fisher Scientific, EEUU) de 12 mL al que añadimos 1 mL de gradiente al 90% dejándolo deslizar lentamente por las paredes del tubo, seguido de 1 mL de gradiente al 45% evitando que se mezcle con el anterior y 1 mL de la muestra de semen (como puede apreciarse en la Figura 23) creándose interfases entre cada capa. A continuación centrifugamos la muestra a 1200 revoluciones por minuto (rpm) durante 20 minutos. Pasado este tiempo se habrán formado distintas capas. Bajo el gradiente de 45% encontramos espermatozoides muertos e inmóviles, células epiteliales, bacterias y leucocitos. Por encima del gradiente quedó el plasma seminal. En el

gradiente de 90% quedaron atrapadas células inmaduras y bajo este los espermatozoides móviles formando un precipitado o *pellet* en el fondo del tubo. (Figura 28)

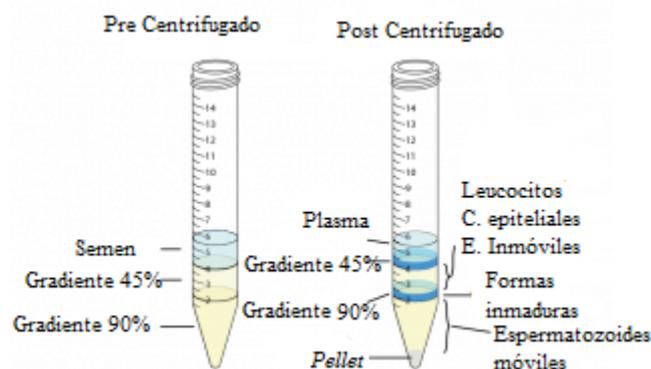


Figura 28. Capacitación espermática mediante gradientes de densidad. Adaptada de Nidacon.

Retiramos el *pellet*, puesto que es la única población que nos interesa de la muestra, con ayuda de una pipeta Pasteur atravesando con cuidado las distintas capas y haciendo una burbuja al atravesar cada interfase para evitar llevarnos gradiente junto con la muestra.

Resuspendimos el *pellet* en medio de cultivo G-IVF Plus TM para lavarlo y centrifugamos nuevamente, pero esta vez durante 5 minutos a 1800 rpm.

El *pellet* formado finalmente se ajustó mediante diluciones con G-IVF Plus TM hasta alcanzar la concentración de 1-2 millones de espermatozoides por mL necesarias para realizar la FIV convencional sin riesgo de poliploidías.

Una vez capacitado el semen pudimos preparar las placas de cultivo donde se realizó la técnica. Realizamos una placa de cultivo por cada 6-7 ovocitos con tres gotas de 40 μ L de medio de cultivo G1.5 Plus TM (Vitrolife, Suecia) colocadas a las 11, 12 y 1 horarias que usamos para decumular al día siguiente de su fecundación y así poder evaluarlos. Además se hicieron tantas gotas de inseminación de 20 μ L de semen como ovocitos tuvimos, no superando los 6-7 ovocitos por placa. Se cubrió la placa con aceite mineral Ovoil TM (Vitrolife, Suecia) y se dejó en el incubador para equilibrarla a 37°C y 6% CO₂ hasta el momento de inseminar los ovocitos. Llegado este momento y con ayuda de una pipeta Pasteur estéril se depositó un ovocito por cada microgota de semen formada y colocamos la

placa de nuevo en el incubador donde los dejamos durante 16 - 18 horas hasta poder valorar la fecundación.

Para realizar la ICSI previamente procedimos a la decumulación de los CCCO con el fin de poder evaluar el estadio de maduración ovocitario. Para ello una vez pasadas al menos dos horas de la PAF hicimos pasar los mismos por pipetas Pasteur de cristal estiradas bajo la llama de un mechero Bunsen hasta conseguir formar un juego completo de pipetas de distintos calibres comprobados bajo la lupa y siempre por encima del diámetro ovocitario. Además empleamos una solución de hialuronidasa (SAGE® CooperSurgical Company, EEUU) para ayudar a digerir las células de la granulosa. En una placa de cultivo de 4 pocillos dispusimos 0.5 mL de la solución de hialuronidasa en el primer pocillo y medio tamponado G-MOPS Plus en el resto de pocillos. Los CCCO se depositaron con ayuda de una pipeta Pasteur sin estirar en el primer pocillo de la placa de cultivo donde se mantuvieron durante no más de 30 segundos para evitar toxicidad y se fueron disgregando las células de la granulosa. De esta forma conseguimos una denudación mecánica por la acción de la pipeta y enzimática por la hialuronidasa. A continuación se procedió a decumular con la ayuda de las pipetas de diferentes diámetros que han sido estiradas previamente. El proceso de decumulación debe durar un máximo de cinco o seis minutos por encontrarse los ovocitos fuera del incubador y ser necesario minimizar su exposición ambiental. Podremos valorar el estado de madurez ovocitaria una vez acabadas de disgregar las células (Figura 29). Para ello se valoró la presencia de corpúsculo polar y ausencia de vesícula germinal por ser indicativo de madurez. Estaremos ante un ovocito en metafase II (MII) en caso de existir dicho corpúsculo polar. La presencia de vesícula germinal (VG) fue indicativo de ovocito inmaduro en profase I del ciclo celular. De no existir corpúsculo polar ni vesícula germinal nos encontramos ante un ovocito en metafase I (MI) y por tanto también inmaduro.



Figura 29. Grados de madurez ovocitarios. De izqda. a dcha. VG, MI y MII.

En caso de ICSI, aquellos ovocitos maduros tras la decumulación se pasaron de nuevo a la placa de cultivo con medio IVF TM y se introdujeron en el incubador a la espera de ser microinyectados al menos una hora tras el proceso de decumulación por el estrés que supone dicho proceso.

Para capacitar el semen optamos por realizar un *swim up*. Para ello se dispuso el semen en un tubo cónico Nunc TM (Thermo-Fisher Scientific, EEUU) una vez realizado un examen macro y microscópico que incluyó la evaluación de su volumen, recuento de espermatozoides móviles (REM), color y viscosidad. (ver Figura 30).

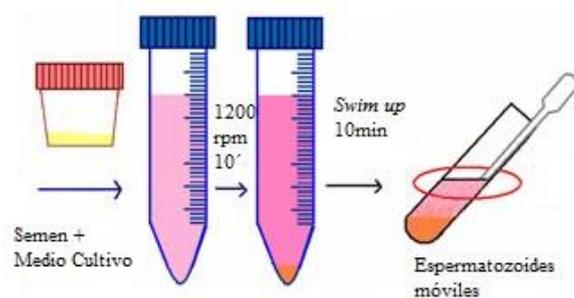


Figura 30. Técnica de capacitado seminal *swim up*. Imagen propia

Se lavó con medio de cultivo IVF TM preequilibrado a 37°C y 6% de CO₂ y se centrifugó durante diez minutos a 1200 rpm. Pasado este tiempo se eliminó el sobrenadante con ayuda de una pipeta Pasteur, se cubrió el *pellet* sin resuspenderlo con medio de cultivo IVF TM y se dejó en reposo en incubador durante un mínimo de diez minutos para que los espermatozoides móviles nadasen hacia arriba. Una vez procesado el semen pudimos preparar la placa donde tuvo lugar la microinyección. El procedimiento de microinyección se realizó en una placa especialmente preparada para cada paciente en la que se depositaron los ovocitos en gotas de medio de cultivo tamponado, una gota de semen y dos gotas de polivinilpirrolidona (PVP). Esta última tiene como función ralentizar a los espermatozoides y así facilitar su manipulación. Cada ovocito fue depositado en gotas de 5 μL en una placa Falcon TM 1006 (Becton Dickinson, Bélgica) cubierta de aceite mineral no gaseado Ovoil TM. Los espermatozoides fueron en la misma placa en una gota de 3 μL PVP (polivinilpirrolidona) al 10% en HTF-HEPES (SAGE [®]CooperSurgical Company) y depositamos otra gota de 3 μL PVP para purgado de pipetas y descarga de los espermatozoides una vez inmovilizados.

Aproximadamente dos horas después de decumular los ovocitos procedimos a su microinyección. Esta técnica consiste en la introducción de un espermatozoide en el interior del citoplasma de un ovocito. Para poder manipular tanto ovocitos como espermatozoides necesitamos un sistema de mandos inyectoros (Narishige, Japón) acoplados a pipetas Cook *Precision Pipette*® (Cook Medical, EEUU) de sujeción o *holding* y de inyección en un microscopio invertido Nikon Eclipse TE 2000 (Nikon, Japón). La pipeta de *holding* tiene por función sujetar el ovocito y la de microinyección se utilizará para cazar los espermatozoides seleccionados e inyectarlos dentro del ovocito. Antes de comenzar el procedimiento purgamos el sistema de aceite de los inyectoros para evitar la formación de burbujas que pudieran causar problemas de succión de los fluidos. Colocamos la pipeta de *holding* a la izquierda y la de microinyección a la derecha situadas en el mismo eje del plano y comprobamos que el aceite fluía con normalidad. Comprobamos que la temperatura de la placa calefactable Tokai (Tokai Hit Co., China) se encontraba a 37°C antes de iniciar el procedimiento.

Con ayuda de una pipeta Pasteur de calibre fino depositamos los ovocitos en las gotas correspondientes de la placa y la colocamos en el microscopio. Bajamos ambas pipetas con ayuda de los mandos del microinyector hasta la placa enfocando a través de los oculares del microscopio tanto las gotas como las pipetas y comprobando que se encontraban en el mismo plano. Las rellenamos en primer lugar de PVP para purgarlas y comprobar que funcionan correctamente y llevamos la pipeta de microinyección a la gota que contenía el semen con PVP. Localizamos espermatozoides con buena movilidad y buena morfología y uno a uno los inmovilizamos mediante un golpe seco en el tercio proximal de la cola y perpendicular al espermatozoide. Este golpe evitará que el movimiento del flagelo produzca daños en el citoplasma y promoverá la descondensación de la membrana nuclear. Con la pipeta de microinyección aspiramos un espermatozoide con la cabeza orientada hacia la punta de la pipeta y nos dirigimos a la gota del ovocito. Una vez ahí colocamos la pipeta de *holding* enfocada y en el mismo plano del ovocito y lo fijamos suavemente mediante aspiración una vez lo orientamos con el CP en la parte superior a las 12 horarias o en la parte inferior a las 6 horarias. Esta colocación se realiza para evitar que la inyección dañe el huso meiótico al atravesar el centriolo que se encuentra bajo el CP. Colocamos tanto pipeta de inyección como membrana del ovocito bien enfocados e inyectamos la pipeta presionando sobre la ZP hasta perforarla. Atravesando el espacio perivitelino se perforó la membrana del ovocito formando un cono alrededor de la punta de la pipeta de inyección, como se puede observar en la Figura 31, debido a la resistencia ejercida por la membrana celular.



Figura 31. Microinyección. Formación del cono.

Absorbimos el citoplasma ovocitario hasta que notamos la rotura de la membrana y expulsamos de nuevo el contenido al interior del ovocito junto con el espermatozoide procurando introducir la menor cantidad posible de PVP. Retiramos la pipeta por el mismo lugar por el que se introdujo y se liberó el ovocito de la pipeta de *holding*. Repetimos los mismos pasos con cada ovocito y una vez finalizado el proceso los ovocitos fueron pasados a una placa de cultivo Falcon™ 1008 (Becton Dickinson, Bélgica) con medio G1.5 Plus™ formando gotas de 40 µL cubiertas de 3mL de aceite mineral Ovoil™.

Dicha placa fue previamente equilibrada antes de su uso en un incubador (Labotect® C60 GmbH, Alemania) hasta alcanzar las condiciones de 6% de CO₂ y 37°C de temperatura durante un mínimo de 4 horas.

Los ovocitos permanecieron en la placa en el interior del incubador hasta que evaluamos la fecundación, una vez transcurridas 18-20 horas.

La valoración de la fecundación consistió en evaluar la presencia de dos PN y dos CP en cada ovocito que marca una correcta fecundación (Figura 32). La fusión entre las membranas de ovocito y espermatozoide provoca la activación del ovocito, que da lugar a la extrusión del segundo CP y la formación del PN femenino y a la descondensación de la cabeza del espermatozoide y posterior formación del PN masculino.



Figura 32. Ovocito fecundado

En el caso de la FIV convencional para valorar la fecundación primero tuvimos que decumular los ovocitos haciéndolos pasar por pipetas de cristal de distintos calibres con las que conseguimos desprender las células de la granulosa.

Además de valorar la presencia de CP y PN se evaluaron otros conceptos como el número de precursores nucleolares por PN y su disposición dentro del mismo, la localización de los CP y de los PN, así como el tamaño de ambos.

3.2.4. Cultivo embrionario.

Los cigotos que fecundaron de forma correcta se cultivaron usando el mismo sistema de cultivo en microgotas. Para este estudio tuvimos en cuenta únicamente los embriones transferidos en día dos de cultivo, que son la mayoría de los casos en nuestra Unidad.

Llegado el momento de la transferencia hubo que valorar los embriones. Desde cigoto en día uno, a embrión en día dos, habrá realizado dos divisiones de su citoplasma y tendrá cuatro blastómeras o células embrionarias. Además del número de células, a la hora de elegir los embriones de mejor calidad tuvimos en cuenta la disposición, simetría y tamaño de las células, presencia de núcleos en las blastómeras, presencia de vacuolas, grado de fragmentación o presencia de halo. Atendiendo a todos estos parámetros los clasificamos en base a los criterios propuestos por la Asociación Española de Biología de la Reproducción (ASEBIR) en 2007 basada en criterios morfológicos (Figura 33).

| Nºcels D2 | Calidad asignada si transfer D2 | Nº cels en D3 | Calidad asignada si transfer D3 | Modificar asignación a la baja si: |
|-----------|---------------------------------|---------------|---------------------------------|------------------------------------|
|-----------|---------------------------------|---------------|---------------------------------|------------------------------------|

| | | | | |
|-------|---|-------|---|---|
| 2cels | B | 3 cel | D | % frag D2 a D3 A < 11% B 11 – 35% C 26 – 35 % D > 35 % D tipo IV |
| | | 4 cel | D | |
| | | 5 cel | D | |
| | | 6 cel | C | |
| | | 7 cel | B | |
| | | 8 cel | B | |

| | | | | | |
|-------|----------------------|---|-----------------|---|---|
| 3cels | 2pequeñas + 1 grande | C | 4 cel | D | Vacuolas Ano Bno Cescasas Dabundantes |
| | | | 5 cel | D | |
| | | | 6 cel | C | |
| | | | 7 cel | C | |
| | | | 8 cel | C | |
| | | | 9 cel | C | |
| | Simetría incorrecta | D | Cualquier valor | D | |

| Nºcels D2 | Calidad asignada si transfer D2 | Nº cels en D3 | Calidad asignada si transfer D3 | Modificar asignación a la baja si: |
|--------------|---|---------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
|--------------|---|---------------|---------------------------------------|---------------------------------------|

| | | | | |
|--------|---|--------|---|---|
| 4 cels | A | 5 cel | D | <div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> Multinucleación Ano Bno Cno D...Cualquier multinucleación. </div> |
| | | 6 cel | C | |
| | | 7 cel | A | |
| | | 8 cel | A | |
| | | 9 cel | B | |
| | | 10 cel | B | |

| | | | | |
|--------|---|--------|---|--|
| 5 cels | B | 6 cel | D | <div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> Semejanza (2;4;8;16) A iguales o semejantes C diferentes </div> |
| | | 7 cel | B | |
| | | 8 cel | B | |
| | | 9 cel | B | <div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> ZP Anormal Beclosión C anormal </div> |
| | | 10 cel | B | |

| Nºcels D2 | Calidad asignada si transfer D2 | Nº cels en D3 | Calidad asignada si transfer D3 | Modificar asignación a la baja si: |
|--------------|---|---------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
|--------------|---|---------------|---------------------------------------|---------------------------------------|

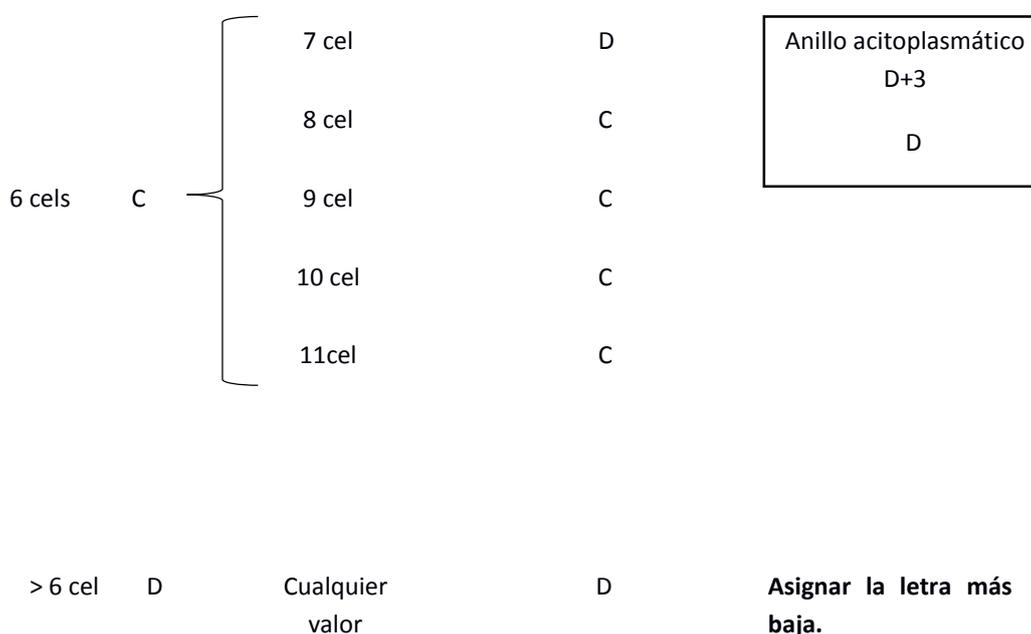


Figura 33. Clasificación en base a criterios morfológicos ASEBIR

Se transfirieron los embriones más óptimos de la cohorte. Estos se colocaron aproximadamente los 15 minutos previos a la transferencia en una placa de cultivo Falcon™ 3037 (Becton Dickinson, Bélgica) con 1.5 mL de medio de cultivo Embryogluce® (Vitrolife, Suecia) enriquecido en ácido hialurónico.

La transferencia embrionaria se realizó en el Laboratorio por cercanía con los incubadores. La paciente se colocó en posición de litotomía en la camilla de exploración ginecológica y se realizó la transferencia por vía vaginal guiada con ecografía transabdominal. No fue necesaria la sedación en ninguna de nuestras pacientes.

Mediante un catéter de transferencia (Labotect[®], Alemania) acoplada a una jeringuilla de insulina de 1 mL se introdujeron los embriones a través del canal cervical a la cavidad uterina hasta llegar a 2 cm del *fundus* para evitar generar irritabilidad uterina que desencadenara fenómenos contráctiles.

La paciente se administró progesterona (200 mg/8h) como apoyo de la fase lútea desde el día de la punción hasta al menos el momento de conocer si había habido gestación 15 días tras la transferencia.

La existencia de gestación se valoró mediante la determinación en sangre de la hormona gonadotropina coriónica humana (β -hCG) marcadora de embarazo. Esta prueba se realizó pasados al menos 15 días de la transferencia embrionaria. Los casos en los que el resultado de la determinación hormonal tuvo un valor de cero, indicativos por tanto de la no implantación, fueron incluidos en el grupo negativos. Y aquellos casos con valores positivos hubo que esperar 20 días para comprobar ecográficamente la existencia de gestación y el número de sacos gestacionales con presencia de latido fetal cardíaco. Así dependiendo del número de sacos gestacionales y de embriones transferidos pudieron ser incluidos o excluidos del grupo de positivos, indicativos de implantación.

3.2.5. Recogida de medio de cultivo.

Para la realización del estudio y determinación del perfil metabólico recogimos el medio de cultivo G1.5 Plus[™] donde permanecieron los embriones desde su fecundación hasta el momento de la transferencia en día dos de cultivo. Dicho medio fue previamente equilibrado antes de su uso en un incubador Labotect[®] hasta alcanzar las condiciones de 6% de CO₂ y 37°C de temperatura y humedad relativa en torno al 100% durante un mínimo de 4 horas. El medio fue preparado en placas de cultivo Falcon[™] 1008 (Becton Dickinson, Bélgica) formando gotas de 40 μ L cubiertas de 3mL de aceite mineral Ovoil[™]. Se formó una microgota por cada embrión cultivando un máximo de 6 embriones por placa y además dos microgotas que se utilizaron para el lavado de los embriones antes de ser

colocados en sus gotas correspondientes. Cada microgota llevó rotulado bajo la placa un número que corresponde a un embrión concreto de la paciente y que le acompañó durante todo el tratamiento. Dicho número a su vez se correspondía con un número asignado para el medio de cultivo una vez este fue guardado en el microtubo (Eppendorf, Alemania) para su análisis y se incluyó en una base de datos Excel de Office 2013 (Microsoft, EEUU) donde además se anotó la calidad del embrión siguiendo la clasificación morfológica anteriormente descrita.

La recogida del medio de cultivo embrionario se realizó una vez finalizada la transferencia del embrión o embriones seleccionados. Dicha recogida se hizo usando una micropipeta automática Nichipet (Nichiryo, Japón) con puntas estériles. Se empleó una punta distinta para cada gota de medio de cultivo que se recogió y se evitó la contaminación del medio con el aceite mineral empleado para cubrir las microgotas de cultivo en las placas.

El medio fue depositado en un microtubo de 0.2 mL (Eppendorf, Alemania) y guardado en el congelador a -18 °C hasta el momento de su traslado al servicio de Metabólica de la Facultad de Medicina-UCIM, Universitat de València para su análisis. El tiempo de almacenaje a esta temperatura no superó como media los 30 días.

3.3. Adquisición del perfil metabólico mediante RMN.

3.3.1. Preparación de la muestra para la medida de RMN.

Para ello todas las muestras empleadas en la determinación del perfil metabólico por resonancia magnética nuclear (RMN) fueron entregadas al servicio de Metabólica que procedió inmediatamente a ultracongelar las muestras a -80 °C.

Las muestras permanecieron almacenadas en ultracongelador hasta el mismo instante de su preparación para la medida.

El procedimiento general de preparación de muestras consistió en la adición de 2.5 µL de óxido de deuterio D₂O (referencia interna de RMN) a 20 µL de muestra en un tubo de 1 mm de diámetro de alta resolución de RMN (Figura 34) tipo SampleJet. El tiempo de preparación de cada muestra siempre fue inferior a 5 minutos.

Para poder estimar la concentración total de los metabolitos presentes en las muestras, para un grupo seleccionado de muestras, se añadió un patrón interno de concentración. En este caso el procedimiento de preparación consistió en la adición de 3,85 μL de la sal sódica del ácido 3'-trimetilsililpropionato-2, 2, 3, 3-d4 (TSP, 31mM) disuelta en óxido de deuterio D_2O a 20 μL de muestra en un tubo de 1 mm de diámetro. La concentración final del TSP en la muestra es 5 mM. Los reactivos empleados han sido D_2O (99.8%) y sal sódica del ácido 3'-trimetilsililpropionato-2, 2, 3, 3-d4 (TSP) (Sigma-Aldrich, EEUU).



Figura 34. Capilares de 1 mm de diámetro

3.3.2. Protocolo y parámetros de adquisición del espectro de RMN.

Todos los espectros fueron adquiridos en un espectrómetro Bruker AVANCE DRX 600 (Bruker Biospin GmbH, Rheinstetten, Alemania) (Figura 35) operando a una frecuencia de ^1H de 600,13 MHz. El equipo está equipado con una sonda TXI PATXI de triple resonancia $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{31}\text{P}$ de 1 mm, una unidad enfriador BCU Xtreme y un robot muestreador termostatzado SampleJet.



Figura 35. Equipo de RMN Bruker Avance 600MHz equipado con robot SampleJet.

La homogeneidad del campo magnético se consiguió mediante un ajuste manual de las bobinas de homogeneidad usando un experimento 1D con presaturación de agua en modo interactivo. La temperatura nominal de la muestra durante las medidas se ha mantenido constante a 37°C.

Para todas las muestras se adquirió un espectro de un pulso simple con presaturación de agua, con 256 repeticiones y 65.000 puntos. La presaturación del agua se usó durante 1 segundo a lo largo del tiempo de reciclado para la supresión de la señal del solvente. La anchura espectral para todos los espectros fue de 8000 Hz para el espectro de ^1H . Antes de aplicar la transformada de Fourier a los datos, multiplicamos la FID (decaimiento libre de la señal) por una función exponencial de anchura de línea de 0.3 Hz.

3.4. Procesado de los espectros y análisis multivariable de los datos.

Todos los espectros fueron procesados usando MestReNova 5.3 (Mestrelab Research S.L., Santiago de Compostela, España), transferidos a MATLAB 7.6 R2012a (The MathWorks Inc, Natick, EEUU) y analizados usando rutinas de análisis de datos desarrolladas por el laboratorio. El desplazamiento químico de los espectros se referenció a la señal doblete de la molécula de lactato a 1.335 ppm para todos los espectros. Se trabajó con la región de desplazamientos químicos comprendida entre 0.50 y 4.50 ppm (conocida como región alifática) y entre 5.20 y 10.00 ppm (conocida como región aromática).

El espectro se normalizó al área total alifática para eliminar diferencias en función del contenido total de metabolitos del medio.

El espectro fue dividido en segmentos de 0.005 ppm y se aplicó un análisis estadístico usando rutinas desarrolladas por el laboratorio de Metabolómica en MATLAB y la librería de análisis estadístico multivariable PLS-Toolbox (Eigenvector Research, Inc. Wenatchee, EEUU). Los datos divididos se centraron previamente al análisis multivariable.

Se aplicó un Análisis de Componentes Principales (PCA) al conjunto de datos procesados para explorar la posibilidad de una separación espontánea entre los grupos experimentales e identificar que variables contribuían más a la separación. Un análisis PCA es un método no supervisado que permite proyectar en un método de pocas dimensiones la complejidad de un sistema experimental complejo multivariable. Cuando la separación entre grupos fue compleja e incompleta, se procedió a realizar un análisis discriminante supervisado bien conocido como es el PLS-DA (*Partial Least Squares Discriminant Analysis*). El modelo PLS-DA fue evaluado mediante una validación cruzada empleando el método *Venetian Blinds*. La validación se representó de forma gráfica mediante una curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) que representa la sensibilidad frente a (1-especificidad) para un sistema según varía el umbral de discriminación.

Una vez construido el modelo discriminante a partir de las muestras de medio de cultivo embrionario procedimos a identificar las variables (partes del espectro) que contribuían con más peso al modelo (*loadings*) y a que metabolitos correspondían en el espectro.

Finalmente, identificados los picos más significativos para el modelo discriminatorio, procedimos a integrar el área de los picos y asignar cada señal a que metabolito pudiera corresponder. Para ciertas señales, la correcta asignación de cada pico a un metabolito resulta especialmente compleja. Esto viene dado por la baja concentración en la muestra de un metabolito o también por el alto grado de solapamiento de las señales.

Para intentar mejorar la asignación de picos empleamos secuencias especiales de asignación bidimensional (tipo TOCSY correlación ^1H - ^1H y HSQC correlación ^1H - ^{13}C) que fueron adquiridas para un grupo seleccionado de muestras. Para la asignación de los picos e identificación de los compuestos empleamos el programa Chenomx NMR suite versión 7.1 (Chenomx Inc., Edmonton, Alberta, Canadá) y la base de datos de libre acceso *Human Metabolome Database* (<http://www.hmdb.ca>).

3.5. Validación mediante embriones de ratón como modelo animal de desarrollo embrionario.

En la segunda parte del estudio se usaron embriones de ratón como modelo animal para comprobar el efecto de los metabolitos que resultaron estadísticamente significativos en el modelo metabolómico de predicción de la viabilidad embrionaria humana. De entre todos los metabolitos que componen el biomarcador metabólico de viabilidad, elegimos butirato, arginina y glutamato.

El modelo animal seleccionado para llevar a cabo esta parte del estudio fue el embrión de ratón dado su parecido en las primeras etapas de desarrollo preembrionario con el humano.

Los embriones de ratón fueron suministrados en estadio de pronúcleos procedentes de una misma cohorte de ratones que se cruzaron mediante inseminación *in vivo* y obtuvieron al mismo tiempo, y se agruparon al azar para congelar cada pajuela.

Se utilizaron un total de 56 embriones en estadio de pronúcleos almacenados en 10 pajuelas que fueron congelados y almacenados en nitrógeno líquido por la empresa Embryotools S.L (Barcelona, España) hasta su traslado. El transporte fue realizado con servicio puerta a puerta por la empresa autorizada Halcourier S.L. Durante todo el transporte se mantuvieron condiciones de temperatura

constante de las pajuelas para evitar su descongelación y una vez llegado a su destino se almacenaron también en nitrógeno líquido evitando así cualquier cambio de temperatura.

Para su descongelación se siguieron las indicaciones del protocolo proporcionado por la empresa suministradora y que se detalla a continuación.

- Sacar las pajuelas de una en una del tanque de nitrógeno líquido.
- Dejarla descongelar a temperatura ambiente durante 40 segundos.
- Sumergir la pajuela en un baño a 37°C durante 40 segundos, sacarla del agua y secarla.
- Cortar el extremo final sellado con tijera y colocarlo sobre una placa de Petri de 35 mm.
- Cortar el otro extremo de la pajuela por la mitad del polímero (ver Figura 36)
- Usando una varilla metálica empujar la mitad del polímero hacia el final del soporte de vitrificación tipo pajuela de forma que toda la solución que contiene la pajuela caiga en la placa de Petri.
- Dejar la solución con los embriones a temperatura ambiente durante 10-15 minutos.
- Pasar los embriones a gotas con medio de cultivo con ácido 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfónico (Hepes) durante 5 minutos a 37°C.
- Pasar los embriones al medio de cultivo seleccionado y previamente equilibrado. Realizar al menos 9 pases de lavado en gotas diferentes de medio a 37°C.
- Seleccionar los embriones supervivientes y pasarlos a las gotas correspondientes en una nueva placa con medio de cultivo preequilibrado. Los embriones ya están listos para ser usados.



