

Trabajo Fin de Grado

Facultad de Ciencias Experimentales



Grado en Química

Metabolómica aplicada en medios de cultivo embrionario mediante Resonancia Magnética Nuclear

Metabolomics applied in embryo culture medium using Nuclear Magnetic Resonance

Ana del Mar Salmerón López
Curso académico 2019-2020
Fecha 22/06/2020

Tutor/es
Dra. Ana Cristina Ralha de Abreu
Departamento de Química y Física
Dr. Miguel Ángel Vilches Ferrón
Unidad de Gestión Clínica de Laboratorios y Genética del
Hospital Universitario Torrecárdenas

**Metabolómica aplicada en medios de cultivo embrionario
mediante Resonancia Magnética Nuclear**

Memoria del Trabajo Fin de Grado en Química presentada por
Ana del Mar Salmerón López

Almería, 22 de junio de 2020

Fdo.: Ana del Mar Salmerón López

Fdo.: Dra. Ana Cristina Ralha de Abreu

Fdo.: Dr. Miguel Ángel Vilches Ferrón

Science and everyday life cannot and should not be separated

Rosalind Franklin

*La imaginación es, por excelencia, la habilidad de descubrir.
Es aquello que penetra en los mundos invisibles que nos rodean,
los mundos de la ciencia.*

Ada Lovelace

Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría agradecer la colaboración y el apoyo del Hospital Universitario Torrecárdenas, incluyendo a todos los profesionales que estuvieron a mi lado allí, y a los pacientes que participaron en este estudio, sin los que no habría sido posible la elaboración de este Trabajo de Fin de Grado.

Especialmente, querría agradecer a Ignacio Fernández De Las Nieves y a mis tutores, Ana Cristina Ralha de Abreu y Miguel Ángel Vilches Ferrón, toda la confianza, ayuda y dedicación depositados en mí a lo largo de este año.

MEMORIA

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| 1. RESUMEN..... | 3 |
| 2. ABSTRACT..... | 3 |
| 3. INTRODUCCIÓN | 5 |
| 3.1. INFERTILIDAD Y FECUNDACIÓN <i>IN VITRO</i> | 5 |
| 3.2. LA REALIDAD DE LA FECUNDACIÓN <i>IN VITRO</i> | 8 |
| 3.3. ALTERNATIVAS AL ANÁLISIS MORFOLÓGICO: LA IMPORTANCIA DE LA METABOLÓMICA EN EMBRIOLOGÍA..... | 11 |
| 3.4. METABOLÓMICA EN EMBRIOLOGÍA: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA | 15 |
| 3.5. ETAPAS DEL ESTUDIO METABOLÓMICO EN EMBRIOLOGÍA | 20 |
| 3.5.1. Muestreo y preparación de la muestra | 20 |
| 3.5.2. Adquisición de datos por métodos analíticos | 21 |
| 3.5.3. Interpretación de datos mediante quimiometría..... | 25 |
| 4. OBJETIVOS | 28 |
| 5. MÉTODOS EXPERIMENTALES..... | 28 |
| 5.1. MUESTREO Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA | 28 |
| 5.2. ADQUISICIÓN Y PROCESADO DE DATOS DE RMN | 30 |
| 5.3. ASIGNACIÓN DE METABOLITOS | 30 |
| 5.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 31 |
| 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 31 |
| 6.1. IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS MEDIANTE RMN..... | 32 |
| 6.2. APLICACIÓN DE MÉTODOS ESTADÍSTICOS..... | 36 |
| 7. CONCLUSIONES | 41 |
| 8. BIBLIOGRAFÍA | 42 |
| ANEXOS | 47 |
| ANEXO 1: INFORMACIÓN OBTENIDA EN LA REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA | |

1. RESUMEN

El uso de la metabolómica como herramienta de detección de biomarcadores de viabilidad embrionaria ha despertado un gran interés en el campo de la embriología, ya que podría incrementar el éxito de la Fecundación *In Vitro* (FIV). Este Trabajo de Fin de Grado engloba (1) la realización de una revisión bibliográfica de las principales investigaciones dedicadas a dicho fin, y (2) el uso de la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) combinada con métodos de análisis multivariante de datos para la obtención y correlación de perfiles metabólicos de 73 muestras de medios de cultivo embrionario con datos de viabilidad y calidad embrionaria.

Palabras clave: *Metabolómica, RMN, preembrión, Fecundación In Vitro (FIV), análisis multivariante.*

2. ABSTRACT

The use of metabolomics as a tool for detecting biomarkers of embryo viability has aroused great interest in the embryology field, since it could help increasing the implantation rates of *In Vitro* Fertilization (IVF). This dissertation consisted in (1) a bibliographic review where some of the main investigations about this topic were chronologically analyzed, and (2) in the application of a Nuclear Magnetic Resonance (NMR)-based metabolomic approach coupled to multivariate data analysis techniques to obtain and correlate the metabolic profile of 73 embryo culture medium samples with embryo viability and quality.

Keywords: *Metabolomics, NMR, preembryo, In Vitro Fertilization (IVF), multivariate analysis*

3. INTRODUCCIÓN

3.1. INFERTILIDAD Y FECUNDACIÓN *IN VITRO*

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), la infertilidad es una enfermedad del sistema reproductivo definida como la incapacidad de lograr un embarazo clínico tras 12 meses o más de relaciones sexuales no protegidas. Puede llegar a tener un impacto psicológico grave en los pacientes afectados, frecuentemente diagnosticados con depresión y/o ansiedad, entre otros padecimientos, y aunque no es un aspecto vital para la persona, sí que lo es para la especie humana, y ocupa un espacio importante en la sociedad.

El porcentaje de infertilidad varía según cada estudio, pero la mayoría de los estudios realizados coinciden en que la infertilidad en países desarrollados afecta a menos del 20% de parejas, siendo un porcentaje estable desde comienzos del siglo XX, sin apenas variación en los últimos veinte años. Esta tendencia, se ve confirmada por un estudio publicado por la OMS en 2012, que indicó que los datos asociados a la infertilidad en 190 países distintos permanecieron constantes desde 1990 hasta 2010.¹ Generalmente las tasas de infertilidad en los estudios se refieren al factor femenino, sin embargo, cabe recordar que deben valorarse simultáneamente tanto éste como el masculino, ya que las causas pueden ser: 20-35% causa femenina, 20-30% causa masculina, 25-40% causa mixta y 10-20% causa desconocida.^{2,3}

Desde hace años está observándose un incremento de la infertilidad a nivel global, y, de hecho, la OMS declaró en 2018 que 50 millones de parejas sufrían esta condición en todo el mundo, de las cuales 800000 residían en España. Este aumento es en parte un resultado de la forma de vida actual, ya que vivimos en una sociedad cada vez más estresada y con hábitos de vida poco saludables, como el consumo excesivo de alcohol, el tabaquismo, o el sedentarismo, factores que pueden dañar irreversiblemente a las células reproductivas. Además, la edad media de las mujeres que deciden quedarse embarazadas es cada vez más alta, situándose la búsqueda del primer hijo en un valor medio de 32 años actualmente, y, por lo tanto, disminuyendo su capacidad reproductiva, ya que, a medida que aumenta la edad de la mujer existe una disminución en su capacidad ovárica, así como un aumento de la probabilidad de alteraciones genéticas en la descendencia.⁴ Podemos observar en la **Figura 1** el incremento en la edad media de las mujeres que quedan embarazadas desde 1990 hasta 2018.

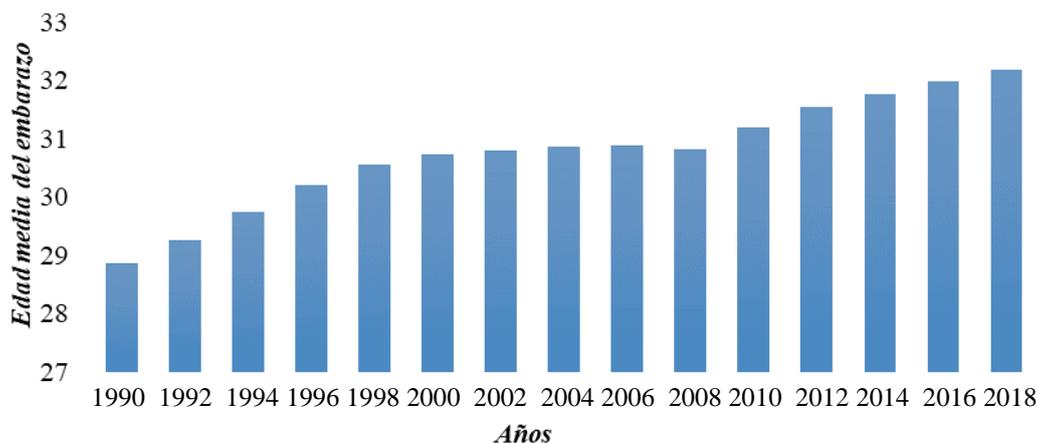
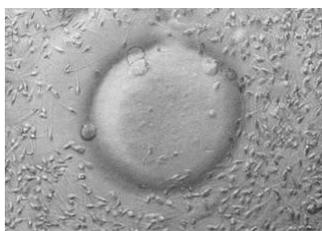


Figura 1. Gráfica del INE que ilustra el incremento en la edad media de las mujeres que quedan embarazadas desde 1990 hasta 2018.⁵

Actualmente, existen diversas técnicas y métodos biomédicos de Reproducción Asistida que facilitan o tratan de resolver algunos de los problemas asociados a la infertilidad. Esta rama de la medicina destacó en sus inicios con la técnica de Fecundación *In Vitro* (FIV), que consiste en generar preembriones en una placa de Petri en condiciones adecuadas, poniendo en contacto los gametos masculinos y femeninos. Desde el nacimiento de Louise Brown en 1978, la técnica FIV ha ido adoptando cada vez más popularidad, sumando en 2018 más de 8 millones de niños nacidos en todo el mundo.⁶ Por otro lado, debido a que la calidad espermática ha ido evolucionando a lo largo de los años a peores parámetros, la FIV convencional no resolvía la necesidad de concebir en pacientes con alteraciones espermáticas graves (por ejemplo, la oligozoospermia o la astenozoospermia) y, por ello, en la primera década de los años noventa, apareció la técnica de Reproducción Asistida denominada Microinyección Espermática (ICSI).⁷⁻⁹ En la **Figura 2**, podemos observar imágenes provenientes de una FIV convencional y de una ICSI.