Figura 36. Soporte de vitrificación de embriones de ratón con polímero de algodón.

Se realizaron un total de siete placas de cultivo, seis de las cuales se utilizaron para el estudio de los tres metabolitos y una placa como control positivo. En cada placa se dispusieron nueve gotas de 20 μL de medio G1.5plusTM cubiertas de aceite mineral OvoilTM. Se utilizó idéntico medio al empleado en el estudio de viabilidad embrionaria. Se colocaron en la placa control ocho embriones a modo de control positivo de crecimiento sin la adición de ningún metabolito al medio. En otras seis placas se dispusieron 8 embriones por placa para probar dos concentraciones distintas de los tres metabolitos a estudio dejando vacía una gota por placa como control. Esas gotas sin embriones se cultivaron junto con las gotas con embriones para permitir a cualquier aminoácido no específico su degradación o aparición. De manera que se emplearon un total de 56 embriones para el estudio.

El medio de cultivo se enriqueció con los metabolitos seleccionados de forma que la concentración final del metabolito en el medio fue 1mM y 0,1mM y se realizó también una placa control con el medio de cultivo sin aditivos. Las concentraciones empleadas fueron estimadas tras cuantificar una muestra del medio de cultivo sin aditivos empleado para el estudio. La concentración determinada por RMN de los diferentes metabolitos empleados fue de 0,1mM para butirato y arginina, y 0,05mM para glutamato. Estas concentraciones además concuerdan con los datos publicados en la bibliografía como es el caso de un estudio para la evaluación de los efectos de diferentes concentraciones de aminoácidos en el medio de cultivo en ratones preimplantacionales cultivados in vitro (Xing *et al.*, 2005).

La preparación de los medios a las concentraciones deseadas fue realizada por el laboratorio de la Fundación Investigación Hospital General Universitario de Valencia. Para realizar las diluciones se partieron de disoluciones de concentración inicial de 100mM de Butirato sódico (Sigma-Aldrich, EEUU), 100mM de L-Arginina (Fluka BioChemika, Sigma-Aldrich, Francia) y de 50mM de L-Glutamato (Fluka BioChemika, Sigma-Aldrich, Francia). Se realizaron diluciones 1/100 y 1/10 para el butírico y la arginina y 1/50 y 1/10 para el glutamato. Se añadieron al medio de cultivo hasta tener la concentración deseada de 1mM y 0,1mM.

Una vez preparados los medios pudimos realizar las placas de cultivo en nuestro laboratorio. Cada placa contiene 9 gotas de 20 μ L cubiertas de 3mL de aceite mineral OvoilTM. Las gotas se colocaron y numeraron formando en sentido horario dejando una gota en el centro de la placa que corresponde al control. Se colocará un embrión por gota salvo en la gota control.

Las placas de cultivo donde se colocaron los embriones fueron equilibradas tras su preparación a 37°C y presión del 6% de CO₂. Los embriones se cultivaron en las placas de cultivo en incubadores a las mismas presiones de O₂ y temperatura que se emplearon en la primera parte del estudio.

Los embriones fueron evaluados a las 24, 48, 72 y 96 horas tras su descongelación para determinar parámetros morfológicos diferenciales entre grupos comparándolos con el grupo control. Dichos parámetros son los utilizados habitualmente en humanos para clasificar morfológicamente a los embriones y determinar así su viabilidad. Se valoraron el ritmo de división, número de células, grado de fragmentación, multinucleación, llegada a estadio de blastocisto y calidad del mismo.

Tras las primeras 24 horas se realizaron nuevas placas para renovar el medio de cultivo de la misma forma que se realizó en el cultivo con embriones humanos en día dos de cultivo en la primera parte del estudio. Tanto el medio empleado para el cultivo durante las primeras 24 horas como el empleado para el resto del desarrollo fue guardado en microtubos de 0.2 mL tal y como se muestra en la Figura 37 y congelado a -18°C para su posterior análisis en el servicio de Metabolómica de la Facultat de Medicina-UCIM, Universitat de València.



Figura 37. Microtubos con numeración y coloración específica para el estudio.

La adquisición de los espectros de RMN se realizó siguiendo idéntico procedimiento al detallado en la parte de adquisición del espectro de RMN de los medios de cultivos embrionarios humanos.

3.6. Tratamiento estadístico de los datos.

Las variables cuantitativas edad de la paciente, ovocitos obtenidos y fecundados, número de células y fragmentación de las células fueron descritas estadísticamente mediante la media y su desviación típica para los grupos con resultados positivos y negativos separadamente. Además, las variables cualitativas descritas en el estudio como calidad embrionaria, simetría y multinucleación fueron descritas en porcentajes.

Tras el estudio descriptivo, se realizó un análisis de regresión logística tomando como variable dependiente la variable resultado y como covariable las variables como edad, ovocitos obtenidos, ovocitos fecundados, número de células y fragmentación.

En el caso de relacionar la variable resultado con la nacionalidad de la paciente, el diagnóstico previo, la calidad embrionaria, la simetría y la multinucleación se realizó un análisis de tablas cruzadas.

A partir de las intensidades obtenidas para cada señal se comprobó, mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov, si la mayoría de las variables seguían una distribución normal. En caso positivo, y para confirmar la importancia estadística univariante de las variables identificadas, se utilizó la prueba paramétrica Student para la comparación de dos medias independientes. En los casos

en los que la mayoría de las variables no siguieron una distribución normal, se empleó una prueba no paramétrica para la comparación de dos medias independientes, la prueba de Mann-Whitney.

Para la medida del grado de relación lineal entre dos variables cuantitativas utilizamos la correlación de Pearson.

La evaluación de la capacidad de predicción, punto de corte óptimo y los valores de sensibilidad y especificidad asociados se realizó mediante una curva ROC.

La valoración de la significación estadística de las diferencias de nuestros datos de valoración morfológica en embriones de ratón la realizamos mediante un test exacto de Fisher, prueba estadística utilizada en el análisis de tablas de contingencia. La prueba es útil para los datos categóricos que resultan de clasificar los objetos en dos formas diferentes, se utiliza para examinar la significación de la asociación (de contingencia) entre los dos tipos de clasificación. Se aplica en la comparación de dos grupos respecto a una variable dicotómica.





RESULTADOS.





4. Resultados.

4.1. Datos demográficos y clínicos.

Las características demográficas y clínicas de las pacientes se muestran de forma resumida en la Tabla 2. Las pacientes que forman parte del estudio pueden ser consideradas como representativas de la población atendida habitualmente en la Unidad de Reproducción Humana del CHGUV, a pesar del ajuste debido por la aplicación de los criterios de inclusión, previamente establecidos y descritos, en el apartado material y métodos de esta tesis.

Se han analizado los datos de un total de 42 ciclos de 40 pacientes que se han sometido a un tratamiento de reproducción asistida en la Unidad de Reproducción Humana del CHGUV entre los años 2010 y 2012. Se han recogido algunos datos demográficos y clínicos de las pacientes (Tabla 2).

Para el grupo de muestras con resultado positivo, la edad media de las pacientes tratadas fue de $34,71 \pm 2,05$ años (media \pm D.T). Este valor contrasta con la edad media del grupo de muestras de las pacientes con resultados negativos que alcanzó una edad de $34,97 \pm 3,54$ años (media \pm D.T).

En cuanto a la nacionalidad para el grupo de muestras con resultado positivo, en un 76.92% de los casos es una paciente de nacionalidad española, mientras que un 23.08% es de nacionalidad rusa. Para el grupo de muestras con resultado negativo, en un 81.54% de los casos es una paciente de nacionalidad española, mientras que un 18.46% es de nacionalidad distinta a la española.

Para el grupo de muestras con resultado positivo, el diagnóstico previo más frecuente es de EOD, suponiendo el 46.15% de los casos. Para el grupo de muestras con resultado negativo, el diagnóstico previo más frecuente es de también EOD, suponiendo el 29.23% de los casos.

La FSH basal no alcanzó las 15 UI aceptadas comúnmente como factor de mal pronóstico, siendo el valor promedio de 7.28 para los casos positivos y de 6.93 para los negativos.

Respecto a la técnica utilizada para el grupo de positivos fue un 53.85%, 15.38% y 30.77% respectivamente para ICSI, FIV y técnica mixta. Respecto a la técnica utilizada para el grupo de negativos fue un 61.54%, 16.92% y 21.54% respectivamente para ICSI, FIV y técnica mixta. Cuantificando el número de ovocitos obtenidos y fecundados en el grupo de casos positivos, el valor promedio fue de $9,00 \pm 4,04$ (media \pm D.T) y $6,14 \pm 2,921$ respectivamente. Sin embargo, para el

grupo de casos negativos, el valor promedio fue de $6,97 \pm 4,56$ de ovocitos obtenidos y $3,83 \pm 2,20$ de ovocitos fecundados.

Tabla 2. Sumario de las características demográficas y clínicas de las pacientes.

| Muestra | Resultado | Edad Paciente | Nacionalidad | Diagnóstico previo | FSH basal | Número de ciclo | Ovocitos Obtenidos | TRA | Ovocitos fecundados | Sacos LCF+ | RNV |
|---------|-----------|---------------|--------------|--------------------|-----------|-----------------|--------------------|-------|---------------------|------------|-----|
| 1 | Positivo | 32 | Rusa | SOP | 6 | 1 | 7 | ICSI | 5 | 2 | 2 |
| 2 | Positivo | 32 | Rusa | SOP | 6 | 1 | 7 | ICSI | 5 | 2 | 2 |
| 3 | Positivo | 35 | Española | OTB | 8,6 | 1 | 11 | FIV | 11 | 2 | 1 |
| 4 | Positivo | 35 | Española | OTB | 8,6 | 1 | 11 | FIV | 11 | 2 | 1 |
| 5 | Positivo | 35 | Española | EOD | 6,03 | 1 | 6 | ICSI | 3 | 2 | 2 |
| 6 | Positivo | 35 | Española | EOD | 6,03 | 1 | 6 | ICSI | 3 | 2 | 2 |
| 7 | Positivo | 32 | Española | EOD | 4,5 | 1 | 15 | Mixta | 8 | 2 | 2 |
| 8 | Positivo | 32 | Española | EOD | 4,05 | 1 | 15 | Mixta | 8 | 2 | 2 |
| 9 | Positivo | 37 | Española | Añosidad | 12,2 | 1 | 4 | ICSI | 4 | 1 | 1 |
| 10 | Positivo | 37 | Española | Ab Rep | 5,3 | 1 | 13 | Mixta | 8 | 2 | 2 |
| 11 | Positivo | 37 | Española | Ab Rep | 5,3 | 1 | 13 | Mixta | 8 | 2 | 2 |
| 12 | Positivo | 35 | Española | EOD | 11 | 1 | 7 | ICSI | 4 | 2 | 1 |
| 13 | Positivo | 35 | Rusa | EOD | 11 | 1 | 7 | ICSI | 4 | 2 | 1 |
| 14 | Negativo | 40 | Española | Añosidad | 6,7 | 1 | 13 | Mixta | 5 | 0 | 0 |
| 15 | Negativo | 40 | Española | Añosidad | 6,7 | 1 | 13 | Mixta | 5 | 0 | 0 |
| 16 | Negativo | 40 | Española | Añosidad | 5,3 | 3 | 6 | ICSI | 2 | 0 | 0 |
| 17 | Negativo | 40 | Española | Añosidad | 5,3 | 3 | 6 | ICSI | 2 | 0 | 0 |
| 18 | Negativo | 40 | Española | Añosidad | 5,3 | 3 | 6 | ICSI | 2 | 0 | 0 |
| 19 | Negativo | 37 | Española | EOD | 10,6 | 1 | 5 | ICSI | 5 | 0 | 0 |
| 20 | Negativo | 37 | Española | EOD | 10,3 | 1 | 5 | ICSI | 5 | 0 | 0 |
| 21 | Negativo | 30 | Rumana | EOD | 6,8 | 1 | 7 | FIV | 6 | 0 | 0 |
| 22 | Negativo | 30 | Rumana | EOD | 9,8 | 1 | 7 | FIV | 6 | 0 | 0 |
| 23 | Negativo | 39 | Española | Añosidad | 5,5 | 3 | 3 | ICSI | 2 | 0 | 0 |
| 24 | Negativo | 39 | Española | Añosidad | 5,5 | 3 | 3 | ICSI | 2 | 0 | 0 |
| 25 | Negativo | 36 | Española | SOP | 6 | 1 | 4 | ICSI | 2 | 0 | 0 |

| Muestra | Resultado | Edad Paciente | Nacionalidad | Diagnóstico previo | FSH basal | Número de ciclo | Ovocitos Obtenidos | TRA | Ovocitos fecundados | Sacos LCF+ | RNV |
|---------|-----------|---------------|--------------|--------------------|-----------|-----------------|--------------------|-------|---------------------|------------|-----|
| 26 | Negativo | 36 | Española | SOP | 6 | 1 | 4 | ICSI | 2 | 0 | 0 |
| 27 | Negativo | 37 | Española | SB | 12,15 | 1 | 4 | ICSI | 3 | 0 | 0 |
| 28 | Negativo | 37 | Española | SB | 12,15 | 1 | 4 | ICSI | 3 | 0 | 0 |
| 29 | Negativo | 40 | Española | Añosidad | 6 | 2 | 3 | ICSI | 2 | 0 | 0 |
| 30 | Negativo | 40 | Española | Añosidad | 6 | 2 | 3 | ICSI | 2 | 0 | 0 |
| 31 | Negativo | 30 | Española | EOD | 3,3 | 2 | 12 | ICSI | 7 | 0 | 0 |
| 32 | Negativo | 30 | Española | EOD | 3,3 | 2 | 12 | ICSI | 7 | 0 | 0 |
| 33 | Negativo | 31 | Española | SOP | 6,81 | 1 | 10 | Mixta | 6 | 0 | 0 |
| 34 | Negativo | 31 | Española | SOP | 6,81 | 1 | 10 | Mixta | 6 | 0 | 0 |
| 35 | Negativo | 28 | Rusa | OTU | 4 | 3 | 8 | Mixta | 5 | 0 | 0 |
| 36 | Negativo | 28 | Rusa | OTU | 4 | 3 | 8 | Mixta | 5 | 0 | 0 |
| 37 | Negativo | 28 | Rusa | OTU | 4 | 3 | 8 | Mixta | 5 | 0 | 0 |
| 38 | Negativo | 33 | Española | EOD | 9 | 2 | 1 | ICSI | 1 | 0 | 0 |
| 39 | Negativo | 31 | Española | SOP | 3,9 | 1 | 20 | Mixta | 8 | 0 | 0 |
| 40 | Negativo | 34 | Española | EOD | 6,08 | 1 | 7 | ICSI | 6 | 0 | 0 |
| 41 | Negativo | 34 | Española | EOD | 6,08 | 1 | 7 | ICSI | 6 | 0 | 0 |
| 42 | Negativo | 36 | Española | SOP | 6 | 2 | 2 | ICSI | 2 | 0 | 0 |
| 43 | Negativo | 36 | Española | SOP | 6 | 2 | 2 | ICSI | 2 | 0 | 0 |
| 44 | Negativo | 32 | Española | EOD | 5,9 | 3 | 6 | FIV | 5 | 0 | 0 |
| 45 | Negativo | 32 | Española | EOD | 5,9 | 3 | 6 | FIV | 5 | 0 | 0 |
| 46 | Negativo | 32 | Española | OTU | 9,54 | 2 | 12 | FIV | 8 | 0 | 0 |
| 47 | Negativo | 32 | Española | OTU | 9,54 | 2 | 12 | FIV | 8 | 0 | 0 |
| 48 | Negativo | 34 | Española | EOD | 5,5 | 1 | 9 | MIXTA | 3 | 0 | 0 |
| 49 | Negativo | 34 | Española | EOD | 5,5 | 1 | 9 | MIXTA | 3 | 0 | 0 |
| 50 | Negativo | 34 | Española | SOP | 3 | 2 | 17 | ICSI | 7 | 0 | 0 |
| 51 | Negativo | 34 | Española | SOP | 3 | 2 | 17 | ICSI | 7 | 0 | 0 |
| 52 | Negativo | 39 | Española | Añosidad | 5,5 | 2 | 3 | ICSI | 2 | 0 | 0 |
| 53 | Negativo | 39 | Española | Añosidad | 5,5 | 2 | 3 | ICSI | 2 | 0 | 0 |
| 54 | Negativo | 38 | Española | Añosidad | 6,41 | 1 | 1 | FIV | 1 | 0 | 0 |
| 55 | Negativo | 37 | Española | EOD | 5,8 | 1 | 8 | ICSI | 5 | 0 | 0 |
| 56 | Negativo | 36 | Africana | EOD | 8 | 1 | 8 | ICSI | 5 | 0 | 0 |
| 57 | Negativo | 36 | Africana | EOD | 8 | 1 | 8 | ICSI | 5 | 0 | 0 |
| 58 | Negativo | 34 | Española | Combinada | 5 | 3 | 8 | ICSI | 6 | 0 | 0 |

| Muestra | Resultado | Edad Paciente | Nacionalidad | Diagnóstico previo | FSH basal | Número de ciclo | Ovocitos Obtenidos | TRA | Ovocitos fecundados | Sacos LCF+ | RNV |
|---------|-----------|---------------|--------------|--------------------|-----------|-----------------|--------------------|-------|---------------------|------------|-----|
| 59 | Negativo | 34 | Española | Combinada | 5 | 3 | 8 | ICSI | 6 | 0 | 0 |
| 60 | Negativo | 36 | Española | OTB | 9 | 1 | 5 | ICSI | 2 | 0 | 0 |
| 61 | Negativo | 36 | Española | OTB | 9 | 1 | 5 | ICSI | 2 | 0 | 0 |
| 62 | Negativo | 31 | Rumana | Endometriosis | 6,7 | 1 | 5 | ICSI | 1 | 0 | 0 |
| 63 | Negativo | 37 | Española | EOD | 8 | 2 | 3 | ICSI | 1 | 0 | 0 |
| 64 | Negativo | 38 | Española | Endometriosis | 7,7 | 2 | 14 | ICSI | 4 | 0 | 0 |
| 65 | Negativo | 38 | Española | Endometriosis | 7,7 | 2 | 14 | ICSI | 4 | 0 | 0 |
| 66 | Negativo | 26 | Española | SOP | 6,3 | 1 | 3 | Mixta | 2 | 0 | 0 |
| 67 | Negativo | 26 | Española | SOP | 6,3 | 1 | 3 | Mixta | 2 | 0 | 0 |
| 68 | Negativo | 35 | Rusa | OTB | 9 | 1 | 6 | FIV | 2 | 0 | 0 |
| 69 | Negativo | 35 | Rusa | OTB | 9 | 1 | 6 | FIV | 2 | 0 | 0 |
| 70 | Negativo | 33 | Española | OTB | 13,4 | 1 | 5 | ICSI | 2 | 0 | 0 |
| 71 | Negativo | 33 | Española | OTB | 13,4 | 1 | 5 | ICSI | 2 | 0 | 0 |
| 72 | Negativo | 32 | Española | EOD | 6 | 1 | 4 | ICSI | 3 | 0 | 0 |
| 73 | Negativo | 32 | Española | EOD | 6 | 1 | 4 | ICSI | 3 | 0 | 0 |
| 74 | Negativo | 37 | Española | Añosidad | 12,2 | 1 | 4 | ICSI | 4 | 0 | 0 |
| 75 | Negativo | 39 | Brasileña | Añosidad | 6,3 | 2 | 15 | Mixta | 8 | 0 | 0 |
| 76 | Negativo | 39 | Brasileña | Añosidad | 6,3 | 2 | 15 | Mixta | 8 | 0 | 0 |
| 77 | Negativo | 37 | Española | SOP | 7,7 | 1 | 10 | FIV | 5 | 0 | 0 |
| 78 | Negativo | 37 | Española | SOP | 7,7 | 1 | 10 | FIV | 5 | 0 | 0 |

RNV recién nacido vivo; LCF latido cardíaco fetal; SOP Síndrome ovario poliquístico; OTB obstrucción tubárica bilateral; EOD esterilidad de origen desconocido; Ab Rep aborto repetición; SB salpinguectomía bilateral; OTU obstrucción tubárica unilateral.

La calidad de los embriones cuyas muestras de medio de cultivo fueron analizadas en el estudio se muestra de forma resumida en la Tabla 3. Para el grupo de muestras con resultado positivo un 62 % de los embriones tuvieron una calidad tipo A, un 23 % de las pacientes tienen una calidad embrionaria tipo B y un 15 % tiene una calidad embrionaria tipo C. Analizando las muestras con resultado negativos vimos que un 48 % de los embriones presentaron una calidad embrionaria tipo A, un 39 % tuvieron una calidad embrionaria tipo B, un 12 % tipo C y un 1 % tipo D.

En cuanto al número de células de los embriones, el grupo de pacientes con resultados positivos tuvieron embriones con un número de células de $3,78 \pm 0,56$, y en el caso de los resultados negativos, las pacientes tuvieron embriones con un número de células de $5,60 \pm 0,70$.

Respecto a la fragmentación celular las pacientes del grupo con resultados positivos presentaron una fragmentación de $6,78 \pm 8,98$, y en el caso de las pacientes del grupo con resultados negativos un $6,55 \pm 9,56$.

En cuanto a la simetría, un 77 % de los casos presentaron simetría respecto a los 23 % de los casos que fueron asimétricos. Finalmente, un 95 % de las pacientes del grupo con resultados negativos no presentaron multinucleación frente al 5 % de las pacientes que presentaron esta característica.

Tabla 3. Sumario de las características morfológicas de los embriones humanos.

| Muestra | Resultado | Calidad Embrionaria | Nº Células | % Fragmentación | Simetría | Multinucleación |
|----------------|------------------|----------------------------|-------------------|------------------------|-----------------|------------------------|
| 1 | Positivo | A | 4 | 0 | Sí | No |
| 2 | Positivo | A | 4 | 0 | Sí | No |
| 3 | Positivo | A | 4 | 0 | Sí | No |
| 4 | Positivo | A | 4 | 0 | Sí | No |
| 5 | Positivo | A | 4 | 0 | Sí | No |
| 6 | Positivo | A | 4 | 0 | Sí | No |
| 7 | Positivo | B | 4 | 20 | Sí | No |
| 8 | Positivo | C | 4 | 20 | Sí | No |
| 9 | Positivo | A | 4 | 0 | Sí | No |
| 10 | Positivo | A | 4 | 0 | Sí | No |
| 11 | Positivo | B | 4 | 20 | Sí | No |
| 12 | Positivo | B | 3 | 0 | Sí | No |
| 13 | Positivo | C | 2 | 35 | Sí | No |
| 14 | Negativo | A | 4 | 0 | Sí | No |
| 15 | Negativo | B | 4 | 20 | Sí | No |
| 16 | Negativo | B | 4 | 20 | No | No |
| 17 | Negativo | B | 4 | 20 | Sí | No |
| 18 | Negativo | C | 4 | 35 | No | No |
| 19 | Negativo | A | 4 | 0 | Sí | No |
| 20 | Negativo | A | 4 | 0 | Sí | No |
| 21 | Negativo | A | 4 | 0 | Sí | No |
| 22 | Negativo | A | 4 | 20 | No | No |
| 23 | Negativo | A | 4 | 0 | Sí | No |
| 24 | Negativo | B | 2 | 0 | Sí | No |
| 25 | Negativo | B | 3 | 0 | No | No |
| 26 | Negativo | B | 3 | 0 | No | No |
| 27 | Negativo | A | 4 | 0 | Sí | No |
| 28 | Negativo | B | 2 | 0 | No | No |
| 29 | Negativo | B | 5 | 20 | No | No |
| 30 | Negativo | B | 6 | 20 | No | Sí |
| 31 | Negativo | A | 4 | 20 | No | No |

| Muestra | Resultado | Calidad Embrionaria | Nº Células | % Fragmentación | Simetría | Multinucleación |
|----------------|------------------|----------------------------|-------------------|------------------------|-----------------|------------------------|
| 32 | Negativo | A | 4 | 0 | No | o |
| 33 | Negativo | A | 4 | 0 | Sí | No |
| 34 | Negativo | A | 4 | 0 | Sí | No |
| 35 | Negativo | B | 3 | 20 | No | Sí |
| 36 | Negativo | C | 4 | 40 | No | No |
| 37 | Negativo | C | 3 | 0 | No | No |
| 38 | Negativo | B | 2 | 0 | Sí | No |
| 39 | Negativo | A | 4 | 0 | Sí | No |
| 40 | Negativo | A | 4 | 0 | Sí | No |
| 41 | Negativo | A | 4 | 0 | Sí | No |
| 42 | Negativo | B | 4 | 20 | Sí | No |
| 43 | Negativo | C | 2 | 35 | No | No |
| 44 | Negativo | C | 6 | 0 | Sí | No |
| 45 | Negativo | B | 2 | 0 | Sí | No |
| 46 | Negativo | C | 3 | 0 | Sí | No |
| 47 | Negativo | B | 4 | 20 | Sí | No |
| 48 | Negativo | B | 5 | 0 | No | No |
| 49 | Negativo | B | 2 | 20 | Sí | No |
| 50 | Negativo | B | 4 | 20 | Sí | No |
| 51 | Negativo | B | 2 | 0 | Sí | No |
| 52 | Negativo | A | 4 | 0 | Sí | No |
| 53 | Negativo | B | 2 | 0 | Sí | No |
| 54 | Negativo | A | 4 | 0 | Sí | No |
| 55 | Negativo | A | 4 | 10 | Sí | No |
| 56 | Negativo | A | 4 | 0 | Sí | No |
| 57 | Negativo | B | 5 | 20 | Sí | No |
| 58 | Negativo | A | 4 | 0 | Sí | No |
| 59 | Negativo | A | 4 | 0 | Sí | No |
| 60 | Negativo | A | 4 | 0 | Sí | No |
| 61 | Negativo | B | 4 | 20 | Sí | No |
| 62 | Negativo | A | 4 | 0 | Sí | No |
| 63 | Negativo | A | 4 | 0 | Sí | No |
| 64 | Negativo | A | 4 | 0 | Sí | No |
| 65 | Negativo | B | 2 | 0 | Sí | No |
| 66 | Negativo | B | 2 | 0 | Sí | Sí |

| Muestra | Resultado | Calidad Embrionaria | Nº Células | % Fragmentación | Simetría | Multinucleación |
|---------|-----------|---------------------|------------|-----------------|----------|-----------------|
| 67 | Negativo | C | 3 | 20 | Sí | No |
| 68 | Negativo | C | 3 | 20 | Sí | No |
| 69 | Negativo | D | 2 | 60 | Sí | No |
| 70 | Negativo | B | 4 | 20 | Sí | No |
| 71 | Negativo | B | 2 | 0 | Sí | No |
| 72 | Negativo | A | 4 | 0 | Sí | No |
| 73 | Negativo | A | 4 | 0 | Sí | No |
| 74 | Negativo | A | 4 | 0 | Sí | No |
| 75 | Negativo | A | 4 | 0 | Sí | No |
| 76 | Negativo | A | 4 | 0 | Sí | No |
| 77 | Negativo | A | 4 | 0 | Sí | No |
| 78 | Negativo | A | 4 | 0 | Sí | No |

Teniendo en cuenta estas variables, el análisis de regresión logística demostró que sólo la variable ovocitos fecundados tiene influencia estadísticamente significativa sobre la variable resultado ($\chi^2=6,30$; $p=0,01$) frente a las variables edad ($\chi^2=0,41$; $p=0,52$), ovocitos obtenidos ($\chi^2=1,61$; $p=0,20$), nº de células ($\chi^2=1,13$; $p=0,711$) y fragmentación ($\chi^2=2,96$; $p=0,587$).

Además, el análisis de tablas cruzadas indicó la ausencia de significación estadística de las variables nacionalidad (Prueba de Fisher: $\chi^2=3,050$; $p=0,536$), diagnóstico previo (Prueba de Fisher: $\chi^2=10,24$; $p=0,16$), calidad embrionaria (Prueba de Fisher: $\chi^2=1,84$; $p=0,64$), simetría (Prueba de Fisher: $\chi^2=3,71$; $p=0,11$) y multinucleación (Prueba de Fisher: $\chi^2=0,616$; $p=1,0$).

La ausencia de significación estadística entre las variables analizadas y los dos grupos parece indicar que los resultados de nuestro estudio no se vieron afectados por la variabilidad intergrupo.

4.2. Muestras.

Inicialmente, dispusimos de un total de 80 muestras de medio de cultivo, de las cuales hubo que descartar 2 muestras de una paciente por contaminación. Finalmente fueron 78 las muestras analizadas por RMN de las cuales obtuvimos el perfil metabólico de las cuales 65 se incluyeron en el grupo de no implantación y 13 en el grupo implantación. Por cada paciente procesamos una o dos muestras según el número de embriones transferidos.

4.3. Obtención del perfil metabólico del medio de cultivo de embriones humanos mediante RMN.

El primer objetivo planteado en esta tesis fue obtener el perfil metabólico del medio de cultivo embrionario humano mediante RMN. Como se ha explicado en el apartado material y métodos diseñamos un estudio en el que se recogieron muestras de medio de cultivo embrionario donde permanecieron los embriones hasta el momento de su transferencia en día dos de cultivo. En función de los resultados de implantación de dichos embriones el total de muestras de medio de cultivo quedó dividido en dos grupos. Un primer grupo de muestras constituido por las pacientes que tuvieron una implantación, grupo de muestras al que llamamos positivas. En este grupo se incluyeron los casos en los que habiéndose transferido un solo embrión el resultado fue un embarazo único o los casos en los que habiéndose transferido dos embriones se obtuvo como resultado una gestación gemelar. Quedaron por lo tanto excluidas del estudio aquellas muestras procedentes de la transferencia de dos embriones y que dieron lugar a una gestación única por la imposibilidad de saber con absoluta certeza cuál de los dos embriones habría implantado. El segundo grupo quedó constituido por aquellas muestras que dieron como resultado la no implantación, grupo al que llamamos negativas.

4.3.1. Análisis mediante RMN del medio de cultivo de embriones humanos.

Los medios de cultivo embrionarios humanos fueron analizados mediante espectrometría de RMN y dieron lugar a una colección de 78 espectros de alta calidad.