1



2

Figura 2. Imágenes de una Fecundación *In Vitro* convencional (1),¹¹ y de una Microinyección Espermática (2).¹²

Los parámetros dictados por la OMS en 2010 a tener en cuenta para valorar la calidad seminal son los siguientes:¹⁰

- (1) Valor del pH. Debe encontrarse entre 7.2 y 8.0.
- (2) Volumen. Por encima de 1.5 mL de esperma son valores normales.
- (3) Concentración. El valor normal es superior a 15 millones de espermatozoides/mL de esperma.
- (4) Cantidad de espermatozoides. La cantidad debe ser de al menos 39 millones/eyaculación.
- (5) Movilidad espermática. Al menos el 40% de los espermatozoides de la muestra debe tener movilidad, y el 32% debe moverse progresivamente, es decir, avanzando hacia el óvulo.
- (6) Morfología. Se considera adecuada una muestra con más del 4% de los espermatozoides con una morfología normal. Para que un espermatozoide sea considerado morfológicamente normal debe presentar una cabeza lisa, de contorno regular y de forma ovalada, y, mientras que la zona correspondiente al núcleo no debe presentar vacuolas, la del acrosoma debe contener como máximo dos que no ocupen un espacio superior al 20% de la cabeza. La pieza intermedia del espermatozoide debe ser esbelta, regular y tener la misma longitud que la cabeza. Por último, la pieza principal debe ser uniforme, de unos 45 μm de longitud, más estrecha que la pieza intermedia, y debe encontrarse enroscada sobre sí misma, indicando que no exista ningún indicio de ruptura del flagelo.

- (7) Vitalidad. Un 58% o más de los espermatozoides de la muestra deben estar vivos.
- (8) Leucocitos. Muestras con más de 1 millón de leucocitos/mL suelen indicar infección, que puede afectar a la calidad seminal.

El proceso de FIV comienza con la estimulación ovárica controlada del paciente con el objetivo de desarrollar los folículos, y prosigue con la extracción de los ovocitos mediante una punción folicular controlada ecográficamente. Posteriormente, los ovocitos se fecundan en el laboratorio con el semen de la pareja (o de donante anónimo), el cual es previamente evaluado, y si el proceso ha sido satisfactorio los ovocitos fecundados inician el proceso de división celular. Este ciclo dura entre 5 y 6 días, es decir, hasta que el preembrión llega al *estadio de blastocisto*, momento en el cual presenta un alto grado de diferenciación celular, elevado potencial de implantación, y, en consecuencia, de embarazo. Finalmente, el preembrión que cumple los requisitos necesarios de calidad es transferido al útero del paciente. Si quedan preembiones restantes sin transferir, se criopreservan para un posible uso futuro.¹³ En la **Figura 3**, se pueden observar los distintos estados celulares en función del día en un ciclo embrionario, y en los que tienen lugar distintos cambios metabólicos.



Figura 3. Imágenes obtenidas del cuaderno de Criterios ASEBIR de Valoración Morfológica de Oocitos, Embriones Tempranos y Blastocistos Humanos.¹⁴ Se observan los cambios a lo largo de los días D+1 (1), D+2 (2), D+3 (3), D+4 (mórula, 4) y D+5-6 (blastocisto formado, 5).

Según distintas investigaciones, en el día 5 (D+5) se observa un porcentaje de implantación superior al de cualquier otro día del ciclo embrionario, sin embargo, la transferencia embrionaria suele realizarse en el día 3 (D+3), es decir, a las 72 horas desde la punción folicular. Esto es debido a que cuanto más tiempo pase el preembrión en cultivo en el laboratorio más riesgo existe de que se detenga su desarrollo, por lo que la transferencia en ese día puede ser aconsejable para pacientes los cuales no disponen de una gran cantidad de preembiones. Por otro lado, la transferencia puede llegar a ser prolongada hasta el D+5 o D+6 en pacientes con mayor número de preembiones, asegurándose así el aporte de los nutrientes necesarios en el medio hasta alcanzar el *estadio de blastocisto*, y optimizándose la selección.¹⁵⁻¹⁷ En la **Tabla 1** se pueden observar las tasas de embarazo en función del día de transferencia de un estudio realizado por Neri-Vidaurre *et al.* (2018).¹⁸

Tabla 1. Tasas de embarazo en función del día de transferencia. Obtenida de Neri-Vidaurre *et al.* (2018).¹⁸

| Día de transferencia | Tasa de transferencias | Edad | Embriones transferidos | Tasa de embarazo |
|----------------------|------------------------|------------|------------------------|------------------|
| D+3 | 205 | 36.6 ± 4.6 | 3.0 ± 0.7 | 30.2% |
| D+4 | 62 | 36.8 ± 4.4 | 2.4 ± 0.5 | 40.3% |
| D+5 | 39 | 35.4 ± 4.6 | 2.2 ± 0.4 | 41.0% |

3.2. LA REALIDAD DE LA FECUNDACIÓN *IN VITRO*

Según la ESHRE (*European Society of Human Reproduction and Embryology*) Europa encabeza la lista de continentes en los que se realizan tratamientos de Reproducción Asistida, en concreto un 50% de todos los ciclos descritos tuvieron su origen en 2018, y según un estudio realizado en 2014, España fue el país líder en Europa con más de 100000 tratamientos realizados, seguido por Francia con 90000 ciclos y Alemania con 80000 ciclos.¹⁹

Durante muchos años, una de las preocupaciones principales de someterse al tratamiento de FIV han sido los embarazos múltiples, los cuales presentan un claro riesgo de salud tanto para la madre, por el riesgo a hemorragias postparto e hipertensión, como para los recién nacidos, ya que se dice que la tasa de mortalidad infantil aumenta 5 veces en gemelos, y hasta 17 veces en trillizos o gestaciones de mayor número. Además, la posibilidad de una discapacidad permanente (como una parálisis cerebral) aumenta 8 veces en gemelos, y 47 veces en trillizos.²⁰ Sin embargo, se está observando una notable disminución de la tasa de embarazo múltiple en Europa, que ha decrecido desde el año 2000, con un 26.9%, hasta un 17.5% en 2014. Esto puede justificarse en gran medida en base a que se ha regulado en varios países el número de embriones transferidos por ciclo.¹⁸ Por ejemplo, en España, el número máximo es de 3 según la *Ley 14/2006 del 26 de mayo sobre Técnicas de Reproducción Asistida*,²¹ aunque se recomienda generalmente la transferencia de 1 o 2, dependiendo del caso clínico.

Una de las causas por las que Europa encabeza la lista de continentes en los que se realizan tratamientos de Reproducción Asistida puede ser por el precio que presenta, que varía entre 4000-5000 €, mientras que, en otros países como Estados Unidos, estos procesos están considerados un lujo. Como prueba de ello, la ESHRE publicó en 2014 que un único ciclo en el mercado privado en EEUU podía tener el coste de 12400\$, lo que posiblemente provoca que las parejas busquen realizar un número mínimo de ciclos, transfiriendo más de un preembrión en cada uno, y dando lugar a un mayor riesgo de embarazo múltiple.²²

En 2017, el registro de la Sociedad Española de Fertilidad (SEF) describió 27351 transferencias en ese año, de las cuales el 37.2% fueron de un único embrión, el 60.3% de dos, y el 2.5% de tres, como puede apreciarse en la **Tabla 2**. Además, también se pueden observar cómo las gestaciones de un único embrión, en los tres casos, fueron mucho más favorables que las de 2 o de las de 3.²³

Tabla 2. Obtenida del Registro de la SEF en 2017.²³

| | 1 embrión transferido | 2 embriones transferidos | 3 embriones transferidos | Total |
|--|------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|-------------------|
| Total de transferencias | 10165 (37.2%) | 16492 (60.3%) | 694 (2.5%) | 27351 (100.0%) |
| Total de transferencias efectivas | 4651 (45.8%) | 8821 (53.5%) | - | 13472 (49.3%) |
| Gestaciones con 1 saco | 2990 (98.8%) | 4946 (76.4%) | 165 (77.5%) | 8101 (83.4%) |
| Gestaciones con 2 sacos | 36 (1.2%) | 1514 (23.4%) | 38 (17.8%) | 1588 (16.4%) |
| Gestaciones con >3 sacos | 0 (0.0%) | 11 (0.2%) | 10 (4.7%) | 21 (0.2%) |
| Total de gestaciones | 3026 (100.0%) | 6471 (100.0%) | 213 (100.0%) | 9710 (100.0%) |
| % implantación | 29.8% | 24.2% | 13.0% | 25.0% |
| % gestación por transferencia | 29.8% | 39.2% | 30.7% | 35.5% |
| Partos de feto único | 2144 (98.6%) | 3752 (77.9%) | 104 (79.4%) | 6000 (84.2%) |
| Partos gemelares | 30 (1.4%) | 1059 (22.0%) | 27 (20.6%) | 1116 (15.7%) |
| Partos triples o más | 0 (0.0%) | 6 (0.1%) | 0 (0.0%) | 6 (0.1%) |
| Total de partos | 2174 (100.0%) | 4817 (100.0%) | 131 (100.0%) | 7122 (100.0%) |

Aunque la FIV es un proceso muy extendido y empleado hoy en día, se dice que dos de cada tres ciclos fallan en dar un embarazo, y que ocho de cada diez embriones, no consigue implantarse, por lo que no debe ignorarse la baja tasa de implantación exitosa que presenta, la cual ronda el 30%. De hecho, como se deduce de la **Tabla 2**, en 2017, en España, de 27351 transferencias realizadas sólo tuvieron éxito 7122, lo que representa un 26.0%. Según la SEF, algunos de los factores que pueden llegar a influir en el éxito o fracaso de un ciclo de FIV son:²⁴

- (1) La edad de la mujer o su peso.
- (2) Antecedentes obstétricos.
- (3) El número de ciclos previos, que, aunque en sí no influyen, sí que lo hace el paso del tiempo, y, por lo tanto, el aumento de la edad.

- (4) Factores tóxicos, como el tabaco, consumo habitual de café, estrés o sedentarismo.
- (5) Los controles de calidad del laboratorio, los cuales son fundamentales, ya que debe tratarse de un espacio prácticamente estéril, debido a la alta sensibilidad de los embriones.
- (6) La evaluación actual de la calidad embrionaria.

Este último punto, se considera uno de los factores más influyentes en el éxito o el fracaso del ciclo, ya que actualmente se basa en una serie de parámetros morfológicos que no son realmente eficaces. Dicha evaluación es desempeñada por un biólogo clínico que, mediante la observación de posibles alteraciones citoplasmáticas y de agregaciones de algunos orgánulos, entre otros aspectos, determina el nivel de calidad del embrión en función de la etapa del ciclo en la que se encuentre. Por ejemplo, en D+2 y D+3, los parámetros a tener en cuenta son el ritmo de división celular, el porcentaje de fragmentación, el estado de la zona pelúcida, la multinucleación, la simetría y la presencia de vacuolas, en D+4 se evalúan la división y la adhesión celular, la compactación, la fragmentación y la vacuolización, y en D+5 y D+6 se examinan el blastocele, la zona pelúcida, la masa celular interna (MCI) y el trofooctodermo (TE) polar y mural.