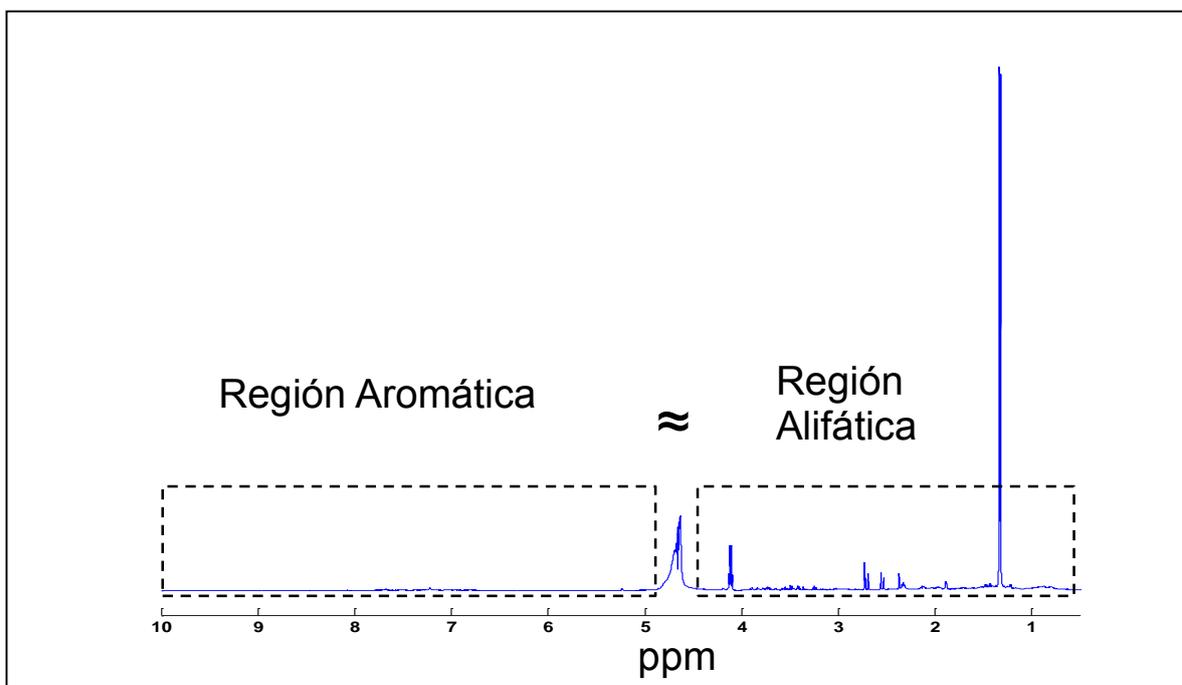


Figura 38. Espectro de ^1H RMN representativo de las muestras de medio de cultivo embrionario dónde se señalan las dos grandes regiones en que se puede dividir el espectro (alifática y aromática).

El espectro promedio del medio de cultivo embrionario (Figura 38) presenta una buena relación señal/ruido, una línea base plana y una buena resolución de la multiplicidad química de las señales. Se pueden apreciar gran cantidad de señales, atribuibles a los diferentes metabolitos presentes en el medio, especialmente en la región alifática del espectro. Existe una señal muy intensa sobre la región de 1.3-1.4 ppm que corresponde a la molécula de lactato y que domina el espectro. Sobre la región de 4.6-4.8 ppm aparece otra señal intensa y muy ancha que corresponde a los protones de la molécula de H_2O . El hecho de que esta señal no sea la más intensa del espectro, a pesar de ser la molécula más concentrada del medio, se debe a la supresión de la señal del agua practicada, y por tanto, es un reflejo de la buena calidad del espectro obtenido.

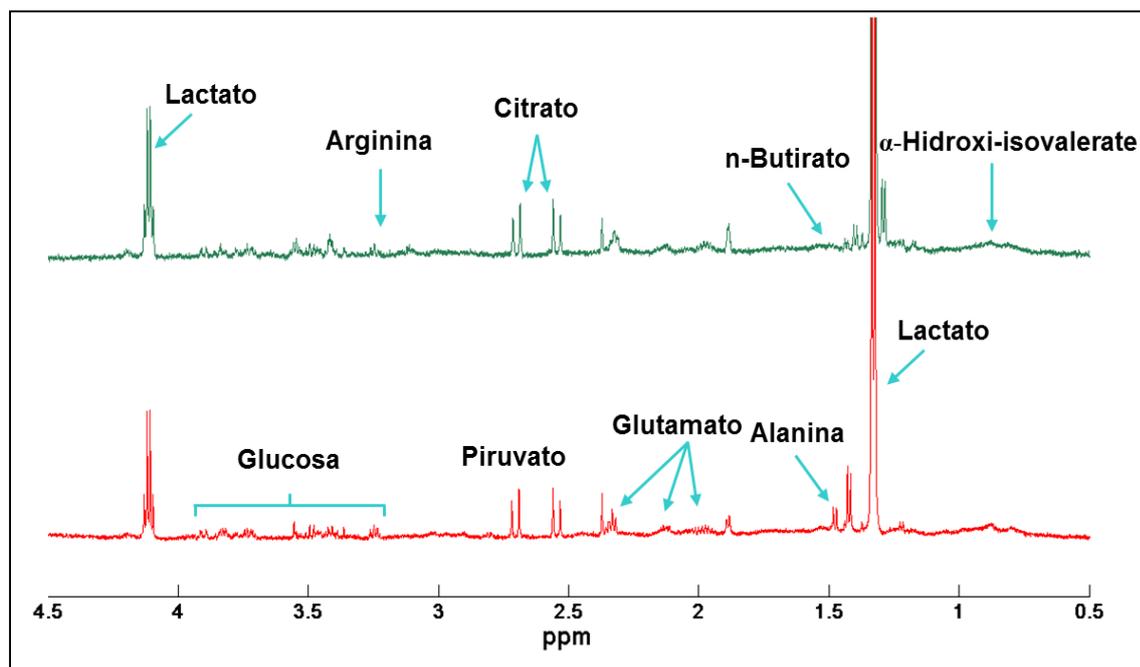


Figura 39. Espectro de ^1H RMN representativo (parte alifática) de las muestras de medio de cultivo embrionario para un caso negativo de implantación (rojo) y otro positivo (verde).

En la Figura 39 se muestra una comparativa, con mayor detalle de la parte alifática del espectro de muestras representativas de los dos tipos de medio de cultivo de embrionario obtenidos. Como podemos observar la señal dominante del espectro es la que corresponde a la molécula de lactato que es mucho más intensa que el resto. Cuando existe una señal que presenta una diferencia tan importante de intensidad respecto el resto, ésta domina la normalización. Por esta razón, la región que comprende la señal del lactato fue excluida del área de normalización del espectro completo. Igualmente, aunque de menor intensidad, se pueden identificar otras muchas señales asociadas a otros metabolitos como alanina, isovalerato, butirato, citrato y multitud de picos asociados a la molécula de glucosa.

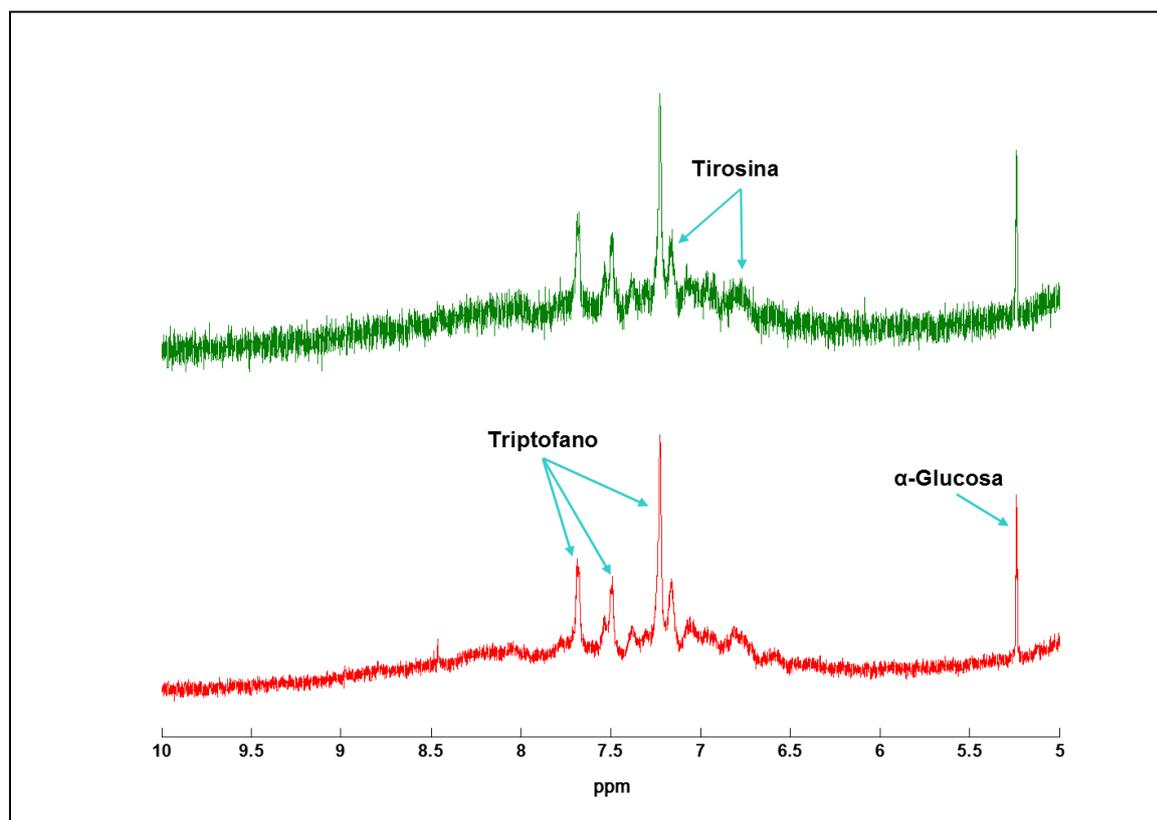


Figura 40. Detalle ampliado de la zona aromática del espectro de ^1H RMN representativo de las muestras de medio de cultivo embrionario para un caso negativo de implantación (rojo) y otro positivo (verde).

La parte aromática del espectro mostrada en la Figura 40 presenta un número más reducido de señales, con menor intensidad, más solapadas pero que pueden ser integradas e incluidas en el análisis. Entre los metabolitos que se pueden identificar resalta la presencia de señales atribuibles a las moléculas de α -glucosa, triptófano y tirosina. La comparación visual de los dos espectros no muestra diferencias importantes entre los grupos. Procedemos a cuantificar las diferentes regiones espectrales identificadas y aplicar un análisis estadístico multivariable a los resultados. Para los casos con solapamiento de picos o asignación incierta, se emplearon espectros bidimensionales (2D) como el que se muestra en la Figura 41.

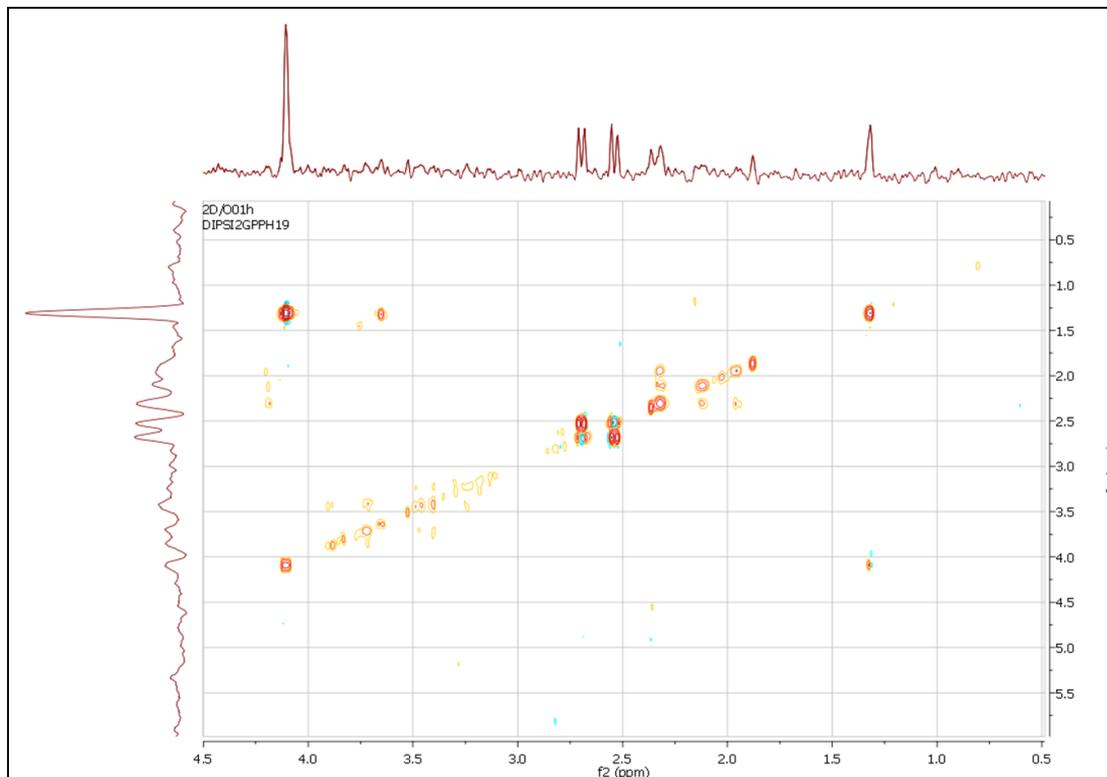


Figura 41. Secuencia TOCSY 2D de correlación ¹H-¹H utilizada en la asignación e identificación de los picos más solapados.

En concreto, hemos empleado una secuencia tipo TOCSY 2D de correlación homonuclear ¹H-¹H donde las dos dimensiones corresponden al mismo núcleo, en nuestro caso el ¹H. Esta secuencia aporta información valiosa de las relaciones entre los protones de una misma molécula. Las señales aparecen menos solapadas en el espectro bidimensional y por tanto resulta más sencilla su asignación.

4.3.2. Análisis del espectro de RMN del medio de cultivo de embriones humanos mediante métodos quimiométricos.

Se construyó una matriz de datos a la que se aplicaron las técnicas exploratorias quimiométricas más comunes. Comenzamos con un análisis no supervisado de componentes principales (PCA). El objetivo del análisis fue condensar toda la información metabólica dada por una serie de variables, en un número restringido de variables latentes o PC pero conservando la máxima información. Este análisis nos permitió detectar agrupaciones y patrones de distribución de las distintas muestras en función de su composición metabólica global.

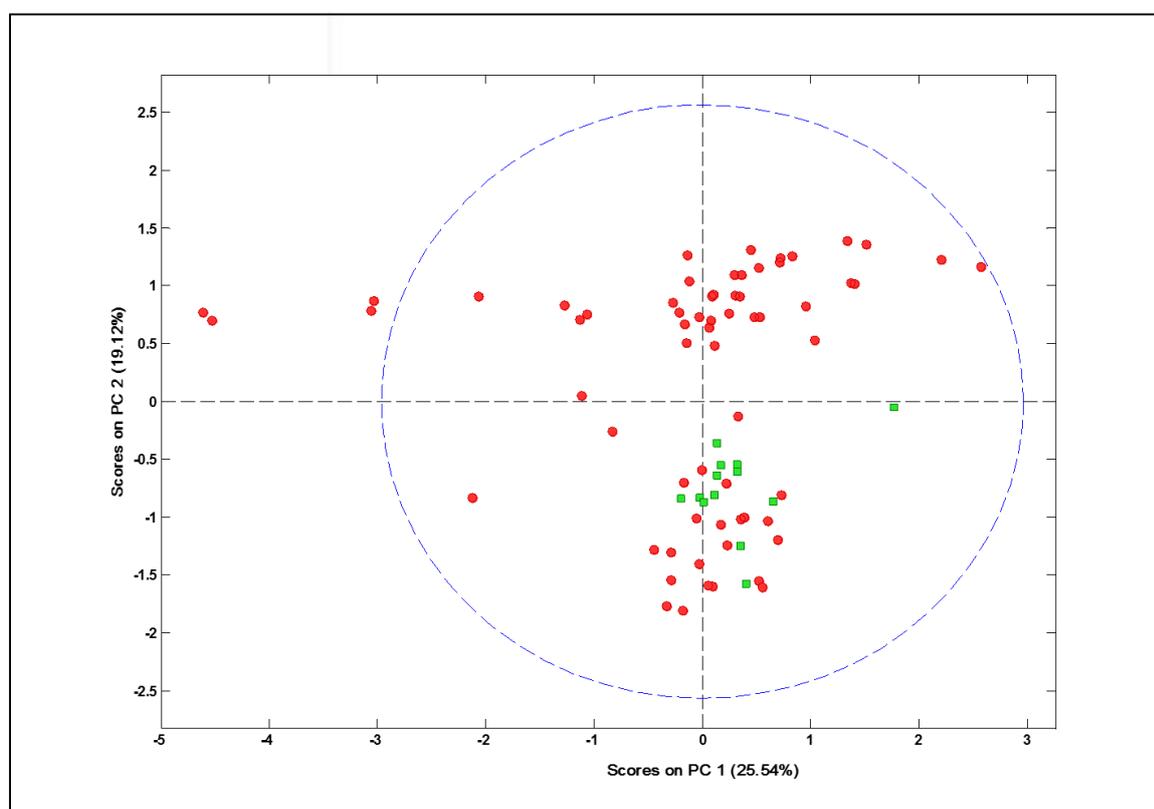


Figura 42. Diagrama de puntuaciones del PCA obtenido que muestra la proyección en dos dimensiones de la información metabólica completa de todas las muestras. En círculos en rojo se identifican las muestras negativas, y en cuadrados verdes las muestras positivas.

Procedemos a realizar un PCA de las 78 muestras donde cada una de ellas está definida por su perfil metabólico completo. Tras el troceado del espectro en segmentos de 0.005 ppm, la composición metabólica de cada muestra quedó caracterizada por 2000 variables (el espectro completo excepto la región del H₂O). El resultado del PCA mostrado en la Figura 42 mostró la existencia de un incipiente agrupamiento de las muestras en base a los dos grupos definidos (positivas y negativas). Pero este agrupamiento no discrimina completamente entre los dos grupos. La región del espacio multivariable que ocupan las muestras positivas está, casi en su totalidad, solapado con el espacio ocupado por las muestras negativas. Las muestras negativas presentan una mayor dispersión y parece que puedan dividirse a su vez en dos subgrupos. Esto podría deberse a la existencia de otra fuente de variabilidad incluida en los datos pero diferente a la viabilidad embrionaria. Adicionalmente, el PCA resulta de especial utilidad para la identificación de posibles muestras estadísticamente aberrantes como las que gráficamente podemos observar en el diagrama de puntuaciones. Mediante el PCA identificamos 4 muestras negativas que presentan un contenido metabólico muy diferente al resto de muestras, tanto de su grupo como del conjunto total (*outlayers*). Estas cuatro muestras son las que se sitúan a valores más negativos de PC1 y fuera del área que comprende el 95% del límite de confianza (representado como una circunferencia punteada en azul).

De forma complementaria, el estudio detallado del diagrama de cargas del PCA nos aporta información sobre las regiones del espectro que contribuyen en mayor medida a la separación espontánea de las muestras, es decir, las regiones que presentan mayor variabilidad entre los dos grupos. Una vez más, la intensidad de la señal asociada a la molécula de lactato es muy superior al resto de contribuciones. Una pequeña variación en el nivel de lactato tiene una contribución enorme a la variabilidad total del sistema, y por tanto, una contribución exageradamente mayoritaria en la construcción del PCA. La información extraída del diagrama de cargas coincide con lo observado en el espectro de RMN del medio. La diferencia de intensidad de la señal del lactato respecto al resto de metabolitos presentes en el medio aconseja su eliminación tanto de la región de normalización como de las regiones incluidas en las técnicas exploratorias de datos (PCA y PLS-DA).

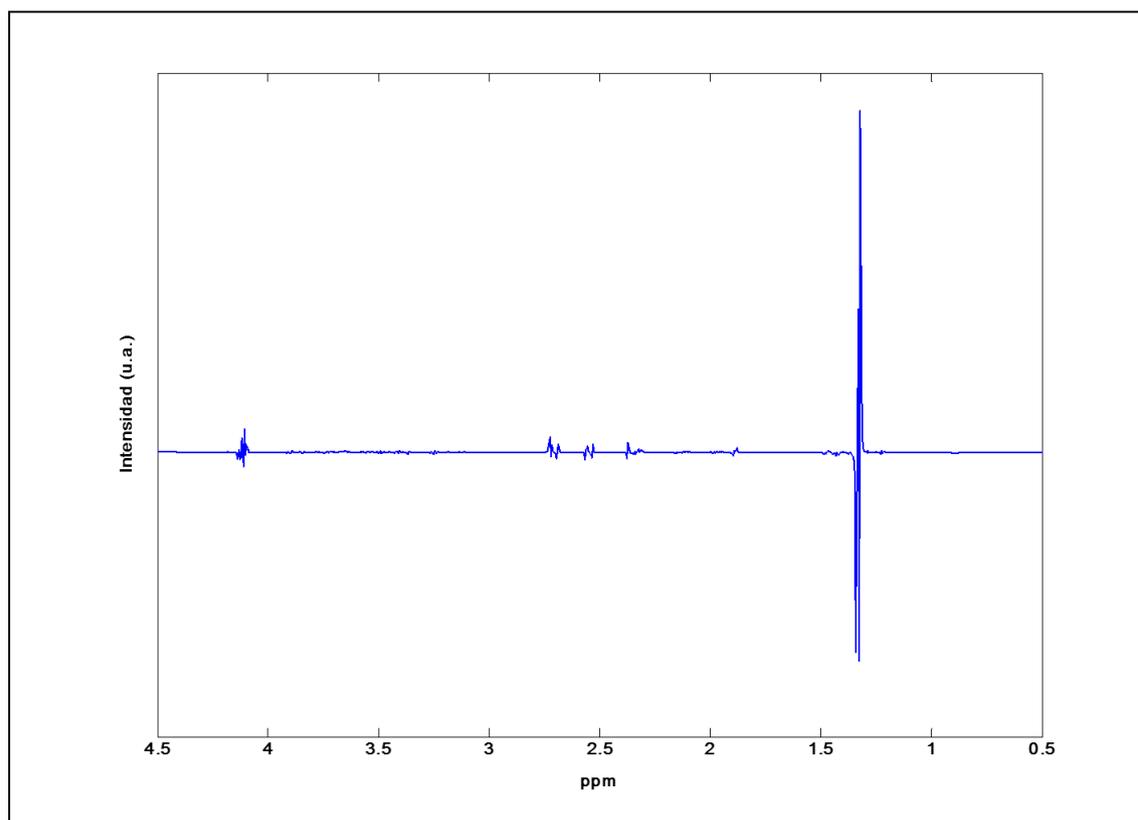


Figura 43. Diagrama de cargas del PCA de la región alifática.

Una vez comprobado que las muestras no se agrupan espontáneamente en base a nuestros criterios (positiva y negativa), procedemos a construir un modelo discriminadorio PLS-DA pero excluyendo del mismo la región del lactato y las cuatro muestras identificadas como aberrantes en el PCA.

En los sistemas donde la separación entre grupos es compleja, como fue nuestro caso, realizamos un análisis discriminante supervisado PLS-DA basado en la información obtenida del PCA con el fin de favorecer la separación entre grupos. Se emplearon las dos primeras componentes principales del PLS-DA, las cuales explican hasta un 29 % de la variabilidad total, y se procedió a construir un modelo que eliminase toda la variabilidad no relacionada directamente con nuestro criterio de clasificación de dos grupos.

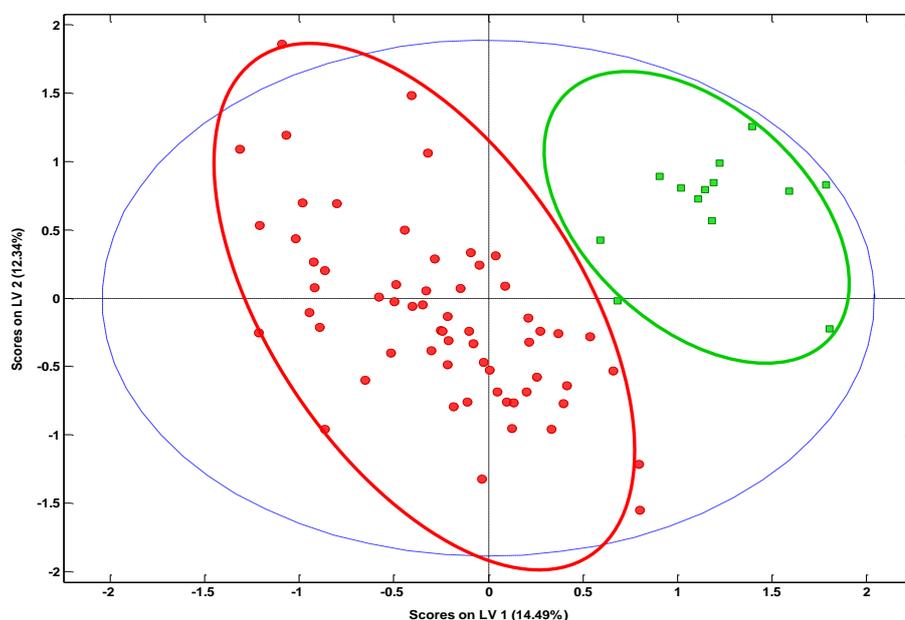


Figura 44. Diagrama de puntuaciones del análisis PLS-DA donde se muestra el agrupamiento de las muestras negativas (rojo) y positivas (verde). Las elipses dibujadas han sido incluidas solo con un objetivo ilustrador.

Los resultados son los mostrados en el diagrama de puntuaciones (Figura 44) donde se puede observar una excelente separación entre las muestras positivas y negativas, y un mínimo solapamiento entre los dos grupos.

Una vez construido el modelo discriminante, el siguiente paso fue la identificación de las regiones o picos del espectro que más participan en nuestro modelo y que contribuían en mayor medida a la separación de los dos grupos.

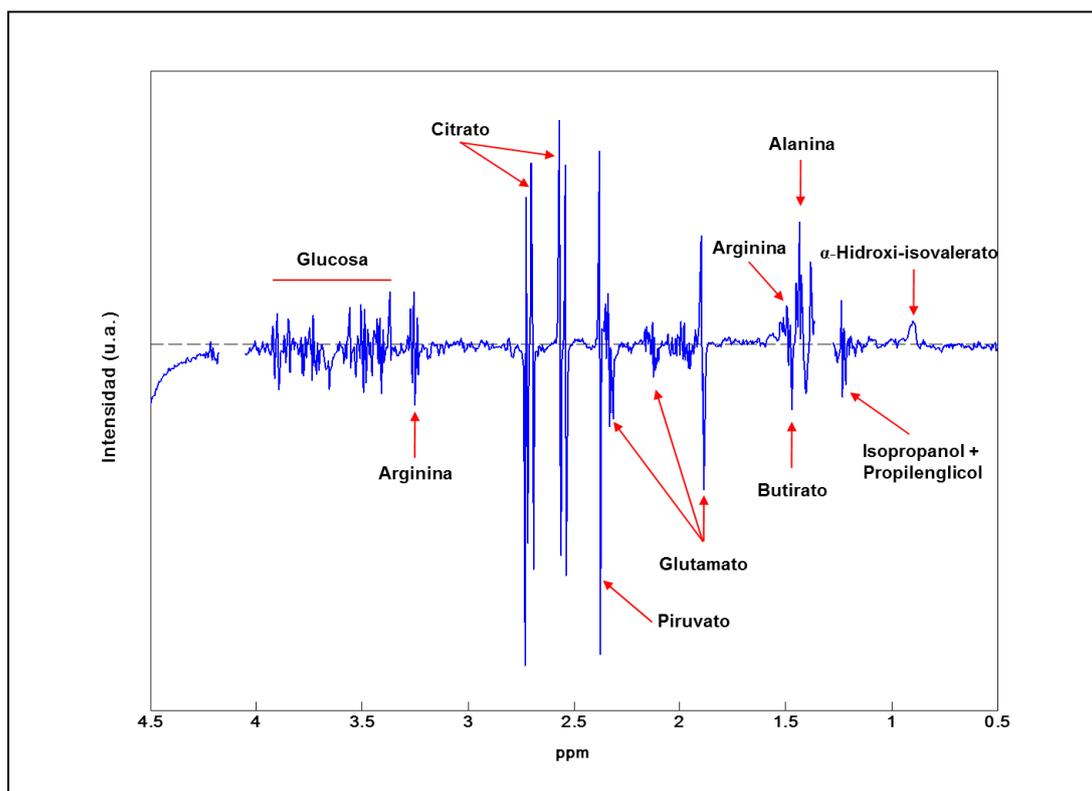


Figura 45. Diagrama de cargas del PLS-DA completo de la región alifática del espectro.

Para ello consultamos el diagrama de cargas del PLS-DA, y comprobamos como las regiones con mayor contribución al modelo discriminativo son aquellas asociadas a metabolitos como el ácido hidroxisovalerico, alanina, n-butilato, arginina, glutamato, piruvato, citrato, isopropanol + polietilenglicol y diversos picos de glucosa como puede verse en la Figura 45.

Una vez identificadas las regiones/señales con mayor peso en la construcción del modelo discriminativo PLS-DA, procedimos a la asignación e integración de la señal. Para comprobar que las variables continuas se ajustan a una distribución normal se utilizó el test de Kolmogorov-Smirnov. La comparación entre las medias de las integrales de los dos grupos se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía. El resultado de la cuantificación de estas regiones y su significación estadística se muestra de forma resumida en la Tabla 4.

Tabla 4. Regiones espectrales con mayor contribución al modelo discriminante.

| Región (ppm) | Metabolito | <i>p</i> | Positivo ± DS | Negativo± DS | P/N |
|--------------|-------------------------|----------|-------------------|------------------|------|
| 0.74-0.84 | Ác. 2-hidroxisovalerico | 0.026 | 0.00248± 1.3e-4 | 0.00236 ± 1.7e-4 | 1.05 |
| 1.46-1.49 | Alanina | 0.005 | 0.0126 ± 0.0048 | 0.0108 ± 6e-4 | 1.17 |
| 1.53-1.58 | Butirato | 0.038 | 0.00417±1.4e-4 | 0.004 ± 2.7e-4 | 1.04 |
| 1.60-1.62 | Arginina | 0.030 | 0.00433 ± 3e-4 | 0.00413 ± 2.7e-4 | 1.05 |
| 2.02-2.08 | Glutamato | 0.0006 | 0.00722 ± 3.97e-4 | 0.00683 ± 3e-4 | 1.06 |

P *p*-valor de la comparación de medias positiva vs negativa; DS desviación estándar; P/N Cociente intensidad grupo positivos y negativos. Los niveles están expresados como el área del metabolito de interés dividido con respecto al área total alifática.