Una vez analizadas todas estas características, los embriones son clasificados en distintas categorías. En España, uno de los sistemas de graduación embrionaria más empleado actualmente es el ASEBIR (Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción),¹⁴ el cual se divide en cinco categorías en función del potencial implantatorio esperado:

- (1) Categoría A. Se trata de embriones de máxima calidad, con una tasa de implantación muy alta.
- (2) Categoría B. Son embriones de buena calidad, y con alta tasa de implantación.
- (3) Categoría C. Estos embriones presentan una calidad intermedia, y una tasa de implantación media.
- (4) Categoría D. Son embriones con una mala calidad, y una baja tasa de implantación.
- (5) Categoría E. Son aquellos embriones que se bloquearon en el desarrollo o que degeneraron.

Aunque ha conseguido mejorar las tasas de implantación y de embarazo, el sistema ASEBIR no es lo suficientemente preciso, bajo el criterio de la mayoría de profesionales y de los distintos resultados obtenidos hasta la fecha, ya que no permite predecir correctamente la viabilidad embrionaria, y, en definitiva, se trata de una de las principales causas de la baja tasa de éxito en Reproducción Asistida Humana.²⁵ Actualmente, los investigadores especializados en esta materia se encuentran centrados en evolucionar esta forma de evaluación de la calidad embrionaria hacia otros tipos de estudios, con o sin estos parámetros, y son de gran proyección en técnicas no invasivas y no destructivas, como la espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

3.3. ALTERNATIVAS AL ANÁLISIS MORFOLÓGICO: LA IMPORTANCIA DE LA METABOLÓMICA EN EMBRIOLOGÍA

Como se ha mencionado en el punto anterior, los parámetros morfológicos se encuentran demasiado limitados como para dar un resultado totalmente fiable de viabilidad embrionaria de modo exclusivo, por lo que, en los últimos tiempos, se ha investigado sobre la aplicación de métodos no invasivos que podrían resultar prometedores en la evaluación de viabilidad y calidad embrionaria.

En general, dichos estudios se han centrado en distintas ciencias ómicas tales como la genómica, la proteómica, la transcriptómica, y la metabolómica (**Figura 4**), las cuales han aportado distintas aplicaciones en el campo de la biotecnología mediante el análisis de la funcionalidad celular y un considerable progreso en el desarrollo de cuestiones biológicas básicas. Por un lado, la genómica es la ciencia que se encarga del estudio del conjunto de genes en un determinado sistema biológico, es decir, que trata de comprender la información que nos aporta el ADN contenido en el genoma completo; la transcriptómica analiza el conjunto de ARN existente en una célula, tejido u órgano; la proteómica por su parte, estudia las proteínas y las modificaciones post-transcripcionales que las regulan; y la metabolómica es la disciplina que identifica y cuantifica el metaboloma constituido por los distintos metabolitos de bajo peso molecular involucrados en el sistema biológico objeto de estudio, lo que permite obtener una visión del estado metabólico de un organismo y por lo tanto, obtener información sobre la actividad celular.²⁶

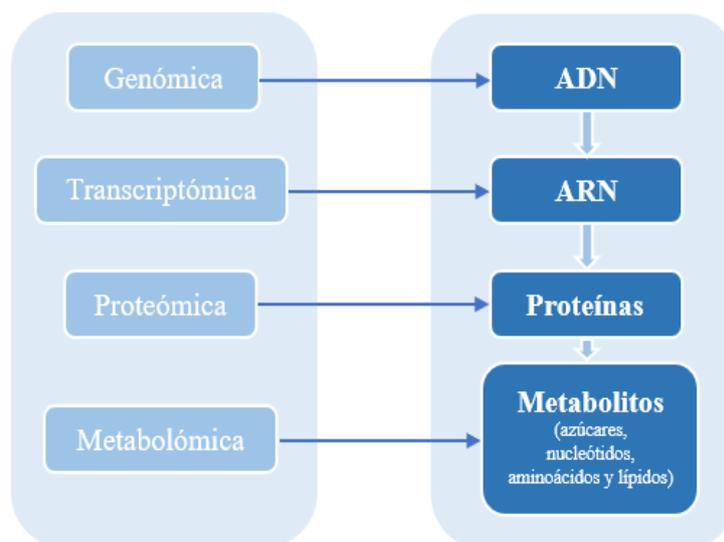


Figura 4. Esquema que engloba a las ciencias ómicas y sus objetos de estudio.²⁷

Gracias a la información que nos ofrece cada una, las ciencias ómicas están adoptando cada vez mayor relevancia en el ámbito sanitario, a medida que los avances tecnológicos progresan, permitiendo la realización de diagnósticos personalizados más tempranos a los pacientes e incluso previniendo el desarrollo de enfermedades gracias a la formación de equipos multidisciplinares, que ayudan a la interpretación de la ingente cantidad de datos que estas disciplinas generan.

Aunque la metabolómica suele considerarse un “análisis complementario” a las demás, posee distintas ventajas que hacen que sea una opción viable en

investigaciones enfocadas en la mejora de los parámetros de selección embrionaria. A continuación, se resumen estas ventajas:

- (1) El número de metabolitos obtenidos es inferior al de genes y proteínas, por lo que la complejidad final de los datos es menor.
- (2) Los metabolitos obtenidos al final de la expresión génica reflejan el nivel funcional de una célula más adecuadamente.
- (3) Los ciclos metabólicos, además de estar regulados por la expresión génica, también se encuentran influenciados por el estrés ambiental, por lo que la identificación y cuantificación de estos metabolitos finales es más apropiada.
- (4) Aunque la concentración de los flujos metabólicos no cambie demasiado a lo largo de una reacción bioquímica, la concentración de los metabolitos finales sí puede hacerlo.