Tabla 5. Regiones espectrales con contribución importante al modelo discriminante.

| Región (ppm) | Metabolito | <i>p</i> | Positivo ± DS | Negativo± DS | P/N |
|--------------|----------------|----------|---------------------|--------------------|------|
| 1.13-1.16 | Propilenglicol | 0.126 | 0.0146 ± 0.001 | 0.0139 ± 0.0014 | 1.05 |
| 1.28-1.30 | Treonina | 0.07 | 0.0174 ± 0.0102 | 0.0132 ± 0.0067 | 1.32 |
| 1.94-2.02 | Prolina | 0.092 | 0.0446 ± 0.0018 | 0.0431 ± 0.0031 | 1.03 |
| 2.36-2.40 | Piruvato | 0.06 | 0.0220 ± 0.0013 | 0.0239 ± 0.0023 | 0.92 |
| 3.27-3.32 | Triptofano | 0.054 | 0.0088 ± 0.0016 | 0.0077 ± 0.0018 | 1.14 |
| 3.81-3.92 | Glucosa | 0.073 | 0.00292 ± 1.6e-4 | 0.00304 ± 2e-4 | 0.96 |

P *p*-valor de la comparación de medias positiva vs negativa; DS desviación estándar; P/N Cociente intensidad grupo positivos y negativos. Los niveles están expresados como el área del metabolito de interés dividido con respecto al área total alifática.

En las Tablas 4 y 5 se presenta la cuantificación de las regiones que contribuyen en mayor medida al modelo discriminatorio, el valor de área relativa promedio para cada uno de los dos grupos, la desviación estándar del valor de la media y el valor de significación estadística *p* de la comparación de las medias positivas frente a negativas. La última columna (P/N) resulta del cociente de intensidad entre los datos positivos y los negativos. En la Tabla 4 se agrupan los metabolitos cuya diferencia

entre la media del grupo positivo frente a la del grupo negativo resulta estadísticamente significativa ($p < 0,05$). Las presentadas en la Tabla 5 son aquellas regiones que tienen igualmente una contribución importante en la construcción del PLS-DA pero que no presentan diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos.

4.3.3. Validación cruzada.

Hemos realizado una validación cruzada de los datos empleados en el modelo PLS-DA para evaluar la calidad y la robustez del modelo construido, y a la vez confirmar que no tenemos un sobreajuste del mismo. El problema del sobreajuste puede ocurrir cuando el tamaño de los datos de entrenamiento del modelo es pequeño o cuando el número de parámetros del modelo es grande.

Para comprobar la bondad del método predictivo se empleó una validación cruzada tipo *Venetian Blinds*. El resultado de esta validación cruzada se presenta de forma gráfica con la construcción de la curva ROC. De forma numérica, valoramos la potencia y la exactitud del modelo en base a los parámetros de validación R^2Y y Q^2 . En general, se consideran valores de AUC aceptables para un marcador de diagnóstico a partir de 0.75 (Fan *et al.*, 2006).

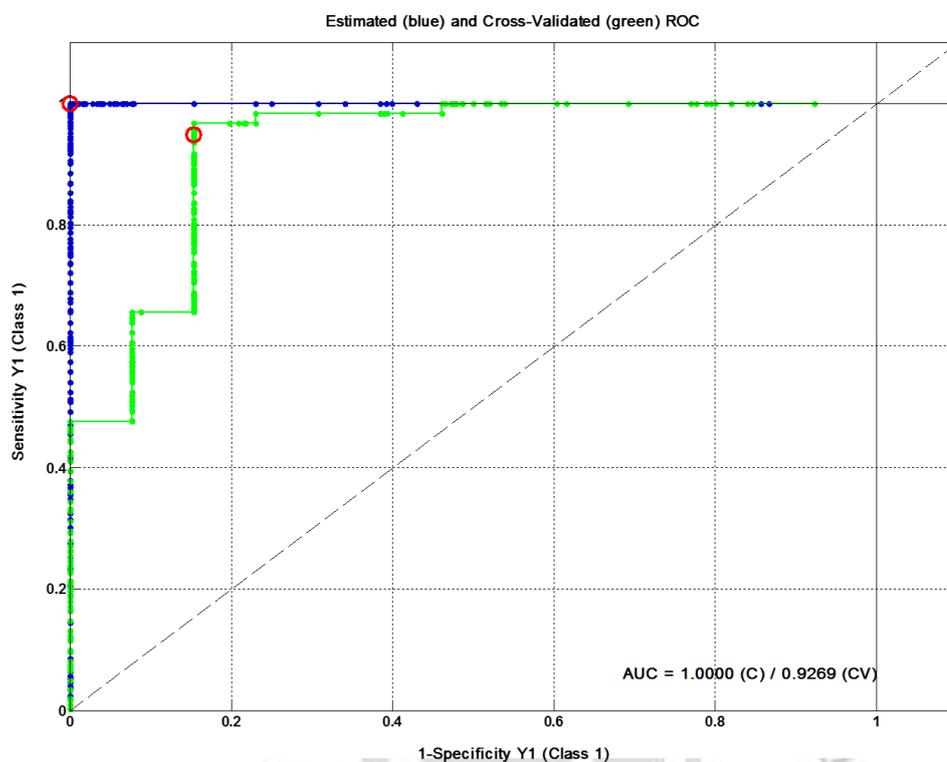


Figura 46. Curva ROC obtenida de la validación cruzada del modelo PLS-DA obtenido para discriminar entre las muestras negativas y positivas. La línea azul corresponde a los datos de entrenamiento y la línea verde, a la validación cruzada tipo Venetian Blinds.

Los resultados obtenidos muestran que la curva de validación cruzada (en color verde) es muy similar a la de entrenamiento (en color azul), y el valor de área bajo la curva (AUC) es superior al 93% lo que indica que el modelo predictivo es robusto y no hay un riesgo importante de sobreajuste. Los altos valores de los parámetros estadísticos $R^2Y=0.86$ y $Q^2=0.49$ confirman que existe una clara separación entre los dos grupos y la potencia del modelo predictivo. La medida R^2Y describe el porcentaje de variación explicada por el modelo; Q^2 muestra la habilidad predictiva del modelo. La diferencia entre esas medidas describe la bondad del modelo.

Tabla 6. Resultados de la validación cruzada.

Matriz Confusión (CV):

| Grupos | Verdaderos positivos | Falsos positivos | Falsos positivos | Falsos negativos |
|-----------------------|-----------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| No viables (-) | 0.98361 | 0.15385 | 0.84615 | 0.01639 |
| Viables (+) | 0.84615 | 0.01639 | 0.98361 | 0.15385 |

Matthew's Correlation Coefficient = 0.838

Tabla Confusión (CV):

| | Grupo | Actual |
|------------------------------|-----------------------|--------------------|
| | No viables (-) | Viables (+) |
| Predice no viable (-) | 60 | 2 |
| Predice viable (+) | 1 | 11 |

AUC = 0.9269 [0.8671 – 0.9867]

Por otro lado, el coeficiente de correlación de Matthews se usa como medida de la calidad de clasificaciones binarias observadas y predichas. Tiene en cuenta verdaderos y falsos positivos y es una medida equilibrada que puede usarse incluso si los tamaños de las clases son muy diferentes entre sí. Un coeficiente de +1 es la predicción perfecta y -1 indica un desacuerdo total entre lo observado y lo predicho.

En la Tabla 6 se muestra la tabla de contingencia obtenida para el modelo discriminativo. La lectura de los datos desde el lado de las muestras positivas indica que el modelo predice con un 85% de

acierto las muestras que son viables y sólo indicaría muestra positiva de forma errónea en un 2% de los casos. Por otro lado, desde el lado de los casos negativos, el modelo sería capaz de predecir con un 98% de acierto las muestras negativas, y en un 15% de los casos nos indicará que es una muestra negativa de forma errónea.

4.4. Empleo de embriones de ratón como modelo animal para la validación del biomarcador obtenido a partir del análisis mediante RMN del medio de cultivo embrionario.

En este punto del estudio, hemos determinado el perfil metabolómico del medio de cultivo embrionario humano. En base a la composición Metabolómica de este medio y a los datos de viabilidad embrionaria, hemos construido un modelo predictivo de viabilidad embrionaria. La curva ROC obtenida mediante la validación cruzada del modelo confirma la calidad y robustez del modelo obtenido. Procedemos a realizar una validación adicional de los resultados obtenidos. Para ello, decidimos elegir tres de los metabolitos más significativos, que caracterizan el perfil metabolómico del medio positivo, y comprobar su efecto sobre embriones de ratón.

4.4.1. Evolución de los embriones de ratón a lo largo del cultivo con los distintos metabolitos y concentraciones.

Los embriones de ratón fueron divididos en 6 grupos (tres metabolitos y dos concentraciones para cada uno) y un grupo control, cultivados durante 5 días. Todos los embriones de ratón empleados para el estudio mostraban tras la descongelación inicial los pronúcleos indicativos de haber sido fecundados en las 20 horas previas. Establecimos un criterio morfológico propio de evolución de los embriones basado en la supervivencia y la calidad de los mismos. Este criterio se basó en la presencia de progreso y desarrollo del embrión, en cuyo caso la puntuación que le fue asignada fue de 1 o si no progresaban dándole puntuación de 0. El grupo de embriones que progresó se evaluó nuevamente dándole una puntuación de 1, 2 y 3 según progresaron con calidad baja, calidad media o calidad alta tanto a las 24 horas como a las 96 horas de desarrollo. Los embriones fueron calificados en función de su calidad atendiendo al grado de expansión del blastocelo, su masa celular interna, células del trofoectodermo y presencia de focos degenerativos.

En la Tabla 7 se muestra la puntuación de la valoración morfológica de los embriones tras las primeras 24 horas. En la tabla se indica, para cada muestra, el número de células (CEL) y el número de núcleos visibles (NV) tras las primeras 24 horas de cultivo y la puntuación (P) obtenida.

Se puede apreciar como la totalidad de los embriones progresa a las 24 horas. En negrita se han marcado los embriones que tras 24 horas en cultivo destacan por su calidad.

Tabla 7. Valoración morfológica tras 24 horas de los embriones de ratón y sus puntuaciones tras la progresión.

| Ctrl | P | Glu 1mM | P | Glu 0,1mM | P | But 1mM | P | But 0,1mM | P | Arg 1mM | P | Arg 0,1mM | P |
|-----------------------|---|---------------|---|---------------|----------|---------------|---|---------------|---|---------------|----------|---------------|----------|
| 2CEL (2NV) | 1 | 2CEL (2NV) | 1 | 4CEL (4NV) | 3 | 2CEL (2NV) | 1 | 2CEL (2NV) | 1 | 2CEL (2NV) | 1 | 2CEL (2NV) | 1 |
| 2CEL (2NV) | 1 | 2CEL (2NV) | 1 | 2CEL (1NV) | 1 | 2CEL (2NV) | 1 | 2CEL (2NV) | 1 | 2CEL (2NV) | 1 | 4CEL (4NV) | 3 |
| 2CEL (0NV) | 1 | 2CEL (2NV) | 1 | 2CEL (1NV) | 1 | 2CEL (2NV) | 1 | 2CEL (2NV) | 1 | 4CEL (4NV) | 3 | 2CEL (2NV) | 1 |
| 2CEL (0NV) | 1 | 2CEL (2NV) | 1 | 2CEL (2NV) | 1 | 2CEL (2NV) | 1 | 2CEL (2NV) | 1 | 2CEL (2NV) | 1 | 3CEL (2NV) | 2 |
| 2CEL (2NV) | 1 | 2CEL (2NV) | 1 | 2CEL (1NV) | 1 | 2CEL (2NV) | 1 | 2CEL (2NV) | 1 | 2CEL (2NV) | 1 | 4CEL (4NV) | 3 |
| 3CEL (0NV) | 1 | 2CEL (2NV) | 1 | 2CEL (1NV) | 1 | 2CEL (2NV) | 1 | 2CEL (2NV) | 1 | 2CEL (2NV) | 1 | 4CEL (4NV) | 3 |
| | | 2CEL (2NV) | 1 | 2CEL (2NV) | 1 | | | 2CEL (2NV) | 1 | | | 2CEL (2NV) | 1 |
| | | 2CEL (2NV) | 1 | | | | | | | | | 2CEL (2NV) | 1 |

En la Tabla 8 podemos observar la valoración morfológica de los embriones de ratón obtenida tras 96 horas en cultivo. Los embriones que aparecen en **negrita** no progresan por estar bloqueados o en apoptosis. El resto de los embriones tienen diferentes calidades y grados de expansión.

Tabla 8. Valoración morfológica de los embriones de ratón tras 96 horas.

| Ctrl | GLU 1mM | GLU 0,1mM | BUT 1mM | BUT 0,1 mM | ARG 1mM | ARG 0,1mM |
|------------------|----------------------------------|------------------|----------------------------------|----------------------------|-----------------------------|--------------|
| EXPANDIDO | MORULA | ECLOSION | BLOQUEADO (FOCOS DEG) | BLASTOCISTO (FOCOS DEG) | APOPTOSIS | EXPANDIDO |
| EXPANDIDO | APOPTOSIS | EXPANDIDO | BLOQUEADO (FOCOS DEG) | EXPANDIDO | APOPTOSIS | ECLOSION |
| ECLOSION | CAVITADO (FOCOS DEG) | EXPANDIDO | BLOQUEADO (FOCOS DEG) | EXPANDIDO | CAVITADO | EXPANDIDO |
| COLAPSADO | APOPTOSIS | APOPTOSIS | BLOQUEADO (FOCOS DEG) | APOPTOSIS | EXPANDIENDO | ECLOSION |
| APOPTOSIS | APOPTOSIS | ECLOSION | COMPACTADO | APOPTOSIS | EXPANDIDO (MALA CALIDAD) | ECLOSION |
| COLAPSADO | BLOQUEADO (FOCOS DEG) | EXPANDIDO | APOPTOSIS | EXPANDIDO | EXPANDIDO (MALA CALIDAD) | ECLOSION |
| | APOPTOSIS | EXPANDIDO | BLOQUEADO (FOCOS DEG) | EXPANDIDO | | ECLOSION |
| | APOPTOSIS | | | | | ECLOSION |

GLU glutamato; BUT butirato; ARG arginina. Sombreados los casos donde los embriones no progresan.

En la Tabla 9 se resumen las puntuaciones obtenidas por los embriones a las 96 horas. Concretamente *P1* es la puntuación obtenida por el embrión en función de su progresión, que se califica con 0 y 1, y *P2* es la puntuación asignada en función de la calidad del embrión al final de su desarrollo con un rango entre 1 y 3 según evolucione con calidad baja, calidad media o calidad alta. Se incluyeron en el grupo de calidad baja todos aquellos embriones en mórula, cavitados, compactados o que formaron blastocisto pero con focos degenerativos. En el grupo de calidad media se incluyeron los embriones en estadio de blastocisto que se encontraban expandiéndose, expandidos o colapsados. En el grupo de calidad alta se incluyeron los embriones en estadio de blastocisto que se encontraban eclosionando.

Tabla 9. Puntuaciones obtenidas por los grupos de embriones tras 96 horas en cultivo.

| Crtl | | Glu | | Glu | | But | | But | | Arg | | Arg | |
|-------------|----|------------|----|------------|----|------------|----|------------|----|------------|----|------------|----|
| N=6 | | N=8 | | N=7 | | N=6 | | N=7 | | N=6 | | N=8 | |
| P1 | P2 | P1 | P2 | P1 | P2 | P1 | P2 | P1 | P2 | P1 | P2 | P1 | P2 |
| 1 | 2 | 1 | 1 | 1 | 3 | 0 | - | 1 | 1 | 0 | - | 1 | 2 |
| 1 | 2 | 0 | - | 1 | 2 | 0 | - | 1 | 2 | 0 | - | 1 | 3 |
| 1 | 3 | 1 | 1 | 1 | 2 | 0 | - | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 | 2 |
| 1 | 2 | 0 | - | 0 | - | 0 | - | 0 | - | 1 | 2 | 1 | 3 |
| 0 | - | 0 | - | 1 | 3 | 1 | 1 | 0 | - | 1 | 2 | 1 | 3 |
| 1 | 2 | 0 | - | 1 | 2 | 0 | - | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 3 |
| | | 0 | - | 1 | 2 | | | 1 | 2 | | | 1 | 3 |
| | | 0 | - | | | | | | | | | 1 | 3 |

CRTL grupo control; *P* puntuaciones de los embriones.

La puntuación obtenida por el embrión en función de si progresa o no se muestra en la columna P1 y se califica con 0 y 1, y P2 es la puntuación asignada en función de la calidad del embrión al final de su desarrollo con un rango entre 1 y 3 según evolucione con calidad baja, calidad media o calidad alta. Se incluyeron en el grupo de calidad baja todos aquellos embriones en mórula, cavitados, compactados o que formaron blastocisto pero con focos degenerativos. Por último, en el grupo de calidad alta se incluyeron los embriones en estadio de blastocisto que se encontraban eclosionando. Los resultados muestran que el grupo suplementado con glutamato y butirato 1mm se ven gravemente afectados en su desarrollo por la suplementación.

A modo de resumen, la Tabla 10 muestra las puntuaciones en porcentajes a las 96 horas de cultivo en los distintos grupos de embriones. A continuación presentaremos los resultados obtenidos de cada grupo (glutamato, butirato, arginina) individualmente y su comparación con el grupo control a las 24 y 96 horas de cultivo.

Tabla 10. Puntuaciones de los grupos de embriones en porcentajes a las 96 horas de cultivo.

| % | Crtl | Glu | Glu | But | But | Arg | Arg |
|-----------|------|-----|-------|------|-------|------|-----|
| P1 | | | | | | | |
| 0 | 16,6 | 75 | 14,2 | 83,3 | 28,5 | 33,3 | 0 |
| 1 | 83,3 | 25 | 84,7 | 16,6 | 71,4 | 66,6 | 100 |
| P2 | | | | | | | |
| 1 | - | 25 | - | 16,6 | 14,2 | 16,6 | - |
| 2 | 66 | - | 57,14 | - | 57,14 | 50 | 25 |
| 3 | 16,6 | - | 28,5 | - | - | - | 75 |

CRTL grupo control; *P* puntuaciones de los embriones.

Para valorar la significación estadística de las diferencias de nuestros datos de valoración morfológica, hemos realizamos un test de Fisher. Los resultados muestran que no hay significación estadística en las diferencias de los distintos grupos frente al grupo control pues en ningún caso $p \leq 0.05$. Hay que resaltar los valores de p obtenidos para el grupo arginina 0,1mM tanto para la valoración a las 24 como a las 96 horas, que sin ser estadísticamente significativos, son los más próximos a la significatividad.

Tabla 11. Resultados del test de Fisher tras comparar los distintos grupos con el grupo control valoraciones realizadas a 24 y 96 horas.

| <i>test de Fisher</i> | <i>P vs CTRL</i> | <i>P vs CTRL</i> |
|-----------------------|------------------|------------------|
| <i>CTRL</i> | | |
| <i>Glu 1mM</i> | 0,56 | 0,56 |
| <i>Glu 0,1mM</i> | 1 | 1,00 |
| <i>But 1mM</i> | 1 | 0,63 |
| <i>But 0,1mM</i> | 0,63 | 0,63 |
| <i>Arg 1mM</i> | 1 | 1,00 |
| <i>Arg 0,1mM</i> | 0,3 | 0,10 |

CTRL grupo control; Glu glutamato; But butirato; Arg arginina.

4.4.1.1. Grupo control.

El grupo control constituido por 7 embriones de ratón se cultivó en medio G1 (el mismo medio en el que se han cultivado los otros grupos) sin suplementar de los que se eliminó un embrión por degenerar tras la descongelación. Tras el cultivo durante 24 horas todos los embriones restantes se dividieron pasando de una célula en pronúcleos a dos células obteniendo una puntuación de 1 por progresar y dentro del grupo tan solo uno de los seis alcanzó una puntuación de 2 indicativa de calidad media. Este momento equivaldría a día 2 de cultivo en embriones humanos.

Tras 96 horas en cultivo cinco de los seis embriones progresaron obteniendo una puntuación de 1 y alcanzaron el estadio de blastocisto. Uno de los embriones entro en apoptosis obteniendo una puntuación de 0. Los embriones que progresaron se evaluaron de nuevo y tan solo uno de los cinco alcanzó la puntuación de 3 correspondiente a un blastocisto eclosionando y cuatro obtuvieron una puntuación de 2 por ser blastocistos expandiéndose.

La Figura 47 se compone de fotografías tomadas mediante microscopio invertido durante el desarrollo completo a las 24 horas, 48 horas, 56 horas, 72 horas y 96 horas. Puede apreciarse la división a las 24 horas a dos células y al final del desarrollo a las 96 horas la formación del blastocisto con distintas calidades.

| CONTROL | | 20h + 24h | 20+48h | 20+56h | 20+72h | 20+96h |
|---------|----|---|---|--|---|---|
| | 55 |  |  |  |  |  |
| | 56 |  |  |  |  |  |
| | 57 |  |  |  |  |  |
| | 58 |  |  |  |  |  |
| | 59 |  |  |  |  |  |
| | 60 | Degenerado | | | | |
| | 61 |  |  |  |  |  |

Figura 47. Imágenes de microscopio invertido del desarrollo de embriones de ratón del grupo control cultivados en medio sin suplementar.

4.4.1.2. Glutamato 1 mM

Este grupo estaba formado por 8 embriones de ratón en medio de cultivo G1 suplementado hasta alcanzar una concentración de 1 mM de glutamato. Dicho grupo se dividió de forma semejante al grupo control mostrando todos los embriones división a dos células tras 24 horas en cultivo y obteniendo una puntuación de 1 por progresar en su desarrollo. La evaluación de los embriones que progresaron, en este caso la totalidad, obtuvo una puntuación de 1. Si comparamos este grupo con el grupo control a las 24 horas no encontramos diferencias. Sin embargo, al final del desarrollo tras el cultivo durante 96 horas en el medio tan solo dos de los embriones del grupo progresaron, lo que supone un 25% y seis entraron en apoptosis. Los dos embriones que progresaron fueron puntuados como embriones de calidad baja con puntuación de 1 por no alcanzar estadio de blastocisto. Si comparamos este grupo con el grupo control a las 96 horas los resultados fueron peores para el glutamato 1mM ya que el 75% de los embriones acabó en apoptosis. El resultado de la prueba para los embriones en día 2 de cultivo cuando se comparó la valoración morfológica de los embriones del grupo control frente al grupo de embriones cultivados en medio suplementado con glutamato 1mM fue de $p=0,56$. Al comparar este resultado con el nivel de significación de p indica que no existe significación estadística. La misma prueba fue realizada para evaluar la valoración de la calidad de los embriones en día 5 de cultivo obteniendo un valor de $p=0,56$, siendo muy superior al nivel de significación de 0,05, por lo tanto no significativo.

En la Figura 48 pueden apreciarse imágenes tomadas mediante microscopio invertido del desarrollo embrionario del grupo durante todo el cultivo.

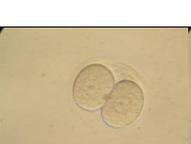
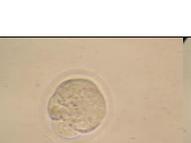
| Glutamato 1mM | | 20h + 24h | 20+48h | 20+56h | 20+72h | 20+96h |
|---------------|---|---|--|---|---|--------|
| 1 |  |  |  |  |  | |
| 2 |  |  |  |  |  | |
| 3 |  |  |  |  |  | |
| 4 |  |  |  |  |  | |
| 5 |  |  |  |  |  | |
| 6 |  |  |  |  |  | |
| 7 |  |  |  |  |  | |
| 8 |  |  |  |  |  | |

Figura 48. Imágenes de microscopio invertido del desarrollo de embriones de ratón del grupo de medio de cultivo suplementado con glutamato 1mM.

4.4.1.3. Glutamato 0.1 mM.

El grupo está integrado por 8 embriones cultivados en medio de cultivo G1 suplementado hasta alcanzar la concentración de 0,1mM de glutamato. De los 8 embriones se descartó uno por degenerar tras la descongelación. Tras las primeras 24 horas en cultivo los siete embriones progresaron obteniendo una puntuación de 1. Cuando se evaluó su calidad encontramos que seis de los embriones se dividieron a dos células obteniendo una puntuación de 1 y uno se encontraba ya en cuatro células obteniendo una puntuación de 3. Comparando los resultados con el grupo control a las 24 horas encontramos una leve mejoría en los resultados. Al final del desarrollo a las 96 horas de cultivo uno de los embriones no progresó y entró en apoptosis obteniendo una puntuación de 0 y el resto progresaron hasta estadio de blastocisto con una puntuación de 1 lo que constituye un 85,7%. Fueron evaluados en función de su calidad siendo puntuados con un 2 por ser de calidad media cuatro de los seis embriones y dos con un 3 de puntuación por tener calidad alta. Los blastocistos de calidad media se encontraban expandiéndose y los de calidad alta eclosionando al final de su desarrollo. Si comparamos este grupo con el grupo control a las 96 horas nos encontramos con una mejoría de resultados.

En la Figura 49 pueden verse las fotografías tomadas mediante microscopio invertido para todo el desarrollo de los embriones de ratón y las distintas calidades.

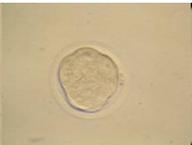
| Glu 0,1mM | | 20h + 24h | 20+48h | 20+56h | 20+72h | 20+96h |
|-----------|---|---|---|--|--------|---|
| 10 |  |  |  |  | |  |
| 11 |  |  |  |  | |  |
| 12 |  |  |  |  | |  |
| 13 |  |  |  |  | |  |
| 14 |  |  |  |  | |  |
| 15 |  |  |  |  | |  |
| 16 |  |  |  |  | |  |

Figura 49. Imágenes de microscopio invertido del desarrollo de embriones de ratón en el grupo de medio de cultivo glutamato 0,1mM.

4.4.1.4. Butirato 1 mM.

El grupo butirato 1mM estaba formado por 8 embriones de ratón cultivados en medio G1 suplementado hasta alcanzar una concentración de butirato 1mM. Se eliminaron dos embriones del grupo por degenerar tras la descongelación. Tras 24 horas en cultivo los seis progresaron y se dividieron a dos células obteniendo una puntuación de 1 por lo que no mostraron diferencias con el grupo control.

A las 96 horas de cultivo tan solo uno de los embriones progresó en su desarrollo aunque lo hizo con una puntuación de 1 al alcanzar el estadio de mórula. Esto supone un 16,6% del total. Los restantes seis embriones se bloquearon en estadio de células y no progresaron.

En la Figura 50 se observa el desarrollo de los embriones de ratón ralentizado con respecto a otros grupos al no progresar hasta blastocisto.

| Butirato 1mM | | 20h + 24h | 20+48h | 20+56h | 20+72h | 20+96h |
|--------------|---|---|---|--|---|--------|
| 19 |  |  |  |  |  | |
| 20 |  |  |  |  |  | |
| 21 |  |  |  |  |  | |
| 22 |  |  |  |  |  | |
| 23 |  |  |  |  |  | |
| 24 | Degenerado | | | | | |
| 25 |  |  |  |  |  | |
| 26 |  |  |  |  |  | |

Figura 50. Imágenes de microscopio invertido del desarrollo de embriones de ratón en el grupo de medio de cultivo butirato 1mM.

4.4.1.5. Butirato 0.1 mM.

El grupo butirato 0,1mM estaba formado por 8 embriones de ratón cultivados en medio de cultivo G1 suplementado hasta alcanzar la concentración de 0,1mM de butirato. Se descartó un embrión del grupo por degenerar tras su descongelación. Tras 24 horas en cultivo todos los embriones se dividieron a dos células por lo que los resultados fueron equiparables a los del grupo control obteniendo una puntuación de 1.

A las 96 horas en cultivo dos de los siete embriones no progresaron y entraron en apoptosis. Los cinco embriones restantes que progresaron se desarrollaron hasta estadio de blastocisto. Uno de ellos obtuvo una puntuación de 1, indicativa de calidad baja, por tener focos degenerativos y los cuatro restantes con calidad media por estar expandiéndose.

Como puede apreciarse en la Figura 51 de imágenes tomadas mediante microscopio invertido la calidad de los embriones al final del desarrollo fue inferior a la del grupo control.

| Butirato 0,1mM | | 20h + 24h | 20+48h | 20+56h | 20+72h | 20+96h |
|----------------|----|------------|--------|--------|--------|--------|
| | 28 | | | | | |
| | 29 | | | | | |
| | 30 | | | | | |
| | 31 | Degenerado | | | | |
| | 32 | | | | | |
| | 33 | | | | | |
| | 34 | | | | | |
| | 35 | | | | | |

Figura 51. Imágenes de microscopio invertido del desarrollo de embriones de ratón en el grupo de medio de cultivo butirato 0,1mM.

4.4.1.6. Arginina 1 mM.

El grupo arginina 1 mM se formó con 8 embriones de ratón cultivados en medio de cultivo suplementado hasta alcanzar la concentración de 1mM de arginina. Hubo que eliminar del grupo 2 embriones por degenerar tras su descongelación. Tras 24 horas en cultivo todos los embriones progresaron y se dividieron. Cinco de los embriones se encontraban en dos células por lo que fueron puntuados con un 1 y uno se encontraba en 4 células por lo que se puntuó con un 3. Si los comparamos con los embriones del grupo control a las 24 horas encontramos una leve mejoría en los resultados por parte del grupo arginina 1mM.

A las 96 horas en cultivo dos de los seis embriones que habían progresado entraron en apoptosis, de los cuatro restantes un embrión progresó con una puntuación de 1 por no encontrarse en estadio de blastocisto y tres embriones con una puntuación de 2 por encontrarse en estadio de blastocisto expandido.