Desde hace un par de décadas, diversos estudios basados en la metabolómica han sido aplicados en el área de la embriología al tratarse, en el caso de la RMN, de una técnica no destructiva y no invasiva que puede ofrecer la posibilidad de correlacionar los diferentes metabolitos presentes en el medio con la viabilidad embrionaria, con o sin ayuda de los parámetros morfológicos. Debido a la alta complejidad del metaboloma, que presenta una gran variedad de moléculas pequeñas (< 1 kDa) con distintos pesos, polaridades, grupos funcionales, estabilidades y reactividades, se puede hacer uso de plataformas analíticas avanzadas, tales como la RMN, la espectrometría de masas (MS), o incluso la combinación de ellas.²⁸⁻³⁰

Estudios recientes han analizado diversos biofluidos relacionados con el preembrión para la obtención de biomarcadores de viabilidad embrionaria, entre los que se encuentran el fluido folicular, el medio embrionario empleado, el endometrio, la mucosa cervical, el tejido ovárico, y el plasma sanguíneo. Como mencionan Bracewell-Milnes *et al.* (2017), se ha logrado extraer una gran cantidad de información gracias a los análisis metabolómicos centrados en el medio de cultivo mediante la identificación de metabolitos discriminantes, sin embargo, aquellos dirigidos al análisis de fluido folicular y de plasma sanguíneo no han logrado, hasta el momento, hallar ningún metabolito diferenciado.³¹

Mediante la búsqueda de palabras clave “*metabolomic profile*” y “*embryo*” en *Web Of Science*,³² seleccionando la base de datos *Web Of Science Core Collection*, y su posterior análisis en el programa *CitNetExplorer*, se obtiene una red de citas (**Figura 5**) constituida por un total de 105 contribuciones de tipo artículo, revisión y capítulo de libro.³³ Así, se pueden observar las publicaciones marcadas en color morado, azul y verde como aquellas más citadas, publicadas en 2004, 2007 y 2008, respectivamente, y que por tanto representan mayor número de conexiones con otras publicaciones anteriores y posteriores. Estas tres publicaciones se corresponden con las contribuciones de Brison *et al.*³⁴, Seli *et al.*³⁵, y Scott *et al.*³⁶, con un número de citas de 34, 38 y 30, respectivamente. Las contribuciones de Seli *et al.* y de Scott *et al.* se basan en la aplicación de la espectroscopía Raman como técnica no invasiva aplicada en la predicción de implantación embrionaria, tema muy relacionado con el presente Trabajo de Fin de Grado. Del análisis del conjunto de datos también se pueden deducir los países que más aportan a la investigación en esta disciplina.

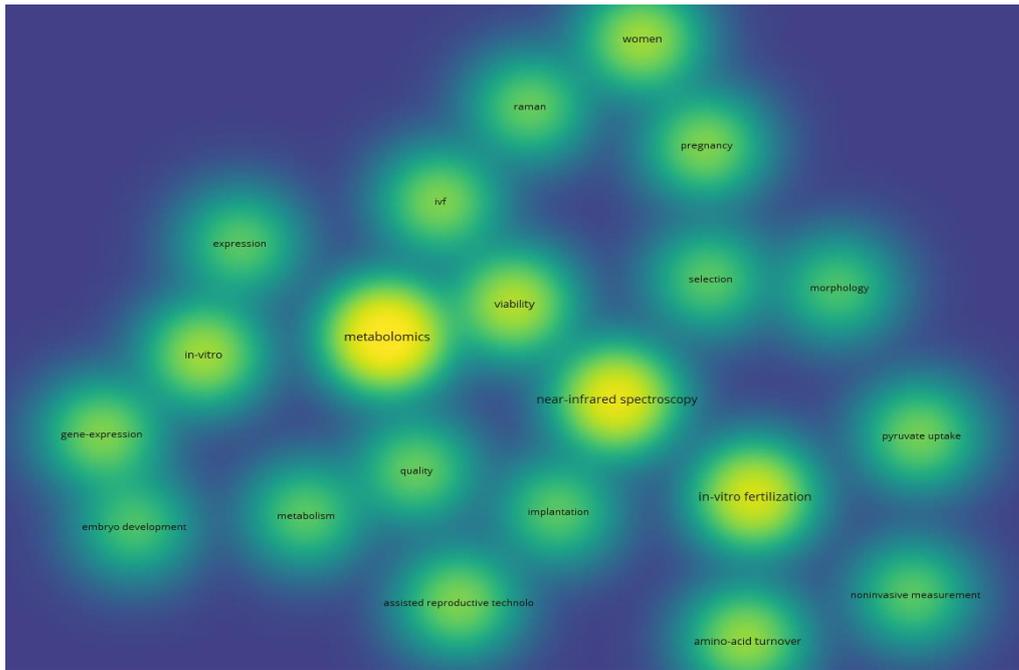


Figura 7. Mapa de densidad obtenido con las palabras clave que más contribuciones presentan en común obtenido de ISI *Web Of Knowledge* mediante una búsqueda de las palabras “*metabolomic profile*” y “*embryo*”.

En la **Figura 8**, obtenida de la misma base de datos *Web Of Science*, pero en esta ocasión generada a partir del set de publicaciones obtenida mediante la búsqueda “*NMR*” y “*metabolomics*”, se muestra la evolución de los 5243 resultados, ordenados de forma cronológica desde el año 2001 hasta la actualidad. El desarrollo y la mejora de las técnicas analíticas en estos últimos años, en especial con el desarrollo de las criosondas, que han permitido aumentar la sensibilidad de la RMN hasta en un factor cinco, han conseguido que la metabolómica sea un campo de investigación cada vez más aplicado, tal y como lo ilustra la tendencia ascendente de la gráfica a lo largo de los años.