En la Figura 52 se muestran las imágenes tomadas durante el desarrollo de los embriones de ratón donde puede apreciarse la calidad de los mismos.

| Arginina 1mM | | 20h + 24h | 20+48h | 20+56h | 20+72h | 20+96h |
|--------------|----|------------|--------|--------|--------|--------|
| | 37 | Degenerado | | | | |
| | 38 | | | | | |
| | 39 | | | | | |
| | 40 | | | | | |
| | 41 | | | | | |
| | 42 | Degenerado | | | | |
| | 43 | | | | | |
| | 44 | | | | | |

Figura 52. Imágenes de microscopio invertido del desarrollo de embriones de ratón en el grupo de medio de cultivo arginina 1mM.

4.4.1.7. Arginina 0.1 mM.

El grupo arginina 0,1 mM estaba formado por 8 embriones de ratón cultivados en medio de cultivo G1 suplementado hasta alcanzar la concentración de arginina 0,1mM. Tras 24 horas en cultivo se observó que la totalidad de los embriones progresó con una puntuación de 1. Concretamente cinco embriones se dividieron a 2 células obteniendo una puntuación de 1 y tres embriones se encontraba en 4 células obteniendo una puntuación de 3. Si comparamos los resultados con el grupo control tras 24 horas encontramos una mejoría importante en los resultados para el grupo de la arginina 0,1 mM.

Tras 96 horas en cultivo la totalidad de los 8 embriones progresó y formó blastocistos. Dos de los embriones se encontraban en estadio de blastocisto con una puntuación de 2 por ser embriones en blastocisto expandiéndose y seis de los ocho embriones con una puntuación de 3 por ser embriones en estadio de blastocisto eclosionando. La comparación de este grupo con los demás grupos de metabolitos muestra que tanto en día 2 como en día 5 existe una tendencia en cuanto a una mejor calidad de los embriones cultivados en medio suplementado con arginina 0,1mm.

En la Figura 53 podemos observar en las fotografías tomadas mediante microscopio invertido la elevada calidad de los embriones al final de su desarrollo en el grupo arginina 0,1 mM.

| Arg 0,1mM | 20h + 24h | 20+48h | 20+56h | 20+72h | 20+96h |
|-----------|---|---|---|---|---|
| 46 |  |  |  |  |  |
| 47 |  |  |  |  |  |
| 48 |  |  |  |  |  |
| 49 |  |  |  |  |  |
| 50 |  |  |  |  |  |
| 51 |  |  |  |  |  |
| 52 |  |  |  |  |  |
| 53 |  |  |  |  |  |

Figura 53. Imágenes de desarrollo de embriones de ratón en el grupo de medio de cultivo arginina 0,1mM.

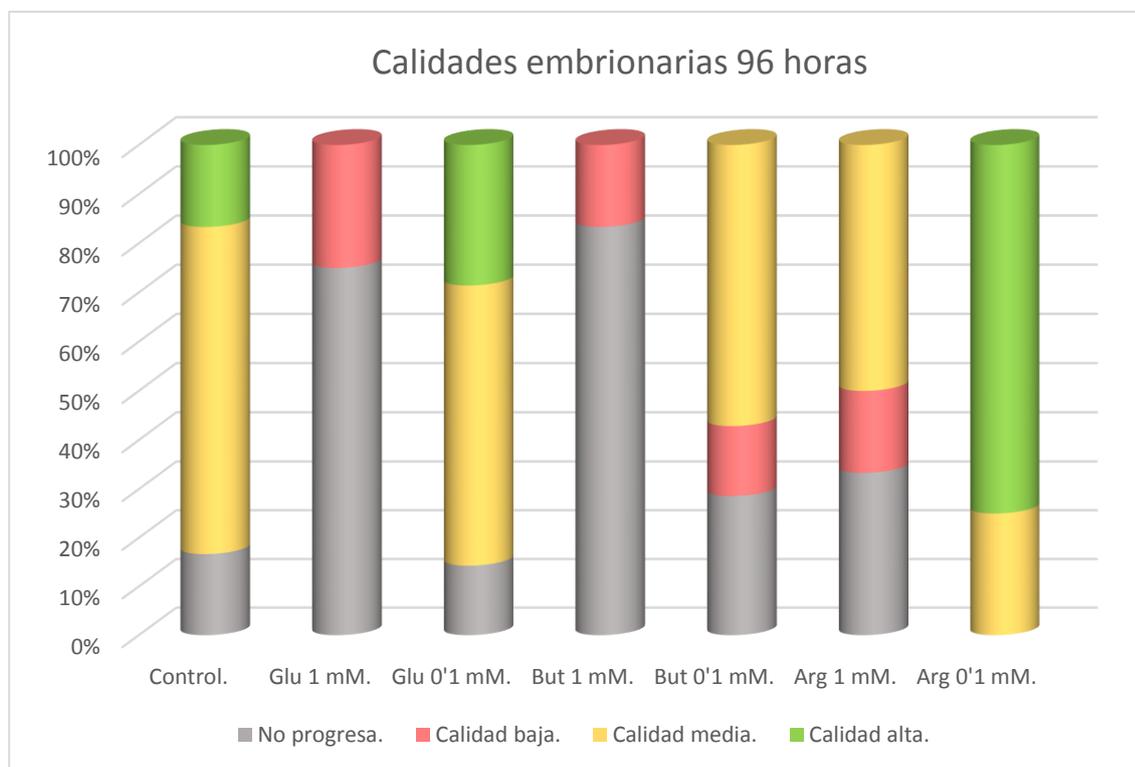


Figura 54. Calidad de los embriones de ratón en los distintos grupos tras 96 horas de cultivo.

A modo de resumen, en la Figura 54 mostramos los resultados en porcentajes de la clasificación de los distintos grupos de embriones de ratón en función de su calidad embrionaria y su comparación con el grupo control tras 96 horas en cultivo. Como puede apreciarse los grupos de arginina 0,1 mM y glutamato 0,1 mM destacan notablemente sobre el resto de grupos en calidad y son superiores al grupo control. Por otro lado también es importante destacar el efecto negativo producido por el medio sobre los embriones en los grupos de glutamato 1mM y butirato 1 mM. Los grupos arginina 1mM y butirato 0,1 mM presentan resultados similares entre sí y son inferiores en calidad respecto al grupo control pero superiores a los grupos glutamato 1 mM y butirato 1 mM. Aunque las diferencias entre los grupos son evidentes y notables a nivel morfológico, la prueba de Fisher no muestra diferencias estadísticamente significativas entre los grupos y el control.

4.4.2. Análisis mediante RMN del medio de cultivo suplementado de embriones de ratón.

En base a los resultados obtenidos en el apartado anterior sobre la evolución de los embriones de ratón a lo largo del cultivo y su valoración morfológica decidimos realizar un análisis mediante RMN de los medios de cultivo donde se habían apreciado diferencias positivas importantes frente a los controles. De este modo, centramos el esfuerzo de la caracterización metabólica de los medios de cultivo principalmente para los medios suplementados hasta una concentración de metabolito 0,1mM. A diferencia del análisis realizado anteriormente para el medio de cultivo con embriones humanos, en este caso no hemos aplicado técnicas exploratorias de datos. El análisis de los espectros de RMN ha consistido en la identificación y asignación del mayor número posible de resonancias presentes en el espectro para su posterior cuantificación. Se han identificado 24 regiones que corresponden inequívocamente a 24 compuestos diferentes y estas regiones se han cuantificado para todas las muestras.

Butirato 0,1 mM.

Los resultados obtenidos tras el análisis mediante RMN de la composición metabólica del medio de cultivo de los embriones de ratón suplementado con butirato 0,1mM se muestran en la Tabla 12. La primera columna muestra la concentración relativa promedio del metabolito al día 2 de cultivo normalizado a la concentración promedio del mismo metabolito presente en las muestras control. Al cociente le restamos la unidad para que la disminución de la concentración en la muestra frente al control tenga signo negativo. De tal forma que los valores positivos indican una ganancia de dicho metabolito en el grupo suplementado con butirato 0,1 mM con respecto al grupo control y los negativos (resaltados en negrita) indican una disminución de dicho metabolito respecto al control. Los datos de la última columna son el resultado de la diferencia entre los promedios de día 5 y día 2 normalizados a sus respectivos controles.

Tabla 12. Concentraciones relativas de los metabolitos identificados tras el análisis del medio de cultivo de los embriones suplementado con butirato 0,1mM.

| | Día 2 | Día 5 | Día 5 - Día 2 |
|---------------------------|-------------------|-------------------|---|
| | (But0,1mM/Crtl)-1 | (But0,1mM/Crtl)-1 | (But0,1mM/Crtl) - (But0,1mM/Crtl) |
| <i>hydroxyisovalerato</i> | 0,0424 | -0,3165 | -0,3589 |
| <i>Butirato</i> | 0,0878 | -0,7536 | -0,8414 |
| <i>Valina</i> | 0,0182 | -0,3062 | -0,3244 |
| <i>Propilenglicol</i> | -0,0189 | -0,5413 | -0,5224 |
| <i>Isopropanol</i> | -0,0260 | -0,5430 | -0,5170 |
| <i>Treonina</i> | -0,2252 | -0,8845 | -0,6593 |
| <i>Lactato</i> | 0,0054 | 0,0465 | 0,0411 |
| <i>Alanina</i> | 0,1699 | 0,1076 | -0,0623 |
| <i>Arginina</i> | -0,1102 | -0,2464 | -0,1361 |
| <i>Timidina</i> | -0,0562 | 0,0892 | 0,1454 |
| <i>Prolina</i> | -0,1100 | 0,0258 | 0,1359 |
| <i>Piruvato</i> | 0,0234 | 0,1830 | 0,1595 |
| <i>Glutamina</i> | 0,0190 | -0,0333 | -0,0523 |
| <i>Citrato</i> | 0,0423 | 0,2518 | 0,2095 |
| <i>Aspartato</i> | 0,0828 | 0,2817 | 0,1990 |
| <i>Tirosina</i> | 0,0002 | 0,1649 | 0,1647 |

| | Día 2 | Día 5 | Día 5 - Día 2 |
|---------------------|-------------------|-------------------|---|
| | (But0,1mM/Crtl)-1 | (But0,1mM/Crtl)-1 | (But0,1mM/Crtl) - (But0,1mM/Crtl) |
| <i>Glicina</i> | 0,2259 | 0,1854 | -0,0405 |
| <i>Isoleucina</i> | -0,1128 | -0,2515 | -0,1387 |
| <i>Glucosa</i> | 0,0550 | 0,0174 | -0,0376 |
| <i>Glutamato</i> | 0,0488 | 0,0673 | 0,0185 |
| <i>Indolacetato</i> | 0,0363 | 0,2181 | 0,1818 |
| <i>IndolLactato</i> | -0,0421 | 0,1307 | 0,1728 |
| <i>Antranilato</i> | 0,0315 | 0,2056 | 0,1741 |

Ctrl : grupo control.

Miguel Hernández

Las principales diferencias se observan en los niveles de treonina. En la región positiva destacan sobre el resto del grupo dos metabolitos, alanina y glicina. La diferencia de concentración relativa de la timidina frente al control presenta significatividad estadística ($p= 0,03$).

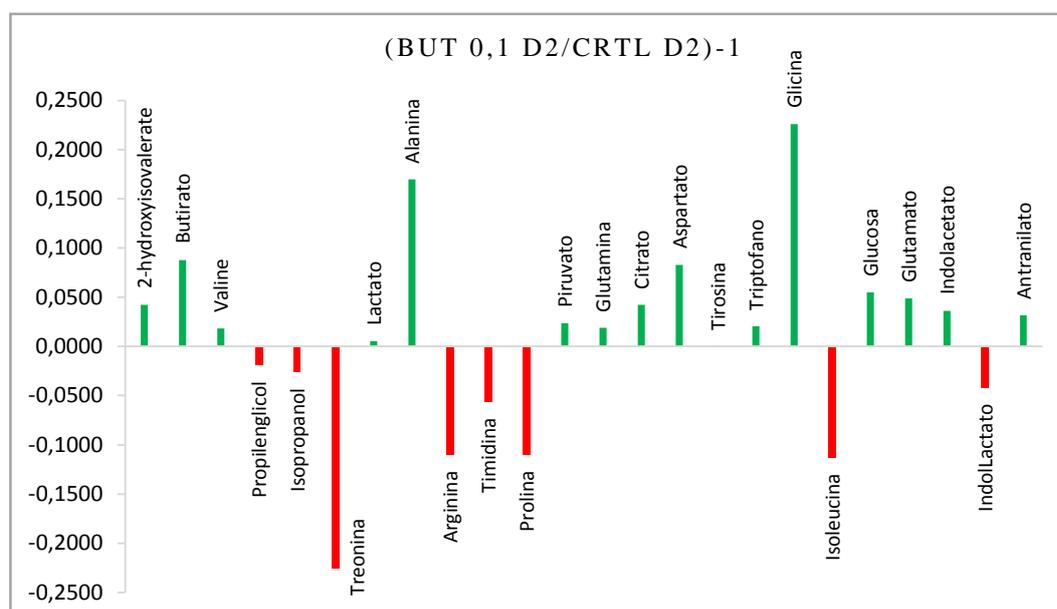


Figura 55. Concentraciones relativas de metabolitos donde queda representado por los valores negativos (color rojo) la disminución y ganancia representada por los valores positivos (color verde) de los embriones cultivados hasta día 2 en medio suplementado con butirato 0,1 Mm frente al control.

De la misma manera en la Figura 55 se representan el valor promedio de las concentraciones de metabolitos halladas en el medio de cultivo suplementado con butirato 0,1mM donde permanecieron los embriones hasta el final de su desarrollo en día 5 de cultivo.

Podemos apreciar en la Figura 56 como hay gran cantidad de metabolitos destacados en la región negativa principalmente dos, butirato y treonina. En la región positiva destaca levemente el aspartato sobre el resto. La diferencia de concentración relativa del aspartato y el antranilato frente al control presenta significatividad estadística ($p = 0,005$ y $p = 0,042$) respectivamente.

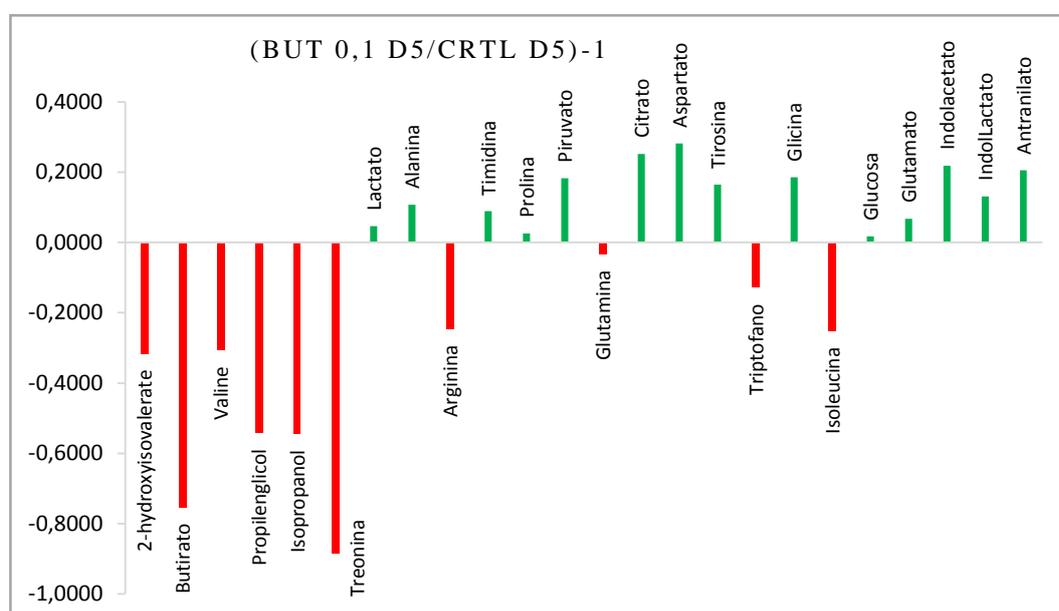


Figura 56. Concentraciones relativas de metabolitos donde queda representado por los valores negativos (color rojo) la disminución y ganancia representada por los valores positivos (color verde) de los embriones cultivados en día 5 en medio suplementado con butirato 0,1 mM frente al control.

A continuación se muestra la diferencia de composición entre el día 5 y el día 2 normalizado a sus respectivos controles (Figura 57).

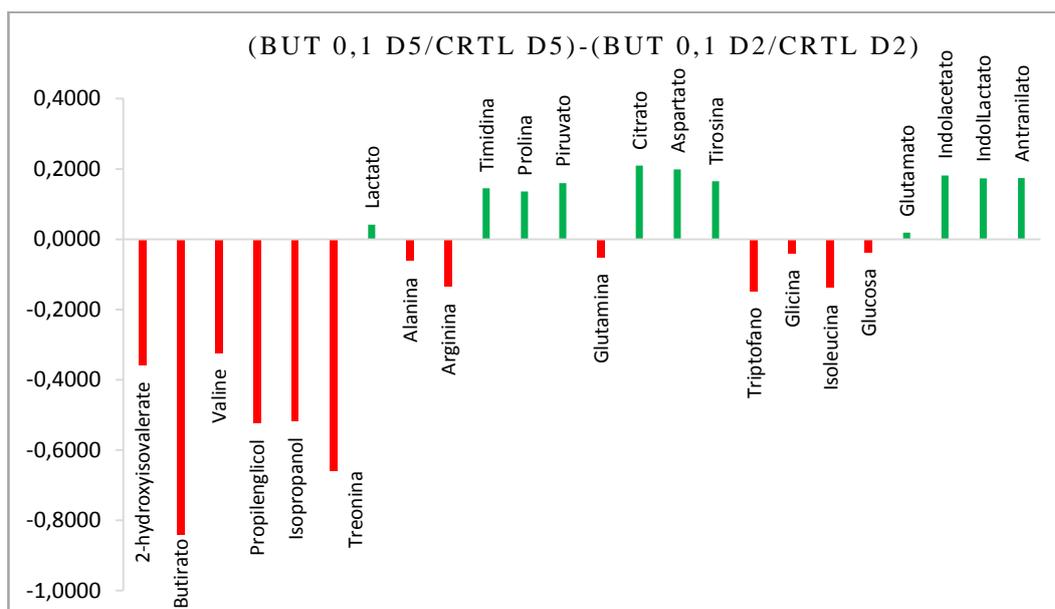


Figura 57. Representación gráfica de la diferencia de composición metabólica promedio entre el medio suplementado con butirato 0,1mM de día 5 y el de día 2. Las concentraciones de cada medio están normalizadas a la concentración del mismo metabolito en su correspondiente control.

Según los resultados mostrados en la Figura 57, la tendencia indica la existencia de una mayor proporción de metabolitos cuyas concentraciones se sitúan en la región negativa indicativa de una disminución del metabolito. Los metabolitos que destacan son el butirato y la treonina. La diferencia de concentración relativa de glucosa entre el medio de cultivo de día 5 frente a día 2 presenta un valor de p próximo a la significación estadística ($p = 0.057$).

Glutamato 0,1mM

Los resultados obtenidos tras el análisis mediante RMN de la composición metabólica del medio de cultivo de los embriones de ratón suplementado con butirato 0,1mM se muestran en la Tabla 13. La primera columna muestra la concentración relativa promedio del metabolito al día 2 de cultivo normalizado a la concentración promedio del mismo metabolito presente en las muestras control. Al cociente le restamos la unidad para que la disminución de la concentración en la muestra frente al control tenga signo negativo. De tal forma que los valores positivos indican una ganancia de dicho metabolito en el grupo suplementado con glutamato 0,1 mM con respecto al grupo control y los negativos (resaltados en negrita) indican una disminución de dicho metabolito respecto al control. Los datos de la última columna son el resultado de la diferencia entre los promedios de día 5 y día 2 normalizados a sus respectivos controles.

Tabla 13. Concentraciones relativas de los metabolitos identificados tras el análisis del medio de cultivo de los embriones suplementado con glutamato 0,1mM.

| | Día 2 | Día 5 | Día 5 –Día 2 |
|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---|
| | (Glut0,1mM/Ctrl)-1 | (Glut0,1mM/Ctrl)-1 | (Glut0,1mM/Ctrl) - (Glut0,1mM/Ctrl) |
| <i>Hydroxyisovalerato</i> | -0,0051 | 0,0587 | 0,06375 |
| <i>Butirato</i> | -0,0724 | 0,0603 | 0,13267 |
| <i>Valina</i> | -0,0025 | 0,0371 | 0,03960 |

| | | | |
|-----------------------|----------------|----------------|-----------------|
| <i>Propilenglicol</i> | -0,0603 | 0,0585 | 0,11877 |
| <i>Isopropanol</i> | -0,0576 | -0,0010 | 0,05659 |
| <i>Treonina</i> | -0,2431 | 0,0110 | 0,25403 |
| <i>Lactato</i> | -0,0333 | 0,0457 | 0,07896 |
| <i>Alanina</i> | -0,0568 | -0,0478 | 0,00903 |
| <i>Arginina</i> | -0,1135 | 0,0147 | 0,12823 |
| <i>Timidina</i> | -0,0842 | 0,0083 | 0,09242 |
| <i>Prolina</i> | -0,1188 | 0,0028 | 0,12162 |
| <i>Piruvato</i> | 0,0318 | 0,0929 | 0,06105 |
| <i>Glutamina</i> | 0,0513 | -0,1476 | -0,19890 |
| <i>Citrato</i> | 0,0074 | 0,1204 | 0,11307 |
| <i>Aspartato</i> | 0,1739 | 0,0818 | -0,09204 |
| <i>Tirosina</i> | 0,0662 | -0,0478 | -0,11400 |
| <i>Triptófano</i> | 0,0528 | -0,2242 | -0,27703 |
| <i>Glicina</i> | 0,0158 | -0,0482 | -0,06397 |
| <i>Isoleucina</i> | -0,0741 | -0,4148 | -0,34066 |
| <i>Glucosa</i> | 0,0361 | -0,0588 | -0,09497 |
| <i>Glutamato</i> | 0,2307 | 0,0925 | -0,13817 |
| <i>Indolacetato</i> | -0,0151 | 0,0923 | 0,10736 |
| <i>IndolLactato</i> | -0,0810 | -0,0496 | 0,03132 |
| <i>Antranilato</i> | -0,0177 | 0,0365 | 0,05422 |

Crtl grupo control.

De forma gráfica se representa el perfil metabólico del medio en el día 2 (Figura 58) y en el día 5 (Figura 59).

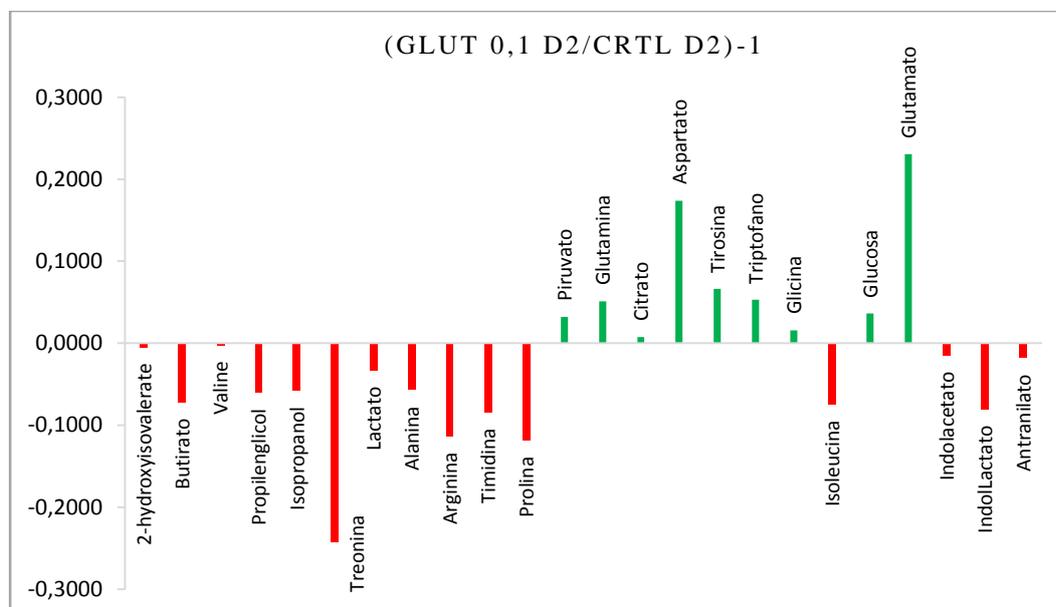


Figura 58. Concentraciones relativas de metabolitos donde queda representado por los valores negativos (color rojo) la disminución y ganancia representada por los valores positivos (color verde) de los embriones cultivados hasta día 2 en medio suplementado con glutamato 0,1 mM frente al control suplementado con idéntico metabolito.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 58 donde destaca un metabolito en la región negativa que corresponde a la treonina. En la región positiva indicativa de ganancia destacan dos metabolitos sobre el resto del grupo que corresponden al aspartato y al glutamato. La diferencia de concentración relativa de la timidina frente al control presenta significatividad estadística ($p = 0,006$) y el glutamato ($p = 0,001$).

En la Figura 59 se representa el valor promedio de las concentraciones de metabolitos que se encontraron tras el análisis del medio suplementado en glutamato 0,1mM donde fueron cultivados los embriones hasta día 5 de cultivo.

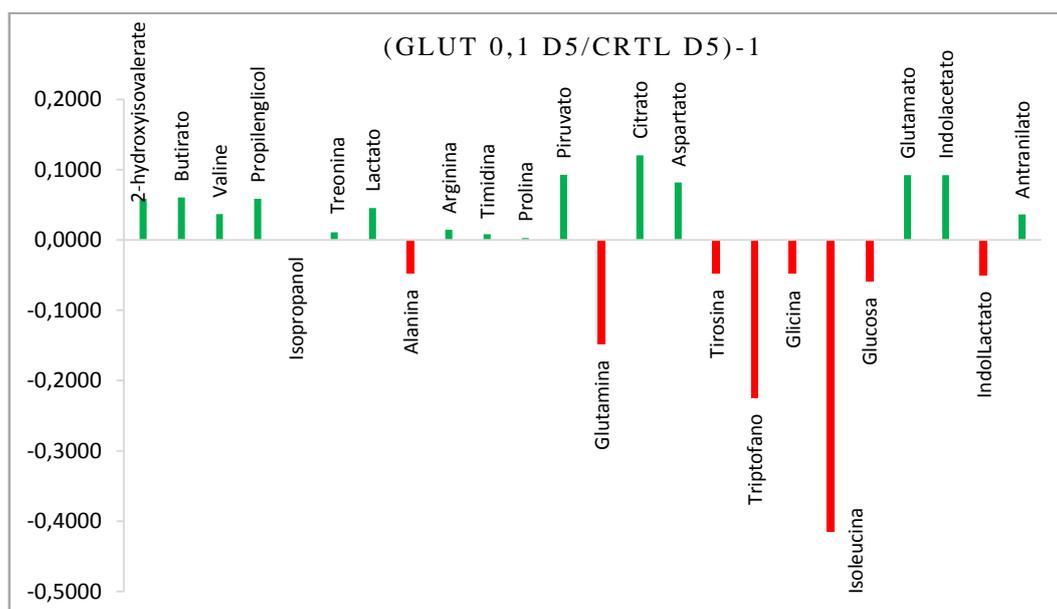


Figura 59. Concentraciones relativas de metabolitos donde queda representado por los valores negativos (color rojo) la disminución y ganancia representada por los valores positivos (color verde) de los embriones cultivados hasta día 5 en medio suplementado con glutamato 0,1 mM frente al control suplementado con idéntico metabolito.

Los resultados indican que existen tres metabolitos en el grupo de muestras de la región negativa indicativa de disminución que destacan sobre el resto del grupo y son la glutamina, el triptófano y la isoleucina. En la región de las muestras positivas no destaca ninguno de los metabolitos sobre el resto. Los resultados indican que ninguno de los valores tiene significación estadística.

A continuación se muestra la diferencia de composición entre el día 5 y el día 2 normalizado a sus respectivos controles (Figura 60).

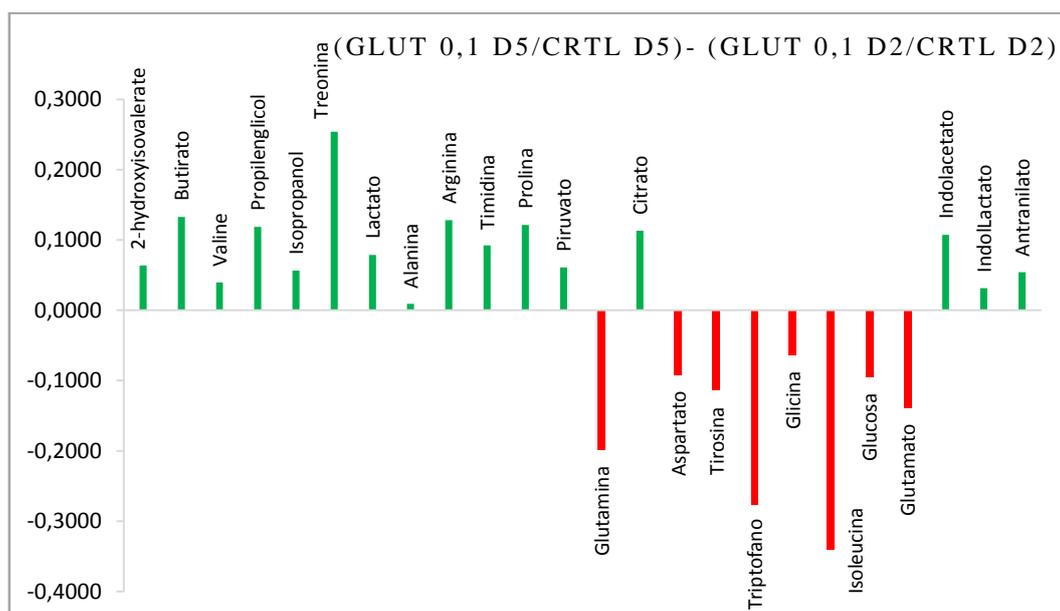


Figura 60. Representación gráfica de la diferencia de composición metabólica promedio entre el medio suplementado con glutamato 0,1mM de día 5 y el de día 2. Las concentraciones de cada medio están normalizadas a la concentración del mismo metabolito en su correspondiente control.

Los resultados mostrados en la Figura 60 tras evaluar la diferencia entre las concentraciones halladas en el medio de cultivo suplementado en glutamato 0,1mM en día 5 y día 2 muestran que tres metabolitos de la región negativa destacan sobre el resto. Concretamente la glutamina, el triptófano y la isoleucina. En la región positiva destaca sobre el resto del grupo un metabolito, la treonina. La diferencia de concentración relativa de lactato entre el medio de cultivo de día 5 frente a día 2 presenta un valor de p próximo a la significación estadística ($p = 0,044$), al igual que la tirosina ($p = 0,012$) y la isoleucina ($p = 0,035$).

Arginina 0,1mM

Los resultados obtenidos tras el análisis mediante RMN de la composición metabólica del medio de cultivo de los embriones de ratón suplementado con arginina 0,1mM se muestran en la Tabla 14. La primera columna muestra la concentración relativa promedio del metabolito al día 2 de cultivo normalizado a la concentración promedio del mismo metabolito presente en las muestras control. Al cociente le restamos la unidad para que la disminución de la concentración en la muestra frente al control tenga signo negativo. De tal forma que los valores positivos indican una ganancia de dicho metabolito en el grupo suplementado con arginina 0,1 mM con respecto al grupo control y los negativos (resaltados en negrita) indican una disminución de dicho metabolito respecto al control. Los datos de la última columna son el resultado de la diferencia entre los promedios de día 5 y día 2 normalizados a sus respectivos controles.

Tabla 14. Concentraciones relativas de los metabolitos identificados tras el análisis del medio de cultivo de los embriones suplementado con arginina 0,1mM.

| | Día 2 | Día 5 | Día 5 – Día 2 |
|---------------------------|-------------------|-------------------|---|
| | (Arg0,1mM/Ctrl)-1 | (Arg0,1mM/Ctrl)-1 | (Arg0,1mM/Ctrl) - (Arg0,1mM/Ctrl) |
| <i>Hydroxyisovalerato</i> | 0,0115 | -0,0141 | -0,0257 |
| <i>Butirato</i> | -0,0610 | -0,0589 | 0,0021 |
| <i>Valina</i> | 0,0293 | -0,0350 | -0,0644 |
| <i>Propilenglicol</i> | -0,0296 | -0,0463 | -0,0167 |
| <i>Isopropanol</i> | -0,0090 | -0,1016 | -0,0926 |
| <i>Treonina</i> | -0,2345 | -0,1099 | 0,1246 |
| <i>Lactato</i> | -0,0268 | 0,0104 | 0,0373 |

| | Día 2 | Día 5 | Día 5 – Día 2 |
|---------------------|-------------------|-------------------|---|
| | (Arg0,1mM/Ctrl)-1 | (Arg0,1mM/Ctrl)-1 | (Arg0,1mM/Ctrl) - (Arg0,1mM/Ctrl) |
| <i>Alanina</i> | 0,0509 | 0,1374 | 0,0865 |
| <i>Arginina</i> | -0,0257 | 0,0487 | 0,0745 |
| <i>Timidina</i> | 0,0003 | 0,0742 | 0,0739 |
| <i>Prolina</i> | -0,1269 | 0,0075 | 0,1345 |
| <i>Piruvato</i> | -0,0027 | 0,0209 | 0,0237 |
| <i>Glutamina</i> | 0,0209 | -0,1272 | -0,1482 |
| <i>Citrato</i> | 0,0121 | 0,0893 | 0,0772 |
| <i>Aspartato</i> | 0,1392 | 0,1086 | -0,0306 |
| <i>Tirosina</i> | 0,0419 | -0,0208 | -0,0628 |
| <i>Triptófano</i> | -0,0379 | -0,2133 | -0,1754 |
| <i>Glicina</i> | 0,0688 | -0,0329 | -0,1017 |
| <i>Isoleucina</i> | -0,1672 | -0,4056 | -0,2384 |
| <i>Glucosa</i> | 0,0301 | -0,1216 | -0,1519 |
| <i>Glutamato</i> | 0,2133 | 0,1458 | -0,0675 |
| <i>Indolacetato</i> | -0,0532 | 0,0654 | 0,1188 |
| <i>IndolLactato</i> | -0,0866 | -0,0742 | 0,0124 |
| <i>Antranilato</i> | -0,0338 | 0,0164 | 0,0503 |

Ctrl grupo control.

De forma gráfica se representa el perfil metabólico del medio en el día 2 (Figura 61) y en el día 5 (Figura 78).

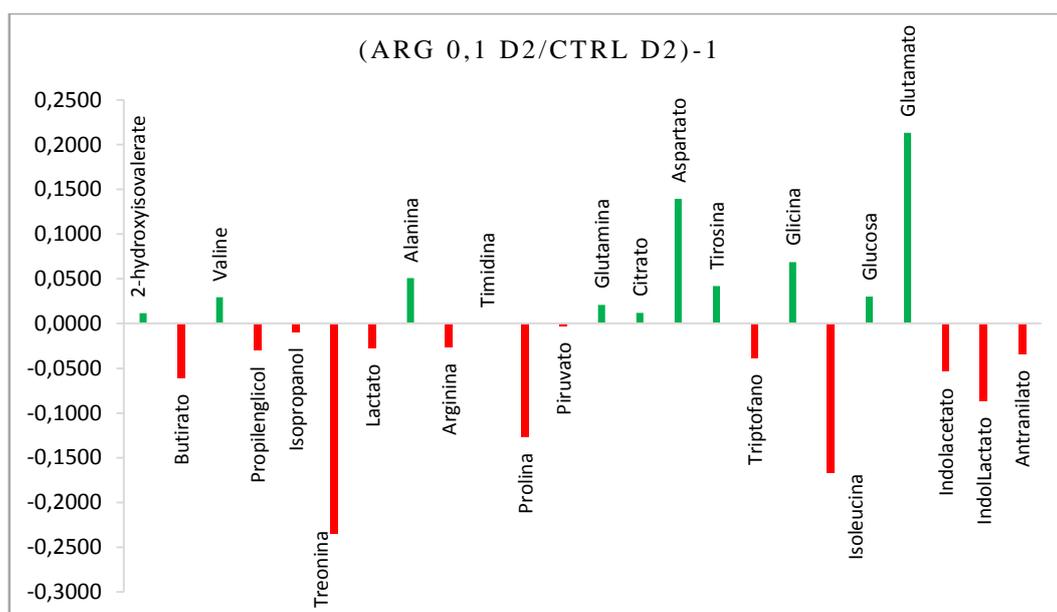


Figura 61. Concentraciones relativas de metabolitos donde queda representado por los valores negativos (rojo) la disminución y ganancia representada por los valores positivos (verde) de los embriones cultivados hasta día 2 en medio suplementado con arginina 0,1 mM frente al control suplementado con idéntico metabolito.

Los resultados que se muestran en la Figura 61 indican que existen tres metabolitos que destacan sobre el resto del grupo de metabolitos en la región negativa. Son la treonina, la prolina y la isoleucina. En la región positiva destacan dos metabolitos sobre el resto, son el aspartato y el glutamato. La diferencia de concentración relativa de glutamato frente al control presenta significación estadística ($p = 0,0012$). Hay otros metabolitos que presentan igualmente diferencias importantes que están estadísticamente próximas a la significación como son la treonina, la prolina y el indolLactato.

En la Figura 62 se representa el valor promedio de las concentraciones de metabolitos que se encontraron tras el análisis del medio suplementado en arginina 0,1mM donde fueron cultivados los embriones hasta día 5 de cultivo.

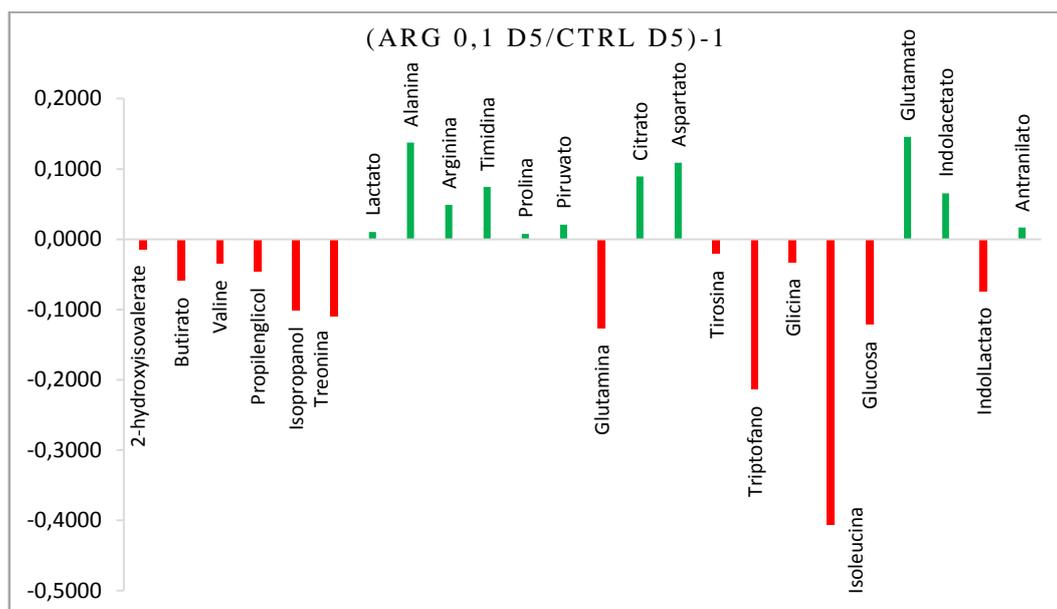


Figura 62. Concentraciones relativas de metabolitos donde queda representado por los valores negativos (color rojo) la disminución y ganancia representada por los valores positivos (color verde) de los embriones cultivados hasta día 5 en medio suplementado con arginina 0,1 mM frente al control suplementado con idéntico metabolito.

Los resultados tras el análisis de las muestras suplementadas con arginina 0,1mM de día 5 revelaron que existen dos metabolitos cuyas concentraciones destacan sobre el resto en la región negativa correspondiente a la disminución. Los metabolitos son el triptófano y la isoleucina. En la región de las positivas destacan dos metabolitos sobre el resto del grupo que son la alanina y el glutamato.

En la Figura 63 se representan las distintas concentraciones de metabolitos en valores promedio contenidas en el medio suplementado en arginina 0,1mM en día 5 frente al grupo control en día 5 menos la concentración de los metabolitos en el medio suplementado con arginina 0,1mM en día 2 frente al grupo control en día 2 donde fueron cultivados los embriones durante 96 horas.

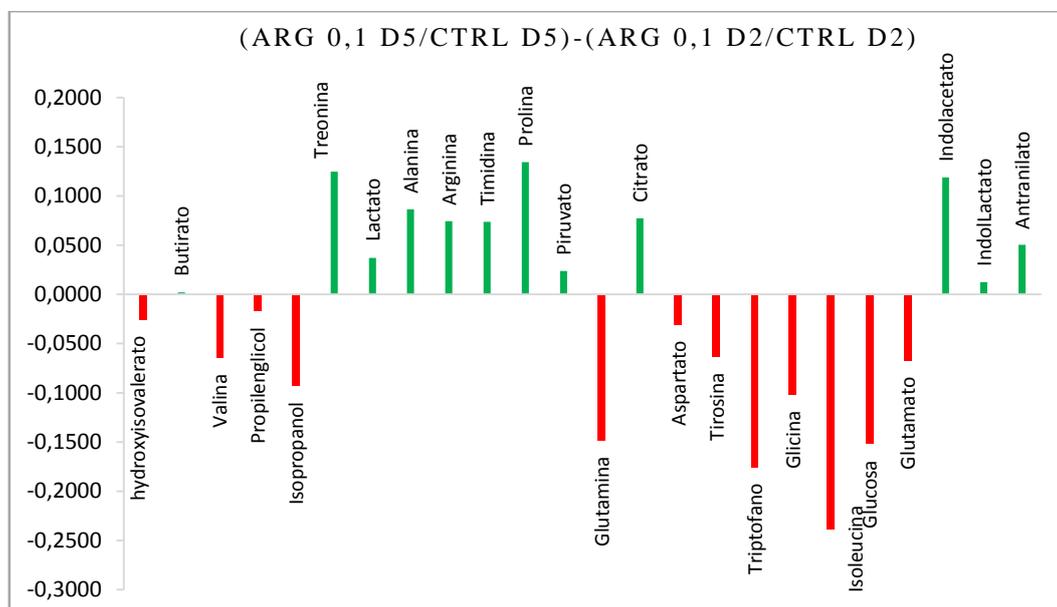


Figura 63. Representación gráfica de la diferencia de composición metabólica promedio entre el medio suplementado con arginina 0,1mm de día 5 y el de día 2. Las concentraciones de cada medio están normalizadas a la concentración del mismo metabolito en su correspondiente control.

Los resultados tras evaluar la diferencia entre las concentraciones halladas en el medio de cultivo suplementado en arginina 0,1mM en día 5 y día 2 muestran que existen multitud de metabolitos de la región negativa destacan, principalmente cuatro. Son la glutamina, el triptófano, la isoleucina y la glucosa. Para la región positiva encontramos que tres de los metabolitos destacan sobre el resto del grupo. Son la treonina, la prolina y el indolacetato (Figura 63).

Los resultados globales de los análisis realizados a los distintos medios de cultivo y concentraciones se resumen en la siguiente tabla (Tabla 15). Donde la flecha roja metabolitos que caen en la región negativa y la flecha verde metabolitos que caen en la región positiva. Puede apreciarse como la treonina es el metabolito que más destaca.

Tabla 15. Resumen de metabolitos cuyo valor promedio destaca sobre el grupo.

| | Butirato 0,1mM | Glutamato 0,1mM | Arginina 0,1mM |
|--------------|---|---|--|
| <i>D2</i> |  treonina |  treonina |  treonina isoleucina lactato piruvato |
| |  glicina alanina |  aspartato glutamato |  aspartato glutamato glucosa |
| <i>D5</i> |  butirato treonina |  glutamina triptófano isoleucina |  triptófano isoleucina valina glutamina glucosa |
| | |  aspartato |  alanina glutamato piruvato lactato |
| <i>D5-D2</i> |  butirato treonina |  glutamina triptófano isoleucina |  glutamina triptófano isoleucina glucosa |
| | |  treonina |  treonina prolina indolacetato |

D2 día 2. D5 día 5

DISCUSIÓN.





5. Discusión.

El objetivo principal del trabajo presentado en esta tesis ha sido contribuir a la mejora de las técnicas de selección embrionaria que existen en la actualidad, aplicadas al campo de la reproducción asistida. Para ello, se ha analizado mediante RMN el medio de cultivo de embriones humanos pertenecientes a 40 pacientes que se estaban sometiendo a una TRA en la Unidad de Reproducción del CHGUV. Se han medido un total de 78 muestras divididas en dos grandes grupos: embriones que implantan y que no implantan. Mediante la determinación del perfil metabólico característico del embrión con mayor posibilidad de implantación, hemos construido un modelo predictivo de implantación que presenta unos excelentes resultados con una tasa de acierto próxima al 85%. El perfil metabólico diferencial se sustenta principalmente en las diferencias estadísticamente significativas de las concentraciones de hidroxisovalerato, alanina, butirato, arginina y glutamato. Se tuvieron en cuenta además las características demográficas y clínicas de las pacientes y sus embriones. Se realizó para ello un estudio estadístico comparativo entre las diferentes variables y los dos grandes grupos no obteniendo diferencias estadísticamente significativas. Esto nos hace pensar que los resultados de nuestro estudio no se están viendo afectados por diferencias intergrupo.

Para validar el modelo empleamos embriones de ratón cuyos medios de cultivo fueron suplementados con arginina, butirato y glutamato en concentraciones de 1 mM y 0,1 mM. Los resultados obtenidos indicaron que los embriones cultivados en medio de cultivo suplementado con arginina 0,1mM se desarrollaron con una calidad morfológica superior al resto de los grupos, incluyendo el grupo control donde se cultivaron embriones con medio de cultivo sin suplementar.

El análisis mediante RMN de los medios de cultivo suplementados en butirato, glutamato y arginina 0,1 mM donde se cultivaron los embriones de ratón mostró un aumento en la concentración de glucosa y un descenso en la concentración de piruvato y lactato en día 2 de cultivo. En día 5 fue justo a la inversa, aumentó la concentración de piruvato y lactato, y disminuyó la concentración de glucosa.

En nuestro modelo encontramos además otros metabolitos que varían sus niveles de forma apreciable y que nos indican que los patrones de utilización de los metabolitos son distintos entre embriones que se desarrollan hasta estadio de blastocisto frente a los que no lo consiguen.

Encontramos que perfiles específicos de los metabolitos glutamina, valina, aspartato y glutamato están relacionados con la formación del blastocisto.

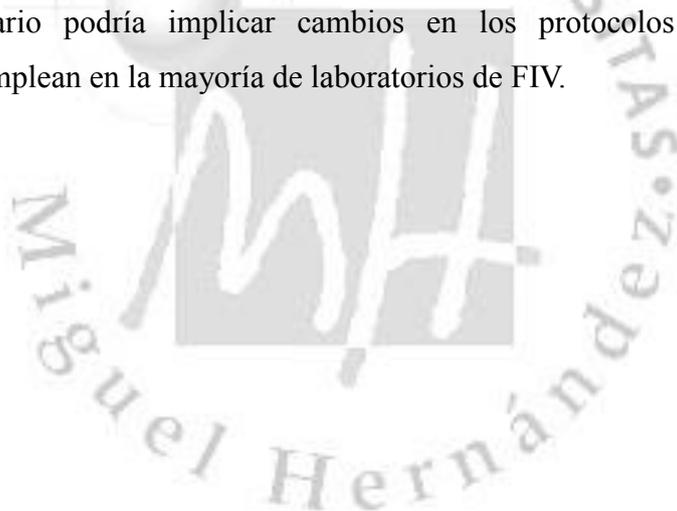
La transferencia selectiva de un único embrión (SET) es una práctica muy recomendada en los tratamientos de FIV que ha aumentado notablemente su implantación en los últimos años. El objetivo principal de la SET es evitar la gestación múltiple pero sin afectar a la tasa de éxito en el embarazo. Aunque poco más del 2% de las gestaciones son gemelares, estas son responsables de hasta un 14% de la mortalidad perinatal, tasa entre 5 y 10 veces mayor que en los embarazos únicos. De ahí la importancia de la transferencia embrionaria única. Las complicaciones médicas y económicas asociadas a las gestaciones múltiples tales como la prematuridad, la mortalidad perinatal, la discordancia ponderal, la preeclampsia o las malformaciones congénitas entre otras, han obligado a muchos países a limitar legalmente el número máximo de embriones por transferencia. En algunos países como Suecia y Bélgica, su utilización es ya obligatoria

Disminuir las gestaciones múltiples sin que ello afecte a las tasas de éxito es una asignatura pendiente para la reproducción asistida. Realizar la SET requiere una selección fiable de los embriones con mayor potencial de implantación y mejorar en lo posible los métodos actuales de selección. La evaluación morfológica de los embriones, es la técnica más comúnmente empleada aunque es subjetiva, limitada y carece de valor predictivo. En los últimos años se han desarrollado nuevas aproximaciones para mejorar los resultados en la evaluación del embrión. Entre las nuevas técnicas de selección se encuentra la selección genética de embriones mediante el estudio de todos los cromosomas tras la amplificación del genoma embrionario. Esta tecnología, ha permitido mejorar las tasas de embarazo, pero para obtener las células del embrión debe realizarse un procedimiento invasivo mediante biopsia (Lee *et al.*, 2015).

Se ha investigado con especial interés el consumo de oxígeno, reacciones redox, el consumo energético a través de Na⁺, K⁺ y ATPasas o el recambio de aminoácidos (Houghton *et al.*, 2004; Thompson *et al.*, 1996; Gardner *et al.*, 1996) y se están definiendo perfiles génicos, proteicos y metabolómicos para intentar detectar cuál es el embrión viable (Katz-Jaffe *et al.*, 2006; Brison *et al.*, 2007). Los biomarcadores metabólicos en el medio de cultivo suponen sin duda, en nuestra opinión, una de las estrategias más prometedoras. La búsqueda de metabolitos específicos evaluados de forma no invasiva además de correlacionarse con la viabilidad embrionaria proporciona información de la fisiología del embrión (Gardner y Wale, 2013). El estudio del metaboloma del medio aporta

información directa de aspectos claves para el desarrollo del embrión como el flujo de nutrientes y su disponibilidad, el efecto metabólico de una perturbación o del estrés del proceso, en resumen, una imagen puntual del metabolismo del sistema. Esto nos permitirá conocer los metabolitos concretos cuya adición al medio podría suponer una mejora del rendimiento del cultivo y por lo tanto una mayor calidad embrionaria.

La determinación del perfil metabolómico asociado al medio de cultivo del embrión con mayor probabilidad de implantación va a presentar importantes aplicaciones en la FIV. Primero, resultará una herramienta importante, que junto a las técnicas de selección embrionaria utilizadas actualmente, permitirá una mejora para el proceso de selección del mejor embrión a transferir. Segundo, conocer la composición química del medio y su evolución a lo largo del proceso de crecimiento embrionario permitirá la mejora del medio de cultivo con la formulación que mejor se adapte a las necesidades nutricionales del embrión y que pueda por lo tanto mejorar su calidad. Por último, conocer mejor el metabolismo embrionario podría implicar cambios en los protocolos de cultivo existentes actualmente y que se emplean en la mayoría de laboratorios de FIV.



Obtención del perfil metabólico del medio de cultivo de embriones humanos.

Nuestros resultados indican que el perfil metabólico del medio de cultivo de los embriones que implantan presenta importantes diferencias frente al de los medios de los embriones que no implantan. Las diferencias más significativas están directamente relacionadas con los niveles de ciertos metabolitos como el hidroxisovalerato, alanina, butirato, arginina y glutamato. El poder predictivo de nuestro modelo creado a partir de los resultados obtenidos ha sido evaluado mediante validación cruzada. La curva ROC obtenida nos dio una probabilidad de acierto del 85%, lo que supone un poder de predicción muy alto. Esta predicción es mucho mayor a la alcanzada con las técnicas actuales de selección embrionaria. Por lo que su empleo en la clínica diaria tendría un gran impacto en cuanto a la mejora de los métodos de selección.

Los perfiles metabólicos obtenidos mediante espectroscopía de RMN nos proporcionan mucha información tanto estructural como cuantitativa que permiten la identificación de metabolitos relacionados directamente con la viabilidad embrionaria. La RMN es una técnica que permite analizar directamente las muestras sin necesidad de recurrir a una extracción, dilución o separación cromatográfica de las mismas. Tan solo se necesita una pequeña preparación que lleva pocos minutos por muestra. Es una técnica no destructiva, que precisa un volumen de muestra reducido (20µl), altamente reproducible, de bajo coste y rápida. El análisis estándar de una muestra puede durar entre 5 y 15 minutos. Aunque actualmente el acceso a esta técnica para la mayoría de unidades de reproducción no sea fácil en un futuro sí podría serlo. Esto supondría que aplicando la técnica de forma prospectiva podría permitir conocer los resultados antes de la transferencia de los embriones, en cuestión de horas, y por tanto ayudar a seleccionar el embrión con mayor potencial.

Sin embargo, recientemente Kirkegaard y colaboradores han publicado un trabajo donde afirman la ausencia de valor predictivo de gestación en el análisis mediante RMN del medio de cultivo embrionario (Kirkegaard *et al.*, 2014). Hay que señalar importantes diferencias de diseño frente a nuestro trabajo que en nuestra opinión son el origen de la discrepancia en los resultados finales. Su estudio está realizado en embriones en día 3 y día 5 de desarrollo, y además, la incubación se realizó de forma distinta a la llevada a cabo en nuestro estudio. Los embriones fueron cultivados en un

incubador convencional hasta evaluar la correcta fecundación, aproximadamente 18 horas postfecundación y posteriormente fueron transferidos a un incubador tri-gas con sistema *time lapse*. Un incubador tri-gas trabaja en un ambiente de hipoxia (5% O₂) mientras que un incubador convencional lo hace a la concentración ambiental (21% O₂). Un meta-análisis realizado por Bontekoe en 2012 sobre la comparación entre el cultivo embrionario a bajas presiones de O₂ frente a concentraciones atmosféricas del mismo concluye que el cultivo a bajas presiones mejora las tasa de éxito de la FIV dando lugar al nacimiento de más niños sanos (Bontekoe *et al.*, 2012). Además los embriones sufrieron la realización de una biopsia embrionaria antes de ser transferidos para su estudio genético y esto podría afectar a la viabilidad, a la eclosión y a la implantación. Por otro lado, la transferencia de los embriones fue realizada en día 6 de cultivo y se ha comprobado que existe asociación con bajas tasas de implantación (Dessolle *et al.*, 2011).

A continuación discutiremos con más detalle cada uno de los metabolitos hallados y con mayor contribución a la construcción del modelo predictivo. El glutamato presenta unos niveles más elevados en aquellos embriones que implantan. Una posible explicación a este hecho sería que el glutamato está implicado en la eliminación del amonio del medio de cultivo. El amonio se forma en el medio de cultivo por rotura espontánea de aminoácidos y por desaminación de aminoácidos por las células del embrión. El mecanismo que existe tras el efecto deletéreo del amonio se cree que es la alteración del pH intracelular (Gardner y Lane, 2003. A pH fisiológico (7,4) la concentración de amonio aumenta linealmente durante el cultivo embrionario si el medio va enriquecido en aminoácidos y se incuban a 37°C (Gardner *et al.*, 2003) que es lo habitual. El amonio en el medio de cultivo tiene un efecto perjudicial sobre la fisiología de los embriones. En embriones de mamíferos las alteraciones del pH intracelular alteran la distribución de las mitocondrias (Squirell *et al.*, 2001). También se cree que podría afectar a la capacidad del embrión de producir ATP. Se ha visto que el amonio reduce la formación de blastómeras en el blastocisto, disminuye el desarrollo de la masa celular interna (Zander *et al.*, 2006), aumenta la apoptosis y afecta a la regulación del pH en el medio (Sinawat, 2001; Gardner *et al.*, 1993). Por ello es esencial que el cultivo embrionario esté formulado de forma adecuada para que se minimice la producción de amonio. Por otro lado la síntesis de glutatión (GSH) se produce a partir de glutamato y cisteína. El GSH es el mayor

antioxidante endógeno producido por las células, participando directamente en la neutralización de radicales libres y compuestos de oxígeno reactivo, lo que ayudaría a proteger a los embriones.

Otro de los aminoácidos con un importante peso en el modelo predictivo es la arginina. Nuestros resultados indican que su concentración se encuentra elevada en el medio de cultivo de los embriones que implantan. Nutricionalmente es un aminoácido esencial para los mamíferos gestantes (Wu *et al.*, 2009). Además de ser pieza fundamental en la síntesis de proteínas, es precursor de la síntesis de muchas moléculas como el óxido nítrico (NO), la ornitina, poliaminas y creatina. La ruta metabólica clásica del catabolismo de la arginina se inicia para producir ornitina, que a su vez se convierte en poliaminas, claves en la regulación de la expresión génica, síntesis proteica y angiogénesis (Wu *et al.*, 2013). El NO se produce a través de una reacción enzimática de la arginina con la enzima óxido nítrico sintasa. Battaglia y colaboradores fueron los primeros en demostrar la secreción de NO por los embriones humanos. Ellos observaron que las concentraciones de NO eran significativamente superiores en embriones transferidos que daban embarazo (Battaglia *et al.*, 2003). Una inhibición en la producción de NO podría causar un bloqueo en el desarrollo embrionario. La producción de NO es necesaria para el desarrollo de embriones de ratón y el suplemento con arginina supone un aporte exógeno que puede ser usado por el embrión para producirlo (Manser *et al.*, 2004).

De igual manera, encontramos un incremento de los niveles de butirato e hidroxisovalerato de manera significativa en el medio de cultivo embrionario de los embriones que implantan. Dichos metabolitos son ácidos grasos saturados de cadena corta. Aunque se conoce poco sobre el papel que juegan los ácidos grasos en el metabolismo de los embriones humanos, en algunos estudios realizados en embriones de ratón se ha visto que utilizan la betaoxidación como fuente de energía (Dunning *et al.*, 2010), capaz de obtener hasta 106 moléculas de ATP de la oxidación (Sturney *et al.*, 2009) y que los embriones humanos utilizan de forma activa los ácidos grasos de distinta forma dependiendo del estadio de desarrollo en que se encuentren. La tendencia general indica una preferencia temprana por la absorción de ácidos grasos saturados (Haggarty *et al.*, 2006). Una inhibición en la betaoxidación durante el cultivo embrionario afecta negativamente al desarrollo del blastocisto en ratón (Ferguson y Leese, 2006; Dunning *et al.*, 2010). La regulación de la betaoxidación podría aumentar la disponibilidad de carbohidratos como la glucosa para ser utilizados para la síntesis tanto de ácidos nucleicos como de ácido hialurónico y también en la señalización celular (Sutton-McDowall *et al.*, 2012).

Finalmente, la alanina fue otro de los metabolitos hallado incrementado significativamente en el medio de los casos positivos y en el que se sustenta el modelo de predicción. En base a la literatura disponible, se proponen tres posibles modos de acción de este aminoácido entre los cuales se incluyen la regulación del metabolismo energético, osmolitos y tampones internos (Gardner *et al.*, 1999). De igual manera, es conocida la participación de la alanina en rutas metabólicas importantes para el mantenimiento de la competencia del embrión y se considera un osmolito orgánico que protege contra el daño ocasionado por cambios en la osmolaridad, que son causados por la acumulación de NaCl durante el cultivo (Kerri *et al.*, 1997). Nuestros resultados concuerdan con lo ya publicado donde se comprueba que los embriones producen alanina durante su desarrollo (Houghton *et al.*, 2002).

Seli y colaboradores en 2008 fueron los primeros que realizaron un estudio en el que analizaban la composición el medio de cultivo mediante RMN y en el que concluyeron que el perfil metabólico del medio de cultivo embrionario se correlaciona con el embarazo. Esto sugería que los embriones humanos cultivados *in vitro*, con un alto potencial de implantación, alteran su ambiente de forma distinta a los embriones que no dan embarazo. Estos mismos hallaron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de glutamato en los embriones viables que dieron lugar a embarazo (Seli *et al.*, 2008). Otro estudio similar llevado a cabo por Pudakalakatti cinco años después, también encontró correlación entre el perfil metabólico del medio de cultivo analizado mediante RMN y la implantación embrionaria (Pudakalakatti *et al.*, 2013). Este estudio únicamente proporcionaba datos de ciertos metabolitos como alanina, piruvato y lactato. Por lo tanto nuestros resultados concuerdan con los del grupo de Seli y de Pudakalakatti en cuanto a que existen diferencias estadísticamente significativas en el perfil metabólico de los embriones que implantan respecto de los que no, y con el grupo de Seli en que el glutamato fue el metabolito con más significación.