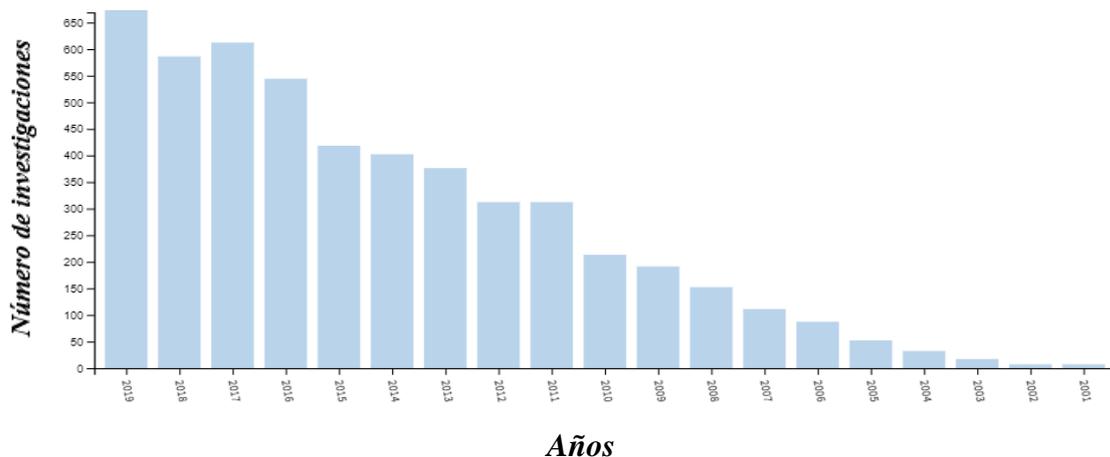


Figura 8. Avance de las investigaciones basadas en RMN y metabolómica desde el año 2001 hasta la actualidad. Obtenida de ISI *Web of Knowledge* introduciendo las palabras “*NMR*” y “*metabolomics*”.

Además, mediante un análisis sobre los temas en los que se agrupan estas 5243 investigaciones, podemos ver reflejada la aceptación que ha adquirido en el ámbito de la bioquímica y de la salud en general (**Figura 9**). Es interesante mencionar que el segundo bloque con mayor número de publicaciones se corresponde con la química analítica, lo que supone el gran impacto que en los últimos años han tenido las técnicas instrumentales y en particular la espectroscopía de RMN en la metabólica en general.

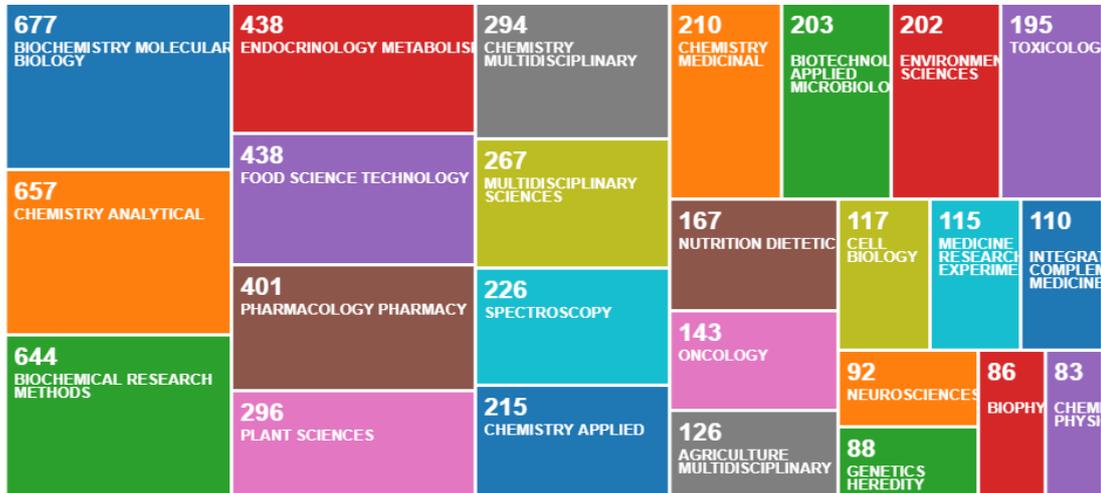


Figura 9. Diagrama de bloques distribuidos por áreas de investigación obtenido de *ISI Web of Knowledge* introduciendo las palabras “NMR” y “metabolomics”.

3.4. METABOLÓMICA EN EMBRIOLOGÍA: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

En esta sección, se llevó a cabo una revisión bibliográfica sobre las principales investigaciones dedicadas al estudio de los cambios metabólicos producidos en medios de cultivo embrionario con el objetivo de mejorar los parámetros de selección embrionaria en FIV.