Suplementación del medio de cultivo embrionario de ratones.

La identificación en el medio de cultivo embrionario de los metabolitos relacionados con la implantación sugiere que la realización de modificaciones en la formulación de los medios de cultivo disponibles en la actualidad podría suponer una mejora de la calidad embrionaria. Para comprobarlo hemos recurrido a un modelo animal, concretamente embriones de ratón, en el que suplementamos el medio con los metabolitos identificados con mayor contribución al modelo.

En general, en los estudios de infertilidad, es difícil distinguir los efectos producidos por el medio de cultivo embrionario *per se* de otros factores relacionados con el genotipo o el historial clínico de las pacientes de FIV. Esas fuentes de variabilidad se minimizan sólo en modelos animales (Schwarzer *et al.*, 2012). Los efectos de la subfertilidad y la heterogeneidad genética se pueden reducir al mínimo en modelo de ratón comparados con las pacientes de FIV.

En la segunda parte de nuestro estudio hemos cultivado embriones de ratón en un medio suplementado hasta el final de su desarrollo de la misma forma que se haría en un bioensayo de tipo MEA de una célula. Este ensayo requiere que el medio de cultivo empleado para FIV permita el crecimiento de al menos un 80% de blastocistos. Este test es más sensible que el test MEA en dos células y que el ensayo de motilidad con espermatozoides humano (HSMA), los típicos realizados por los fabricantes de medio de cultivo para testar sus productos (Wolff *et al.*, 2013).

En función del metabolito y la concentración con que hemos suplementado el medio de cultivo hemos obtenido importantes diferencias en la calidad embrionaria. Los mejores resultados se obtuvieron para los medios suplementados con **glutamato y arginina 0,1mM**, y especialmente en este último se evidencia una mejora notable en el progreso y formación de blastocisto en estadios más avanzados y en la valoración morfológica final del embrión.

Los embriones que mostraron una cinética más rápida en las primeras divisiones (valorados en día 2) formaron los blastocistos de mejor calidad (en día 5). Nuestros resultados están en concordancia con un estudio recientemente publicado llevado a cabo con embriones de ratón en el que se evaluaba

su morfofocinética. En este trabajo se concluye que los embriones que antes realizan la primera división forman blastocistos con mayor número de células en la masa celular interna, por lo que son de mejor calidad (Lee *et al.*, 2015).

Los embriones cultivados en medios suplementados con **glutamato y butirato 1 mM** tras 96 horas en cultivo mostraron una mala calidad embrionaria tanto en día 2 como en día 5 y por tanto, los peores valores de valoración morfológica. En el grupo del glutamato 1mM sobrevivieron un 25% de los embriones mientras que en el grupo del butirato 1 mM la tasa de supervivencia se redujo al 16,6%. De estos resultados se deduce el efecto posiblemente tóxico producido por las concentraciones empleadas en nuestro estudio. La razón por la cual empleamos medios suplementados con concentraciones de 1mM fue comprobar el efecto que tenía una concentración tan elevada sobre los embriones de ratón. Este planteamiento sería similar al realizado por el grupo de Thompson y colaboradores, los cuales propusieron un modelo de estrés inducido para evaluar el efecto de una perturbación en el ambiente del embrión (Thompson *et al.*, 2002). La importancia de este modelo radica en la inmediatez con que el metabolismo se ve alterado. Este comportamiento también lo hemos podido observar en nuestros resultados. Una posible explicación a estos resultados reside en que los embriones que se ven sometidos a un estrés adicional muestran un metabolismo más rápido, ello les hace producir más ROS que tienen un efecto perjudicial sobre el desarrollo embrionario (Leese *et al.*, 2002).

En cambio, el grupo suplementado con **arginina 1mM** presentó unos resultados ligeramente superiores a las de los otros dos metabolitos, aunque igualmente inferiores a las del grupo control. No existe una mejoría asociada a una concentración tan alta de arginina pero resulta menos dañina que la de los otros metabolitos. Igualmente, de estos resultados se deduce que no existe un efecto positivo en los embriones con la suplementación en arginina 1mM.

La suplementación de los medios con concentraciones inferiores, (0,1 mM) presentó resultados dispares. Por un lado, los embriones suplementados con glutamato y butirato 0,1mM presentaron una calidad embrionaria inferior a la del grupo control. Por lo tanto, no se observa un efecto positivo tras la suplementación con glutamato ni con butirato 0,1mM. Sin embargo, la suplementación del medio con arginina 0,1mM sí que mostró un efecto positivo en el desarrollo y la calidad embrionaria. En promedio, la calidad de los embriones suplementados con arginina 0,1mM fue superior a la del grupo control.

Nuestros resultados estarían en concordancia con lo publicado por Balbach y colaboradores donde en un trabajo con blastocistos de ratón concluyen que la arginina es el aminoácido más consumido por la masa celular interna del blastocisto lo que implica una alta producción de NO dependiente de arginina. Esta elevada producción de NO podría imponer un estadio metabólico quiescente de la masa celular, pues el NO reduce el consumo de O₂ por la interacción con el citocromo-C oxidasa en las mitocondrias (Balbach *et al.*, 2012). Tras los resultados obtenidos Balbach y colaboradores realizaron una suplementación con arginina del medio de cultivo de embriones de ratón y observaron un aumento en el número de células en estadio de blastocisto. Este efecto podría deberse tanto a la conversión en NO como a las poliaminas.



Análisis del medio de cultivo embrionario de ratones mediante RMN

Una vez valorado el efecto a nivel morfológico que produjo en los embriones de ratón la suplementación de los medios de cultivo donde fueron cultivados realizamos un análisis mediante RMN de la composición de dichos medios para evaluar el posible recambio metabólico. La evaluación del recambio metabólico constituye un método no invasivo de selección embrionaria basado en la medición de la aparición y el consumo de determinados aminoácidos en el medio de cultivo embrionario. La capacidad de evaluar la producción y consumo metabólico de un embrión individual nos ayudará además a entender su fisiología en etapas concretas del desarrollo embrionario.

A la hora de realizar el análisis tuvimos en cuenta únicamente los grupos de metabolitos suplementados con una concentración de 0,1 mM debido al efecto positivo manifestado al evaluar la calidad a nivel morfológico de los embriones. Valoramos el grupo completo de embriones en lugar de realizar una valoración independiente por embrión. No hemos valorado la ausencia/presencia de un metabolito determinado, sino la cantidad relativa al resto de la composición metabólica para cada metabolito identificado en los distintos grupos y su diferencia entre día 2 y día 5.

La **treonina** destacó sobre el resto de los metabolitos identificados y cuantificados. El balance total de este metabolito fue positivo para el grupo suplementado con glutamato y arginina 0,1mM, y sin embargo, negativo para el grupo suplementado con butirato. Una posible explicación a este hecho podría residir en la función de este aminoácido esencial. La treonina participa en el metabolismo de los ácidos grasos. El catabolismo de la treonina puede producirse a través de dos rutas metabólicas: L-treonina deshidrogenasa y treonina deshidratasa. En el primer caso el producto final es glicina y en el segundo, ácido cetobutírico y amoniaco, el cual puede convertirse en propionil CoA. Precisamente el grupo de embriones cultivados con la suplementación en butirato 0,1mM presentan además de un descenso de la concentración de treonina, una disminución de los niveles de butirato y un aumento en la concentración de glicina tanto en día 2 como en día 5. La glicina es un producto final de la ruta del catabolismo de la treonina junto con el amoniaco. Los efectos negativos del amoniaco sobre el desarrollo embrionario son de sobra conocidos. Existen muy pocos trabajos, prácticamente ninguno que profundice en el estudio y la descripción detalla del papel que lleva a cabo este metabolito.

El medio de cultivo de embriones suplementado con arginina 0,1mM mostró en día 2 un aumento en la concentración de **glucosa** y un descenso en la concentración de **piruvato y lactato**. En día 5 fue justo a la inversa, aumentó la concentración de piruvato y lactato, y disminuyó la de glucosa. Una revisión reciente llevada a cabo por Gardner pone de manifiesto que el embrión preimplantacional sufre cambios dramáticos en su fisiología desde la fecundación a la implantación. Durante los tres primeros ciclos celulares, no puede usar glucosa como única fuente de energía sino que necesita piruvato o suficiente aspartato o lactato para realiza la primera división. Una vez se produce la activación genómica y aumenta la biosíntesis, debido a la proliferación celular y a la formación del blastocele, el metabolismo de la glucosa se convierte en el principal nutriente. Por lo que los blastocistos viables exhiben un consumo elevado de glucosa (Gardner, 2015). Esto se corresponde con nuestros resultados en cuanto al consumo elevado de glucosa en día 5. Por otro lado, el comportamiento del lactato que observamos quedaría explicado con la glucólisis aeróbica. En esta ruta se produce la formación de lactato en presencia de oxígeno. En blastocistos de ratón y humanos más de 50% de la glucosa consumida es convertida en lactato en presencia de oxígeno al contrario que en estadio de división (Gardner, 2015). Según nuestros resultados en día 2 se produce un consumo de lactato y en día 5 un aumento o producción, por lo que nuestros resultados coinciden con los suyos.

Otros metabolitos que variaron sus niveles de forma apreciable en nuestro modelo son la **glutamina, valina, aspartato y glutamato**. Los valores relativos de glutamina y valina disminuyen en día 5 mientras que los de aspartato y glutamato aumentan. Un estudio realizado por Houghton y colaboradores mediante HPLC cuantificaron el recambio aminoácido de forma individual en embriones donados. Ellos observaron distintos patrones de utilización de los aminoácidos entre embriones que se desarrollaban hasta estadio de blastocisto frente a los que no. Los perfiles de los aminoácidos alanina, arginina, glutamina, metionina y asparragina estaban relacionados con la formación del blastocisto (Houghton *et al.*, 2002). En un trabajo adicional, Brison declaró la existencia de cambios en la concentración de aminoácidos en el medio de cultivo de embriones humanos durante 24 horas desde estadio de cigoto a dos células. Los niveles de leucina, asparragina y glicina hallados en el medio de cultivo se relacionaban con el embarazo (Brison *et al.*, 2004). Por lo tanto, quedo demostrada la implicación clara de estos metabolitos en el desarrollo de embriones viables que se desarrollan hasta estadio de blastocisto. En nuestro caso no vemos consumo de arginina,

posiblemente debido al efecto inicial de la suplementación del medio de cultivo en este grupo, y no detectamos cambios importantes en los niveles de isoleucina/leucina tras el análisis del medio.

A la vista de los resultados de nuestro trabajo podemos decir que la suplementación de los medios de cultivo con arginina podría suponer una mejora de la calidad embrionaria. Los efectos producidos en los embriones de ratón se pueden reportar a los embriones humanos ya que a día de hoy ningún medio de cultivo empleado para la realización de técnicas de fecundación *in vitro* disponible puede ser optimizado para el desarrollo de embriones humanos. Existen estudios publicados que plantean la necesidad de un tamaño muestral superior a los 2000 embriones para la optimización de un medio de cultivo (Lawitts y Biggers, 1991).



Potencial de la Metabolómica en la selección embrionaria

En base a nuestros resultados, podemos afirmar que la metabolómica por RMN es una de las mejores técnicas exploratorias de diferencias metabolómicas entre grandes grupos de muestras. Presenta una ventaja muy importante frente a otras aproximaciones analíticas. Nos ha permitido identificar y cuantificar de manera no invasiva el perfil metabolómico del medio de cultivo partiendo de una muestra de volumen reducido (20 μ l). Con la amplia información analítica disponible hemos sido capaces de construir un modelo predictivo de implantación embrionaria que supone una herramienta de selección complementaria especialmente valiosa para la elección del embrión más viable. Esto permitiría acercarnos a la SET y con ello disminuir la tasa de gestaciones múltiples sin reducir el éxito de las TRA. La utilidad de la Metabolómica por RMN en la búsqueda de biomarcadores ha quedado demostrado, en esta tesis y en otros trabajos publicados, para los procesos de reproducción así como en otros ámbitos de la investigación biomédica.

De igual manera, el estudio del metaboloma del medio de cultivo embrionario y su evolución con el tiempo nos ha ayudado a conocer mejor al embrión desde el punto de vista fisiológico. Sólo así podremos trabajar en nuevas formulaciones con las que mejorar la calidad embrionaria. Los medios de cultivo empleados a diario en los laboratorios de FIV se formulan tras realizar estudios usando modelos animales. A día de hoy se desconoce la composición ideal de los medios de cultivo que permita un desarrollo de embriones humanos de máxima calidad morfológica. Sin embargo, tras la realización de este estudio creemos que la suplementación del medio de cultivo con arginina 0,1mM podría suponer una mejora importante de la formulación del medio de cultivo. Dicha mejora se traduciría en un aumento de la calidad embrionario y con ello de la tasa de embarazo.

Limitaciones del estudio

Aunque son variados y ambiciosos los aspectos que se intentan abarcar en el presente estudio, también somos conscientes de las limitaciones que presentan nuestros resultados. Así, creemos que las principales limitaciones de nuestro estudio son un tamaño muestral reducido, y desajustado entre grupo de implantación y no implantación. Estando el grupo de implantación formado por 13 muestras y el grupo de no implantación por 65. El número medio de embriones transferidos a las pacientes en nuestra Unidad es de dos. Debido a ello son muchas las ocasiones en las que tras la transferencia de dos embriones se consigue una gestación única (70%). Estos casos fueron eliminados de nuestro estudio por la imposibilidad de saber con certeza absoluta cuál de los dos embriones había implantado. Por lo tanto, seleccionamos sólo pacientes donde hubiesen implantado la totalidad de los embriones transferidos. Puesto que sólo así podemos comparar los perfiles metabolómicos pertenecientes a muestras de embriones que implantaron frente a las que no implantaron.

Por otro lado, existe una limitación evidente a la hora de extrapolar los resultados obtenidos en embriones de ratón debido a las diferencias fisiológicas entre el embrión humano y el de ratón. Aunque los embriones de ratón son el modelo animal más estudiado en Embriología por su fácil obtención, manejo y sus similitudes durante el desarrollo preimplantacional, no dejan de existir diferencias importantes con los embriones humanos a nivel fisiológico. Su desarrollo es más rápido que en humanos y la activación de su genoma tiene lugar cuando es un cigoto y no en día 3 como en humanos (Niakan *et al.*, 2012).

La valoración estadística de las diferencias en las proporciones de la puntuación morfológica de los ratones mediante un test exacto de Fisher frente a los controles no fue estadísticamente significativas. Pensamos que esto podría deberse al reducido tamaño muestral de nuestros grupos. Cuando el tamaño muestral o alguno de los totales marginales es pequeño la distribución hipergeométrica es altamente discreta (toma muy pocos valores), el *p*-valor tiende a ser muy grande, y por tanto no se alcanza el nivel de significación estadística. Por todo esto sería necesario un estudio con un tamaño muestral mayor con el que poder comprobar si la tendencia que marca la suplementación con arginina 0,1 mM es finalmente significativa.

Reflexión final

Los hospitales son la “puerta de entrada” de innovaciones tecnológicas. La aplicación a la clínica diaria de una nueva herramienta complementaria de selección embrionaria y un sistema optimizado de cultivo embrionario que nos acerque a la SET podría mejorar las tasas de éxito de las TRA al seleccionar el mejor embrión para transferir.

Gracias a ello sería necesaria la obtención de una menor cantidad de ovocitos para conseguir una gestación. Esto evitaría la necesidad de aplicar protocolos de estimulación con dosis elevadas de fármacos que se emplean habitualmente con el objetivo de obtener una gran cohorte ovocitaria que pueda generar un suficiente número de embriones. La reducción en las dosis de fármacos empleados podría suponer un importante ahorro económico teniendo en cuenta que el coste medio por paciente de la medicación empleada en un tratamiento de FIV es hasta de 1000 euros. Este ahorro ayudaría a realizar una mejora de la efectividad de los tratamientos.

El ahorro económico no sólo afectaría a los fármacos, la selección del mejor embrión podría reducir el número de intentos necesarios para conseguir el embarazo. Esto implicaría además la reducción del número de estimulaciones y del consumo de fármacos, reducción del número de ecografías y determinaciones analíticas empleadas habitualmente tanto para evaluar la existencia de gestación como para realizar el seguimiento de la paciente durante la estimulación. Se podría resumir como una disminución de costes y procesos con la consecuente optimización de recursos y reducción de listas de espera.

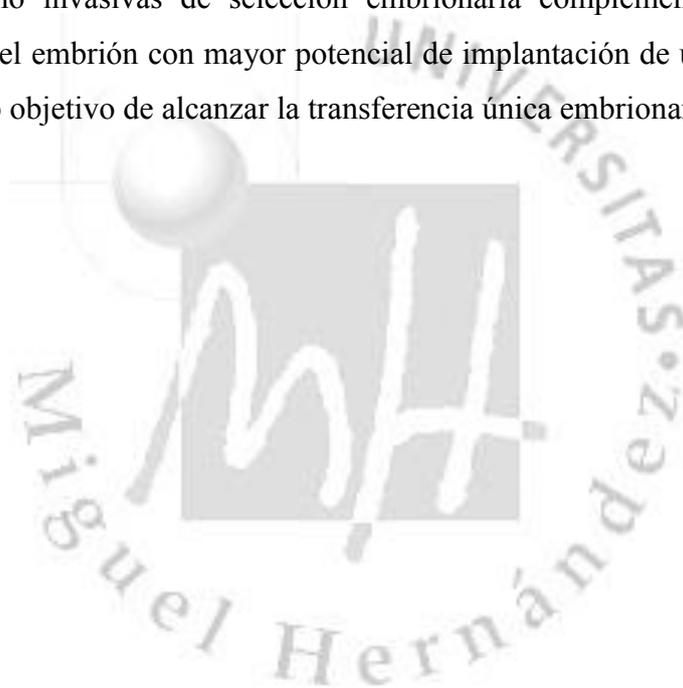
Los aspectos psicológicos se verían también afectados por la aplicación de esta nueva herramienta. El estrés emocional elevado al que se ven sometidos los pacientes de FIV podría minimizarse al lograr antes su deseo genésico. La realización de un menor número de ciclos para conseguir una gestación limitaría las veces que una paciente tiene que administrarse la medicación de tipo hormonal que tanto afecta a su vida diaria y estabilidad emocional.

Las investigaciones que verán la luz en un futuro reciente en el campo de la reproducción asistida van encaminadas a la relación existente entre la morfocinética y el lactato y la viabilidad. Se está

considerando crear junto con la morfocinética un algoritmo robusto de selección embrionaria basado en el empleo de los “*microfluidics*” (Gardner *et al.*, 2015).

La limitación en el número de embriones transferidos es el medio más eficaz en la reducción de la tasa de embarazos múltiples. En países, como Suecia y Bélgica, donde está más ampliamente establecida la SET ha permitido mantener las tasas de recién nacido vivo con una reducción en los partos múltiples así como en los costes globales asociados (Maheshwari *et al.*, 2011, Gianaroli *et al.*, 2012).

La combinación de un buen sistema de cultivo con una formulación adecuada y la aplicación de nuevas herramientas no invasivas de selección embrionaria complementarias a la morfología permitirán seleccionar el embrión con mayor potencial de implantación de una forma más objetiva, acercándonos a nuestro objetivo de alcanzar la transferencia única embrionaria.





CONCLUSIONES.





6. Conclusiones.

- Los embriones humanos que implantan muestran un perfil metabólico del medio de cultivo en día 2 distinto al que presentan los que no implantan.
- Hemos establecido un biomarcador metabólico diferencial, definido por la concentración relativa de un conjunto de metabolitos, que caracteriza a los embriones humanos que implantan.
- El biomarcador de viabilidad embrionaria humana está definido principalmente por los niveles relativos de cinco metabolitos: Ácido 2-hidroxisovalerico, Alanina, Butirato, Arginina y Glutamato.
- El modelo predictivo de viabilidad embrionaria, construido en base al metaboloma del medio de cultivo, podría usarse como herramienta complementaria a la morfología en la selección embrionaria.
- La suplementación del medio de cultivo de embriones de ratón con arginina, glutamato y butirato 1 mM tiene un efecto muy negativo en el desarrollo de los embriones.
- La suplementación del medio de cultivo de embriones de ratón con glutamato y butirato 0,1 mM no tiene un efecto importante sobre el desarrollo de los embriones. En cambio, la suplementación con Arginina 0,1mM presenta una mejoría evidente de la calidad embrionaria.
- La Metabolómica mediante RMN del medio de cultivo suplementado aporta una información valiosa sobre la alteración de los diferentes procesos fisiológicos y rutas metabólicas que ocurren.
- Los embriones de mayor calidad embrionaria y por tanto mayor potencial de implantación muestran un consumo elevado de glucosa en día 5 y producción de lactato.
- La Metabolómica del medio de cultivo de embriones mediante la RMN ha demostrado ser una herramienta muy potente para una selección de embriones más efectiva y el desarrollo de medios de cultivo más eficientes.



BIBLIOGRAFÍA.





7. Bibliografía.

- Ahlstrom A, Wikland M, Rogberg L, Barnett JS, Tucker M, Hardarson T. Cross-validation and predictive value of near-infrared spectroscopy algorithms for day-5 blastocyst transfer. *Reprod Biomed Online* 2011 May;22(5):477-484.
- Alfarawati S, Fragouli E, Colls P, Stevens J, Gutierrez-Mateo C, Schoolcraft WB, et al. The relationship between blastocyst morphology, chromosomal abnormality, and embryo gender. *Fertil Steril* 2011 Feb;95(2):520-524.
- ASEBIR. Criterios ASEBIR de valoración morfológica de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos. 2ª ed. Madrid: Asebir; 2008.
- Assidi M, Montag M, Van der Ven K, Sirard MA. Biomarkers of human oocyte developmental competence expressed in cumulus cells before ICSI: a preliminary study. *J Assist Reprod Genet* 2011 Feb;28(2):173-188.
- Assou S, Haouzi D, Mahmoud K, Aouacheria A, Guillemin Y, Pantesco V, et al. A non-invasive test for assessing embryo potential by gene expression profiles of human cumulus cells: a proof of concept study. *Mol Hum Reprod* 2008 Dec;14(12):711-719.
- Baart EB, Martini E, van den Berg I, Macklon NS, Galjaard RJ, Fauser BC, et al. Preimplantation genetic screening reveals a high incidence of aneuploidy and mosaicism in embryos from young women undergoing IVF. *Hum Reprod* 2006 Jan;21(1):223-233.
- Balaban B, Sakkas D, Gardner DK. Laboratory procedures for human in vitro fertilization. *Semin Reprod Med* 2014 Jul;32(4):272-282.
- Balaban B, Urman B. Effect of oocyte morphology on embryo development and implantation. *Reprod Biomed Online* 2006 May;12(5):608-615.
- Balbach ST, Esteves TC, Houghton FD, Siatkowski M, Pfeiffer MJ, Tsurumi C, et al. Nuclear reprogramming: kinetics of cell cycle and metabolic progression as determinants of success. *PLoS One* 2012;7(4):e35322.

- Basile N, Morbeck D, Garcia-Velasco J, Bronet F, Meseguer M. Type of culture media does not affect embryo kinetics: a time-lapse analysis of sibling oocytes. *Hum Reprod* 2013 Mar;28(3):634-641.
- Battaglia C, Ciotti P, Notarangelo L, Fratto R, Facchinetti F, de Aloysio D. Embryonic production of nitric oxide and its role in implantation: a pilot study. *J Assist Reprod Genet* 2003 Nov;20(11):449-454.
- Biggers J, Whittingham D, Donahue R. The pattern of energy metabolism in the mouse oocyte and zygote. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1967;58(2):560-567.
- Biggers JD, Gwatkin RB, Brinster RL. Development of mouse embryos in organ cultures of fallopian tubes on a chemically defined medium. *Nature* 1962 May 26;194:747-749.
- Biggers JD, Summers MC. Choosing a culture medium: making informed choices. *Fertil Steril* 2008 Sep;90(3):473-483.
- Biggers JD, Whittingham DG, Donahue RP. The pattern of energy metabolism in the mouse oocyte and zygote. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1967 Aug;58(2):560-567.
- Bongso A, Soon-Chye N, Sathananthan H, Lian NP, Rauff M, Ratnam S. Improved quality of human embryos when co-cultured with human ampullary cells. *Hum Reprod* 1989 Aug;4(6):706-713.
- Bontekoe S, Mantikou E, van Wely M, Seshadri S, Repping S, Mastenbroek S. Low oxygen concentrations for embryo culture in assisted reproductive technologies. *Cochrane Database Syst Rev* 2012 Jul 11;7:CD008950.
- Botros L, Sakkas D, Seli E. Metabolomics and its application for non-invasive embryo assessment in IVF. *Mol Hum Reprod* 2008 Dec;14(12):679-690.
- Brezina PR, Benner A, Rechitsky S, Kuliev A, Pomerantseva E, Pauling D, et al. Single-gene testing combined with single nucleotide polymorphism microarray preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy: a novel approach in optimizing pregnancy outcome. *Fertil Steril* 2011 Apr;95(5):1786.e5-1786.e8.
- Brison DR, Houghton FD, Falconer D, Roberts SA, Hawkhead J, Humpherson PG, et al. Identification of viable embryos in IVF by non-invasive measurement of amino acid turnover. *Hum Reprod* 2004 Oct;19(10):2319-2324.

- Cervero A, Horcajadas JA, Dominguez F, Pellicer A, Simon C. Leptin system in embryo development and implantation: a protein in search of a function. *Reprod Biomed Online* 2005 Feb;10(2):217-223.
- Chen C, Kattera S. Comparison of pronuclear zygote morphology and early cleavage status of zygotes as additional criteria in the selection of day 3 embryos: a randomized study. *Fertil Steril* 2006 Feb;85(2):347-352.
- Cheng EY, Hunt PA, Nalwai-Cecchini TA, Fligner CL, Fujimoto VY, Pasternack TL, et al. Meiotic recombination in human oocytes. *PLoS Genet* 2009 Sep;5(9):e1000661.
- Chronopoulou E, Harper JC. IVF culture media: past, present and future. *Hum Reprod Update* 2015 Jan-Feb;21(1):39-55.
- Cillo F, Brevini TA, Antonini S, Paffoni A, Ragni G, Gandolfi F. Association between human oocyte developmental competence and expression levels of some cumulus genes. *Reproduction* 2007 Nov;134(5):645-650.
- Ciotti PM, Notarangelo L, Morselli-Labate AM, Felletti V, Porcu E, Venturoli S. First polar body morphology before ICSI is not related to embryo quality or pregnancy rate. *Hum Reprod* 2004 Oct;19(10):2334-2339.
- Ciray HN, Karagenc L, Ulug U, Bener F, Bahceci M. Use of both early cleavage and day 2 mononucleation to predict embryos with high implantation potential in intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril* 2005 Nov;84(5):1411-1416.
- Collado-Fernandez E, Picton HM, Dumollard R. Metabolism throughout follicle and oocyte development in mammals. *Int J Dev Biol* 2012;56(10-12):799-808.
- Colls P, Escudero T, Cekleniak N, Sadowy S, Cohen J, Munne S. Increased efficiency of preimplantation genetic diagnosis for infertility using "no result rescue". *Fertil Steril* 2007 Jul;88(1):53-61.
- Conaghan J, Handyside AH, Winston RM, Leese HJ. Effects of pyruvate and glucose on the development of human preimplantation embryos in vitro. *J Reprod Fertil* 1993 Sep;99(1):87-95.
- Conaghan J, Hardy K, Handyside AH, Winston RM, Leese HJ. Selection criteria for human embryo transfer: a comparison of pyruvate uptake and morphology. *J Assist Reprod Genet* 1993 Jan;10(1):21-30.

- Daphnis DD, Delhanty JD, Jerkovic S, Geyer J, Craft I, Harper JC. Detailed FISH analysis of day 5 human embryos reveals the mechanisms leading to mosaic aneuploidy. *Hum Reprod* 2005 Jan;20(1):129-137.
- Dessolle L, Freour T, Ravel C, Jean M, Colombel A, Darai E, et al. Predictive factors of healthy term birth after single blastocyst transfer. *Hum Reprod* 2011 May;26(5):1220-1226.
- DeUgarte CM, Li M, Surrey M, Danzer H, Hill D, DeCherney AH. Accuracy of FISH analysis in predicting chromosomal status in patients undergoing preimplantation genetic diagnosis. *Fertil Steril* 2008 Oct;90(4):1049-1054.
- Dominguez F, Gadea B, Esteban FJ, Horcajadas JA, Pellicer A, Simon C. Comparative protein-profile analysis of implanted versus non-implanted human blastocysts. *Hum Reprod* 2008 Sep;23(9):1993-2000.
- Dumoulin JC, Land JA, Van Montfoort AP, Nelissen EC, Coonen E, Derhaag JG, et al. Effect of in vitro culture of human embryos on birthweight of newborns. *Hum Reprod* 2010 Mar;25(3):605-612.
- Dunning KR, Cashman K, Russell DL, Thompson JG, Norman RJ, Robker RL. Beta-oxidation is essential for mouse oocyte developmental competence and early embryo development. *Biol Reprod* 2010 Dec;83(6):909-918.
- Edwards RG, Purdy JM, Steptoe PC, Walters DE. The growth of human preimplantation embryos in vitro. *Am J Obstet Gynecol* 1981 Oct 15;141(4):408-416.
- Eid LN, Lorton SP, Parrish JJ. Paternal influence on S-phase in the first cell cycle of the bovine embryo. *Biol Reprod* 1994 Dec;51(6):1232-1237.
- El Hajj N, Haaf T. Epigenetic disturbances in in vitro cultured gametes and embryos: implications for human assisted reproduction. *Fertil Steril* 2013 Mar 1;99(3):632-641.
- Escrich L, Grau N, Meseguer M, Pellicer A, Escriba MJ. Morphologic indicators predict the stage of chromatin condensation of human germinal vesicle oocytes recovered from stimulated cycles. *Fertil Steril* 2010 May 15;93(8):2557-2564.

- Ferguson EM, Leese HJ. A potential role for triglyceride as an energy source during bovine oocyte maturation and early embryo development. *Mol Reprod Dev* 2006 Sep;73(9):1195-1201.
- Fischer B, Bavister BD. Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. *J Reprod Fertil* 1993 Nov;99(2):673-679.
- Fischer J, Colls P, Escudero T, Munne S. Preimplantation genetic diagnosis (PGD) improves pregnancy outcome for translocation carriers with a history of recurrent losses. *Fertil Steril* 2010 Jun;94(1):283-289.
- Fragouli E, Alfarawati S, Daphnis DD, Goodall NN, Mania A, Griffiths T, et al. Cytogenetic analysis of human blastocysts with the use of FISH, CGH and aCGH: scientific data and technical evaluation. *Hum Reprod* 2011 Feb;26(2):480-490.
- Gardner DK. Lactate production by the mammalian blastocyst: manipulating the microenvironment for uterine implantation and invasion? *Bioessays* 2015 Apr;37(4):364-371.
- Gardner DK. Development of serum-free culture systems for the ruminant embryo and subsequent assessment of embryo viability. *J Reprod Fertil Suppl* 1999;54:461-475.
- Gardner DK. Development of serum-free media for the culture and transfer of human blastocysts. *Hum Reprod* 1998 Dec;13 Suppl 4:218-225.
- Gardner DK, Gardner DK, Harvey AJ, Harvey AJ. Blastocyst metabolism. *Reprod Fertil Dev* 2015 Mar;27(4):638-654.
- Gardner DK, Lane M. Towards a single embryo transfer. *Reprod Biomed Online* 2003 Jun;6(4):470-481.
- Gardner DK, Lane M. Culture and selection of viable blastocysts: a feasible proposition for human IVF? *Hum Reprod Update* 1997 Jul-Aug;3(4):367-382.
- Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schoolcraft WB. Noninvasive assessment of human embryo nutrient consumption as a measure of developmental potential. *Fertil Steril* 2001 Dec;76(6):1175-1180.
- Gardner DK, Meseguer M, Rubio C, Treff NR. Diagnosis of human preimplantation embryo viability. *Hum Reprod Update* 2015 Jan 6. PMID: 25567750.

- Gardner DK, Wale PL. Analysis of metabolism to select viable human embryos for transfer. *Fertil Steril* 2013 Mar 15;99(4):1062-1072.
- Gianaroli L, Racowsky C, Geraedts J, Cedars M, Makrigiannakis A, Lobo R. Best practices of ASRM and ESHRE: a journey through reproductive medicine. *Hum Reprod* 2012 Dec;27(12):3365-3379.
- Gonzalez, RR. Caballero-Campo, P. Jasper, M. Leptin and leptin receptor are expressed in human endometrium and endometrial leptin receptor is regulated by the human blastocyst. *J. Clin Endocrinol Metab* 2000;85(12):4883-4888.
- Gott AL, Hardy K, Winston RM, Leese HJ. Non-invasive measurement of pyruvate and glucose uptake and lactate production by single human preimplantation embryos. *Hum Reprod* 1990 Jan;5(1):104-108.
- Haggarty P, Wood M, Ferguson E, Hoad G, Srikantharajah A, Milne E, et al. Fatty acid metabolism in human preimplantation embryos. *Hum Reprod* 2006 Mar;21(3):766-773.
- Handyside AH, Harton GL, Mariani B, Thornhill AR, Affara N, Shaw MA, et al. Karyomapping: a universal method for genome wide analysis of genetic disease based on mapping crossovers between parental haplotypes. *J Med Genet* 2010 Oct;47(10):651-658.
- Hanson C, Hardarson T, Lundin K, Bergh C, Hillensjo T, Stevic J, et al. Re-analysis of 166 embryos not transferred after PGS with advanced reproductive maternal age as indication. *Hum Reprod* 2009 Nov;24(11):2960-2964.
- Hardarson T, Ahlstrom A, Rogberg L, Botros L, Hillensjo T, Westlander G, et al. Non-invasive metabolomic profiling of Day 2 and 5 embryo culture medium: a prospective randomized trial. *Hum Reprod* 2012 Jan;27(1):89-96.
- Hardarson T, Hanson C, Sjogren A, Lundin K. Human embryos with unevenly sized blastomeres have lower pregnancy and implantation rates: indications for aneuploidy and multinucleation. *Hum Reprod* 2001 Feb;16(2):313-318.
- Hardy K, Hooper MA, Handyside AH, Rutherford AJ, Winston RM, Leese HJ. Non-invasive measurement of glucose and pyruvate uptake by individual human oocytes and preimplantation embryos. *Hum Reprod* 1989 Feb;4(2):188-191.

- Harton G, Braude P, Lashwood A, Schmutzler A, Traeger-Synodinos J, Wilton L, et al. ESHRE PGD consortium best practice guidelines for organization of a PGD centre for PGD/preimplantation genetic screening. *Hum Reprod* 2011 Jan;26(1):14-24.
- Harton GL, Harper JC, Coonen E, Pehlivan T, Vesela K, Wilton L, et al. ESHRE PGD consortium best practice guidelines for fluorescence in situ hybridization-based PGD. *Hum Reprod* 2011 Jan;26(1):25-32.
- Hassan-Ali H, Hisham-Saleh A, El-Gezeiry D, Baghdady I, Ismaeil I, Mandelbaum J. Perivitelline space granularity: a sign of human menopausal gonadotrophin overdose in intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction* 1998;13:3425-3430.
- Hellani A, Abu-Amero K, Azouri J, El-Akoum S. Successful pregnancies after application of array-comparative genomic hybridization in PGS-aneuploidy screening. *Reprod Biomed Online* 2008 Dec;17(6):841-847.
- Hogge WA, Byrnes AL, Lanasa MC, Surti U. The clinical use of karyotyping spontaneous abortions. *Am J Obstet Gynecol* 2003 Aug;189(2):397-400; discussion 400-402.
- Houghton FD, Hawkhead JA, Humpherson PG, Hogg JE, Balen AH, Rutherford AJ, et al. Non-invasive amino acid turnover predicts human embryo developmental capacity. *Hum Reprod* 2002 Apr;17(4):999-1005.
- Houghton FD, Sheth B, Moran B, Leese HJ, Fleming TP. Expression and activity of hexokinase in the early mouse embryo. *Mol Hum Reprod* 1996 Oct;2(10):793-798.
- Huertas Fdez. MA, González Bermejo AI. Análisis de la problemática de la gestación gemelar. *Epidemiología. Consecuencias sociosanitarias.* . In: MA Huertas Fdez, L Martínez Cortés, editor. *Gestación Gemelar. Manejo y tratamiento.* 1ª ed. Barcelona: Glosa; 2010. p. 13.
- JC Lindon, JK Nicholson, E Holmes. *Handbook of Metabonomics and Metabolomics.* : Elsevier; 2007.
- Juriscova A, Casper RF, MacLusky NJ, Librach CL. Embryonic human leukocyte antigen-G expression: possible implications for human preimplantation development. *Fertil Steril* 1996 May;65(5):997-1002.

- Juriscova A, Casper RF, MacLusky NJ, Mills GB, Librach CL. HLA-G expression during preimplantation human embryo development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996 Jan 9;93(1):161-165.
- Karamalegos C, Bolton VN. A prospective comparison of 'in house' and commercially prepared Earle's balanced salt solution in human in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1999 Jul;14(7):1842-1846.
- Kaser DJ, Racowsky C. Clinical outcomes following selection of human preimplantation embryos with time-lapse monitoring: a systematic review. *Hum Reprod Update* 2014 Sep-Oct;20(5):617-631.
- Kattal N, Cohen J, Barmat LI. Role of coculture in human in vitro fertilization: a meta-analysis. *Fertil Steril* 2008 Oct;90(4):1069-1076.
- Katz-Jaffe MG, Gardner DK, Schoolcraft WB. Proteomic analysis of individual human embryos to identify novel biomarkers of development and viability. *Fertil Steril* 2006 Jan;85(1):101-107.
- Katz-Jaffe MG, McReynolds S, Gardner DK, Schoolcraft WB. The role of proteomics in defining the human embryonic secretome. *Mol Hum Reprod* 2009 May;15(5):271-277.
- Kirkegaard K, Svane AS, Nielsen JS, Hindkjaer JJ, Nielsen NC, Ingerslev HJ. Nuclear magnetic resonance metabolomic profiling of Day 3 and 5 embryo culture medium does not predict pregnancy outcome in good prognosis patients: a prospective cohort study on single transferred embryos. *Hum Reprod* 2014 Nov;29(11):2413-2420.
- Kotze DJ, Hansen P, Keskinetepe L, Snowden E, Sher G, Kruger T. Embryo selection criteria based on morphology VERSUS the expression of a biochemical marker (sHLA-G) and a graduated embryo score: prediction of pregnancy outcome. *J Assist Reprod Genet* 2010 Jun;27(6):309-316.
- Kurimoto K, Yabuta Y, Ohinata Y, Saitou M. Global single-cell cDNA amplification to provide a template for representative high-density oligonucleotide microarray analysis. *Nat Protoc* 2007;2(3):739-752.

- Lane M, Gardner DK. Mitochondrial malate-aspartate shuttle regulates mouse embryo nutrient consumption. *J Biol Chem* 2005 May 6;280(18):18361-18367.
- Lane M, Gardner DK. Ammonium induces aberrant blastocyst differentiation, metabolism, pH regulation, gene expression and subsequently alters fetal development in the mouse. *Biol Reprod* 2003 Oct;69(4):1109-1117.
- Lawitts JA, Biggers JD. Optimization of mouse embryo culture media using simplex methods. *J Reprod Fertil* 1991 Mar;91(2):543-556.
- Lee E, Illingworth P, Wilton L, Chambers GM. The clinical effectiveness of preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy in all 24 chromosomes (PGD-A): systematic review. *Hum Reprod* 2015 Feb;30(2):473-483.
- Lee YS, Thouas GA, Gardner DK. Developmental kinetics of cleavage stage mouse embryos are related to their subsequent carbohydrate and amino acid utilization at the blastocyst stage. *Hum Reprod* 2015 Mar;30(3):543-552.
- Leese HJ. Metabolism of the preimplantation embryo: 40 years on. *Reproduction* 2012 Apr;143(4):417-427.
- Leese HJ. Quiet please, do not disturb: a hypothesis of embryo metabolism and viability. *Bioessays* 2002 Sep;24(9):845-849.
- Leese HJ, Baumann CG, Brison DR, McEvoy TG, Sturmey RG. Metabolism of the viable mammalian embryo: quietness revisited. *Mol Hum Reprod* 2008 Dec;14(12):667-672.
- Leese HJ, Biggers JD, Mroz EA, Lechene C. Nucleotides in a single mammalian ovum or preimplantation embryo. *Anal Biochem* 1984 Aug 1;140(2):443-448.
- Lemmen JG, Agerholm I, Ziebe S. Kinetic markers of human embryo quality using time-lapse recordings of IVF/ICSI-fertilized oocytes. *Reprod Biomed Online* 2008 Sep;17(3):385-391.
- Li L, Sui W, Che W, Li W, Chen J, Li H, et al. 1H NMR-based metabolic profiling of human serum before and after renal transplantation. *ASAIO J* 2013 May-Jun;59(3):286-293.

- Li M, DeUgarte CM, Surrey M, Danzer H, DeCherney A, Hill DL. Fluorescence in situ hybridization reanalysis of day-6 human blastocysts diagnosed with aneuploidy on day 3. *Fertil Steril* 2005 Nov;84(5):1395-1400.
- Lindon JC, Nicholson JK. Spectroscopic and statistical techniques for information recovery in metabonomics and metabolomics. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)* 2008;1:45-69.
- Ling J, Zhuang G, Tazon-Vega B, Zhang C, Cao B, Rosenwaks Z, et al. Evaluation of genome coverage and fidelity of multiple displacement amplification from single cells by SNP array. *Mol Hum Reprod* 2009 Nov;15(11):739-747.
- Lipari CW, Garcia JE, Zhao Y, Thrift K, Vaidya D, Rodriguez A. Nitric oxide metabolite production in the human preimplantation embryo and successful blastocyst formation. *Fertil Steril* 2009 Apr;91(4 Suppl):1316-1318.
- Ljunger E, Cnattingius S, Lundin C, Anneren G. Chromosomal anomalies in first-trimester miscarriages. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2005 Nov;84(11):1103-1107.
- Luke B, Brown MB, Alexandre PK, Kinoshi T, O'Sullivan MJ, Martin D, et al. The cost of twin pregnancy: maternal and neonatal factors. *Am J Obstet Gynecol* 2005 Mar;192(3):909-915.
- Magli MC, Jones G, Lundin K, Van den Abbeel, E. Atlas of Human Embryology: From Oocytes to Preimplantation Embryos. *Human Reproduction*. 2012;27 (Suppl 1).
- Maheshwari A, Griffiths S, Bhattacharya S. Global variations in the uptake of single embryo transfer. *Hum Reprod Update* 2011 Jan-Feb;17(1):107-120.
- Manser RC, Leese HJ, Houghton FD. Effect of inhibiting nitric oxide production on mouse preimplantation embryo development and metabolism. *Biol Reprod* 2004 Aug;71(2):528-533.
- Mantikou E, Youssef MA, van Wely M, van der Veen F, Al-Inany HG, Repping S, et al. Embryo culture media and IVF/ICSI success rates: a systematic review. *Hum Reprod Update* 2013 May-Jun;19(3):210-220.
- Matorras R, Hernández J, Molero D. Tratado de Reproducción Humana para Enfermería. Madrid: Panamericana; 2008.

- McKiernan SH, Bavister BD. Timing of development is a critical parameter for predicting successful embryogenesis. *Hum Reprod* 1994 Nov;9(11):2123-2129.
- Menezo Y. Synthetic medium for gamete survival and maturation and for culture of fertilized eggs. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* 1976 Jun 14;282(22):1967-1970.
- Meseguer M, Herrero J, Tejera A, Hilligsoe KM, Ramsing NB, Remohi J. The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Hum Reprod* 2011 Oct;26(10):2658-2671.
- Meseguer M, Rubio I, Cruz M, Basile N, Marcos J, Requena A. Embryo incubation and selection in a time-lapse monitoring system improves pregnancy outcome compared with a standard incubator: a retrospective cohort study. *Fertil Steril* 2012 Dec;98(6):1481-9.e10.
- Mills RM BR. Oxygen consumption of preimplantation mouse embryos. *Exp Cell Res* 1967;47:337-344.
- Mir P, Rodrigo L, Mateu E, Peinado V, Milan M, Mercader A, et al. Improving FISH diagnosis for preimplantation genetic aneuploidy screening. *Hum Reprod* 2010 Jul;25(7):1812-1817.
- Moreno, J.M, Iniesta, J, López-Gálvez, J.J, Esclapez, M.D, Montiel, V, Gil, L, Poveda, M, Lloret, M, Rueda, J. Métodos químicos para la selección de embriones. IV Congreso de la Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción. Bilbao, noviembre 2007.
- Nagy ZP, Sakkas D, Behr B. Symposium: innovative techniques in human embryo viability assessment. Non-invasive assessment of embryo viability by metabolomic profiling of culture media ('metabolomics'). *Reprod Biomed Online* 2008 Oct;17(4):502-507.
- Nakahara T, Iwase A, Goto M. Evaluation of the safety of time-lapse observations for human embryos. *J Assist Reprod Genet* 2010;27(2-3):93-96.
- Nelissen EC, Van Montfoort AP, Coonen E, Derhaag JG, Geraedts JP, Smits LJ, et al. Further evidence that culture media affect perinatal outcome: findings after transfer of fresh and cryopreserved embryos. *Hum Reprod* 2012 Jul;27(7):1966-1976.

- Nel-Themaat L, Nagy ZP. A review of the promises and pitfalls of oocyte and embryo metabolomics. *Placenta* 2011 Sep;32 Suppl 3:S257-63.
- Neuber E, Rinaudo P, Trimarchi JR, Sakkas D. Sequential assessment of individually cultured human embryos as an indicator of subsequent good quality blastocyst development. *Hum Reprod* 2003 Jun;18(6):1307-1312.
- Niakan KK, Han J, Pedersen RA, Simon C, Pera RA. Human pre-implantation embryo development. *Development* 2012 Mar;139(5):829-841.
- Nicholson JK, O'Flynn MP, Sadler PJ, Macleod AF, Juul SM, Sonksen PH. Proton-nuclear-magnetic-resonance studies of serum, plasma and urine from fasting normal and diabetic subjects. *Biochem J* 1984 Jan 15;217(2):365-375.
- Noci I, Fuzzi B, Rizzo R, Melchiorri L, Criscuoli L, Dabizzi S, et al. Embryonic soluble HLA-G as a marker of developmental potential in embryos. *Hum Reprod* 2005 Jan;20(1):138-146.
- O'Neill C. The role of paf in embryo physiology. *Human Reproduction Update* 2005;11(3):215-228.
- Pudakalakatti SM, Uppangala S, D'Souza F, Kalthur G, Kumar P, Adiga SK, et al. NMR studies of preimplantation embryo metabolism in human assisted reproductive techniques: a new biomarker for assessment of embryo implantation potential. *NMR Biomed* 2013 Jan;26(1):20-27.
- Quinn P. Culture system: sequential. *Methods Mol Biol* 2012;912:211-230.
- Quinn P. The development and impact of culture media for assisted reproductive technologies. *Fertil Steril* 2004 Jan;81(1):27-29.
- Rabinowitz M, Ryan A, Gemelos G, Hill M, Baner J, Cinnioglu C, et al. Origins and rates of aneuploidy in human blastomeres. *Fertil Steril* 2012 Feb;97(2):395-401.
- Rinaudo P, Shen S, Hua J, Qian S, Prabhu U, Garcia E, et al. (1)H NMR based profiling of spent culture media cannot predict success of implantation for day 3 human embryos. *J Assist Reprod Genet* 2012 Dec;29(12):1435-1442.
- Robertson SA. GM-CSF regulation of embryo development and pregnancy. *Cytokine Growth Factor Rev* 2007 Jun-Aug;18(3-4):287-298.

- Sakkas D. Embryo selection using metabolomics. *Methods Mol Biol* 2014;1154:533-540.
- Sakkas D, Lu C, Zulfikaroglu E, Neuber E, Taylor HS. A soluble molecule secreted by human blastocysts modulates regulation of HOXA10 expression in an epithelial endometrial cell line. *Fertil Steril* 2003 Nov;80(5):1169-1174.
- Sakkas D, Percival G, D'Arcy Y, Sharif K, Afnan M. Assessment of early cleaving in vitro fertilized human embryos at the 2-cell stage before transfer improves embryo selection. *Fertil Steril* 2001 Dec;76(6):1150-1156.
- Sakkas D, Shoukir Y, Chardonens D, Bianchi PG, Campana A. Early cleavage of human embryos to the two-cell stage after intracytoplasmic sperm injection as an indicator of embryo viability. *Hum Reprod* 1998 Jan;13(1):182-187.
- Schwarzer C, Esteves TC, Arauzo-Bravo MJ, Le Gac S, Nordhoff V, Schlatt S, et al. ART culture conditions change the probability of mouse embryo gestation through defined cellular and molecular responses. *Hum Reprod* 2012 Sep;27(9):2627-2640.
- Scott Jr RT, Tao X, Taylor D, Ferry K, Treff N. A prospective randomized controlled trial demonstrating significantly increased clinical pregnancy rates following 24 chromosomes aneuploidy screening: biopsy and analysis on day 5 with fresh transfer. *Fertility and sterility* 2010;94(S2).
- Scott L. Predicting Embryo Development. . Rabe T, Dietrich K, Strowitzki T, editors. *Manual on Assisted Reproduction*: Springer; 2000. p. 321.
- Scott L. The biological basis of non-invasive strategies for selection of human oocytes and embryos. *Hum Reprod Update* 2003 May-Jun;9(3):237-249.
- Scott R, Seli E, Miller K, Sakkas D, Scott K, Burns DH. Noninvasive metabolomic profiling of human embryo culture media using Raman spectroscopy predicts embryonic reproductive potential: a prospective blinded pilot study. *Fertil Steril* 2008 Jul;90(1):77-83.
- Scott RT,Jr, Ferry K, Su J, Tao X, Scott K, Treff NR. Comprehensive chromosome screening is highly predictive of the reproductive potential of human embryos: a prospective, blinded, nonselection study. *Fertil Steril* 2012 Apr;97(4):870-875.

- Seli E, Botros L, Sakkas D, Burns DH. Noninvasive metabolomic profiling of embryo culture media using proton nuclear magnetic resonance correlates with reproductive potential of embryos in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2008 Dec;90(6):2183-2189.
- Seli E, Robert C, Sirard MA. OMICS in assisted reproduction: possibilities and pitfalls. *Mol Hum Reprod* 2010 Aug;16(8):513-530.
- Seli E, Sakkas D, Scott R, Kwok SC, Rosendahl SM, Burns DH. Noninvasive metabolomic profiling of embryo culture media using Raman and near-infrared spectroscopy correlates with reproductive potential of embryos in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2007 Nov;88(5):1350-1357.
- Seli E, Vergouw CG, Morita H, Botros L, Roos P, Lambalk CB, et al. Noninvasive metabolomic profiling as an adjunct to morphology for noninvasive embryo assessment in women undergoing single embryo transfer. *Fertil Steril* 2010 Jul;94(2):535-542.
- Sfontouris I, Lainas G, Sakkas D. Assessment of embryo selection using non-invasive metabolomic analysis as an adjunct to morphology indicates improvement in implantation and fetal cardiac activity rates. *Hum Reprod* 2011;26(Suppl 1):86.
- Shoukir Y, Campana A, Farley T, Sakkas D. Early cleavage of in-vitro fertilized human embryos to the 2-cell stage: a novel indicator of embryo quality and viability. *Hum Reprod* 1997 Jul;12(7):1531-1536.
- Sinawat S. Fetal exencephaly arising as a result of preimplantation exposure to ammonium chloride. *J Med Assoc Thai* 2001 Jun;84(6):821-830.
- Sociedad Española de Fertilidad. Fallo de implantación en Reproducción Asistida. 1ª ed. Madrid: Panamericana; 2013.
- Sugiura-Ogasawara M, Ozaki Y, Sato T, Suzumori N, Suzumori K. Poor prognosis of recurrent aborters with either maternal or paternal reciprocal translocations. *Fertil Steril* 2004 Feb;81(2):367-373.
- Summers MC, Biggers JD. Chemically defined media and the culture of mammalian preimplantation embryos: historical perspective and current issues. *Hum Reprod Update* 2003 Nov-Dec;9(6):557-582.

- Sutton-McDowall ML, Feil D, Robker RL, Thompson JG, Dunning KR. Utilization of endogenous fatty acid stores for energy production in bovine preimplantation embryos. *Theriogenology* 2012 May;77(8):1632-1641.
- Tesarik J, Greco E. The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. *Hum Reprod* 1999 May;14(5):1318-1323.
- Thompson JG, Kind KL, Roberts CT, Robertson SA, Robinson JS. Epigenetic risks related to assisted reproductive technologies: short- and long-term consequences for the health of children conceived through assisted reproduction technology: more reason for caution? *Hum Reprod* 2002 Nov;17(11):2783-2786.
- Thompson JG, Partridge RJ, Houghton FD, Cox CI, Leese HJ. Oxygen uptake and carbohydrate metabolism by in vitro derived bovine embryos. *J Reprod Fertil.* 1996 Mar;106(2):299-306.
- Torelló MJ. Cultivo hasta blastocisto y “Screening” genético preimplantacional: herramientas para aumentar la tasa de implantación embrionaria. *Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana* 2011;28:35.
- Tranguch S, Steuerwald N, Huet-Hudson YM. Nitric oxide synthase production and nitric oxide regulation of preimplantation embryo development. *Biol Reprod* 2003 May;68(5):1538-1544.
- Treff N., Ferry KM, Zhao T, Su J, Forman EJ, Scott RT. Cleavage stage embryo biopsy significantly impairs embryonic reproductive potential while blastocyst biopsy does not: a novel paired analysis of cotransferred biopsied and non-biopsied sibling embryos. *Fertil Steril* 2011;96(S2).
- Treff NR, Levy B, Su J, Northrop LE, Tao X, Scott RT, Jr. SNP microarray-based 24 chromosome aneuploidy screening is significantly more consistent than FISH. *Mol Hum Reprod* 2010 Aug;16(8):583-589.
- Treff NR, Su J, Tao X, Levy B, Scott RT, Jr. Accurate single cell 24 chromosome aneuploidy screening using whole genome amplification and single nucleotide polymorphism microarrays. *Fertil Steril* 2010 Nov;94(6):2017-2021.

- Treff NR, Tao X, Ferry KM, Su J, Taylor D, Scott RT, Jr. Development and validation of an accurate quantitative real-time polymerase chain reaction-based assay for human blastocyst comprehensive chromosomal aneuploidy screening. *Fertil Steril* 2012 Apr;97(4):819-824.
- Trimarchi JR, Liu L, Porterfield DM, Smith PJ, Keefe DL. A non-invasive method for measuring preimplantation embryo physiology. *Zygote* 2000 Feb;8(1):15-24.
- Turner K, Martin KL, Woodward BJ, Lenton EA, Leese HJ. Comparison of pyruvate uptake by embryos derived from conception and non-conception natural cycles. *Hum Reprod* 1994 Dec;9(12):2362-2366.
- Uyar A, Seli E. Metabolomic assessment of embryo viability. *Semin Reprod Med* 2014 Mar;32(2):141-152.
- Uyar A, Torrealday S, Seli E. Cumulus and granulosa cell markers of oocyte and embryo quality. *Fertil Steril* 2013 Mar 15;99(4):979-997.
- Vajta G, Rienzi L, Cobo A, Yovich J. Embryo culture: can we perform better than nature? 2010;4:453-469.
- Van Royen E, Mangelschots K, De Neubourg D, Valkenburg M, Van de Meerssche M, Ryckaert G, et al. Characterization of a top quality embryo, a step towards single-embryo transfer. *Hum Reprod* 1999 Sep;14(9):2345-2349.
- Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 2009 May 22;324(5930):1029-1033.
- Veeck LL. Abnormal morphology of the human oocyte and conceptus. An atlas of human gametes and conceptuses. An illustrated reference for assisted reproductive technology: The Parthenon Publishing Group Inc.; 1999.
- Vergouw CG, Botros LL, Roos P, Lens JW, Schats R, Hompes PG, et al. Metabolomic profiling by near-infrared spectroscopy as a tool to assess embryo viability: a novel, non-invasive method for embryo selection. *Hum Reprod* 2008 Jul;23(7):1499-1504.

- Vergouw CG, Kieslinger DC, Kostelijk EH, Botros LL, Schats R, Hompes PG, et al. Day 3 embryo selection by metabolomic profiling of culture medium with near-infrared spectroscopy as an adjunct to morphology: a randomized controlled trial. *Hum Reprod* 2012 Aug;27(8):2304-2311.
- Villas-Boas SG, Rasmussen S, Lane GA. Metabolomics or metabolite profiles? *Trends Biotechnol* 2005 Aug;23(8):385-386.
- Wale PL, Gardner DK. Oxygen regulates amino acid turnover and carbohydrate uptake during the preimplantation period of mouse embryo development. *Biol Reprod* 2012 Jul 26;87(1):24, 1-8.
- Wale PL, Gardner DK. Time-lapse analysis of mouse embryo development in oxygen gradients. *Reprod Biomed Online* 2010 Sep;21(3):402-410.
- Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science* 1956 Feb 24;123(3191):309-314.
- Warner CM, Lampton PW, Newmark JA, Cohen J. Symposium: innovative techniques in human embryo viability assessment. Soluble human leukocyte antigen-G and pregnancy success. *Reprod Biomed Online* 2008 Oct;17(4):470-485.
- Wiemer KE, Cohen J, Wiker SR, Malter HE, Wright G, Godke RA. Coculture of human zygotes on fetal bovine uterine fibroblasts: embryonic morphology and implantation. *Fertil Steril* 1989 Sep; 52(3):503-508.
- Will MA, Clark NA, Swain JE. Biological pH buffers in IVF: help or hindrance to success. *J Assist Reprod Genet* 2011 Aug;28(8):711-724.
- Wilton L, Williamson R, McBain J, Edgar D, Voullaire L. Birth of a healthy infant after preimplantation confirmation of euploidy by comparative genomic hybridization. *N Engl J Med* 2001 Nov 22;345(21):1537-1541.
- Wolff HS, Fredrickson JR, Walker DL, Morbeck DE. Advances in quality control: mouse embryo morphokinetics are sensitive markers of in vitro stress. *Hum Reprod* 2013 Jul;28(7):1776-1782.
- Wong CC, Loewke KE, Bossert NL, Behr B, De Jonge CJ, Baer TM, et al. Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage. *Nat Biotechnol* 2010 Oct;28(10):1115-1121.

- Wu G, Bazer FW, Davis TA, Kim SW, Li P, Marc Rhoads J, et al. Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease. *Amino Acids* 2009 May;37(1):153-168.
- Wu G, Bazer FW, Satterfield MC, Li X, Wang X, Johnson GA, et al. Impacts of arginine nutrition on embryonic and fetal development in mammals. *Amino Acids* 2013 Aug;45(2):241-256.
- Yang Z, Liu J, Collins GS, Salem SA, Liu X, Lyle SS, et al. Selection of single blastocysts for fresh transfer via standard morphology assessment alone and with array CGH for good prognosis IVF patients: results from a randomized pilot study. *Mol Cytogenet* 2012 May 2;5(1):24-8166-5-24.
- Yao YQ, Barlow DH, Sargent IL. Differential expression of alternatively spliced transcripts of HLA-G in human preimplantation embryos and inner cell masses. *J Immunol* 2005 Dec 15;175(12):8379-8385.
- Zander DL, Thompson JG, Lane M. Perturbations in mouse embryo development and viability caused by ammonium are more severe after exposure at the cleavage stages. *Biol Reprod* 2006 Feb;74(2):288-294.
- Ziebe S, Petersen K, Lindenberg S, Andersen AG, Gabrielsen A, Andersen AN. Embryo morphology or cleavage stage: how to select the best embryos for transfer after in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1997 Jul;12(7):1545-1549.