Hardy *et al.*³⁸ (1989) llevaron a cabo una de las primeras investigaciones sobre metabolismo embrionario *in vitro*. La **Figura 5** muestra esta contribución como una de las pioneras, con un total de 15 citaciones, y a partir de la cual se construye toda una red de conectividad. En ella analizaron el consumo de piruvato y glucosa en el medio de cultivo de 73 ovocitos humanos y embriones preimplantatorios, mediante un ensayo de ultramicrofluorescencia. Este estudio concluyó que los preembriones que llegaron al *estadio de blastocisto* presentaron un mayor consumo de piruvato hasta el cuarto día, y a partir del quinto, se mantenía el mayor consumo de piruvato, pero también se producía un aumento en el consumo de glucosa. El equipo de Gott *et al.*³⁹ (1990) llevó a cabo un estudio similar partiendo de 40 preembriones *in vitro* empleando la misma técnica (ultramicrofluorescencia), y observó que, además de un mayor consumo de piruvato y glucosa, se registraba un mayor contenido en lactato (del D+3 al D+5). Conaghan *et al.*⁴⁰ (1993) realizaron un estudio en el que correlacionaron el consumo de piruvato con la implantación y el embarazo clínico. Al contrario que en las investigaciones anteriores, observaron que la implantación era inversamente proporcional al consumo de piruvato en preembriones de D+2 y D+3, aunque debe puntualizarse que este estudio se centró en la correlación con la implantación, y no con la formación de blastocistos. Estas tres publicaciones de encuentran marcadas en naranja en la **Figura 5**.

Unos años más tarde, en 2001, el equipo de Gardner *et al.*⁴¹ llevó a cabo un nuevo estudio empleando ultramicrofluorescencia sobre la correlación de los cambios en el metabolismo de embriones preimplantatorios en el D+4 del ciclo con el grado de calidad de cada uno (asignado mediante morfología). Este estudio permitió observar que el consumo de glucosa en el D+4 es mayor en preembriones de mejor calidad, mientras que el consumo de piruvato es indiferente a la calidad morfológica, por lo que se concluyó que la glucosa poseía una mayor relevancia que el piruvato en el desarrollo embrionario, y, por lo tanto, se le debería prestar una atención especial a la hora de establecer la calidad embrionaria para la realización de transferencias al útero de la paciente. Al mismo tiempo se realizó un seguimiento de la concentración de amonio, y se estableció que, tras haber detectado altas cantidades de este compuesto, una cuantificación de su producción podría ser útil para determinar la viabilidad embrionaria.

El consumo o la producción de aminoácidos, se convirtió en un punto importante en esta clase de estudios, ya que se observó que al añadir al medio de cultivo aminoácidos esenciales y no esenciales los preembriones experimentaban un mejor desarrollo hasta la etapa de blastocisto. Por esta razón, Houghton *et al.*⁴² (2002) realizaron un estudio empleando HPLC para establecer el balance entre consumo y producción de aminoácidos en el medio de cultivo embrionario a lo largo del ciclo, y llegaron a la conclusión de que una relación consumo/producción baja correlacionaba con un mejor desarrollo embrionario. En concreto, determinaron que un desarrollo adecuado a blastocisto estaba correlacionado, en D+2, con un consumo bajo de glutamina, arginina y metionina, y una producción baja de alanina y asparagina y que, en D+3, la correlación se establecía con un consumo bajo de serina y una producción baja de alanina y glicina. Dos años después, en 2004,³⁴ el mismo equipo reforzó su teoría correlacionando la relación consumo/producción de aminoácidos de preembriones seleccionados morfológicamente en D+2 del ciclo con una implantación adecuada y embarazo clínico. Concretamente, observaron que bajos niveles de glicina y leucina y mayores niveles de asparagina correlacionaban con una mayor tasa de embarazos clínicos y de recién nacido vivos.

Seguidamente, el grupo de Seli *et al.*³⁵ (2007) llevó a cabo el primer estudio metabolómico empleando simultáneamente Raman y NIR para comprobar la posible correlación entre los metabolitos y la viabilidad embrionaria, llegando a determinar que los índices de viabilidad eran mayores en preembriones que implantaban (y que daban finalmente un embarazo clínico) que los que no, aunque no encontraron biomarcadores específicos. Vergouw *et al.*⁴³ (2008) emplearon la espectroscopía NIR para realizar perfiles metabolómicos sobre los medios de cultivo en D+2 y D+3 del ciclo *in vitro*, encontrando una correlación entre los datos obtenidos por NIR con el potencial reproductivo del embrión preimplantatorio. Por otro lado, Scott *et al.*³⁶ (2008) también llevaron a cabo investigaciones con el mismo objetivo, pero empleando la espectroscopía Raman. Para ello, analizaron muestras en D+3 y D+5, y determinaron que aquellas con un potencial reproductivo mayor, correlacionaban con un índice de viabilidad superior.

El equipo de Seli *et al.*²⁰ volvió a realizar un estudio en 2008 con muestras de medio preembrionario en D+3 del ciclo, empleando esta vez espectroscopía ¹H-RMN, con el objetivo de identificar por primera vez biomarcadores de viabilidad, y determinaron que las cantidades de glutamato junto a la ratio alanina/lactato eran superiores en preembriones que implantaron adecuadamente y derivaron en embarazo. Las citaciones que los trabajos de Seli *et al.* de 2007³⁵ y 2008²⁰ con

prácticamente la mayoría de las contribuciones más relevantes en esta disciplina se muestra en la **Figura 10** y en la **Figura 11**. Este mismo equipo volvió a realizar un estudio en 2010⁴⁴ con muestras de cultivo en D+3 mediante NIR, con la finalidad de hallar una posible relación entre el perfil metabólico del medio de cultivo con el reproductivo, llegando a la conclusión de que no hay relación entre los parámetros de selección morfológica y el perfil metabólico, y de que sí existe relación entre el perfil metabólico y el potencial de implantación. Es interesante destacar que esta contribución de 2010 no cita a la contribución de 2008 y sólo referencia a la publicada en 2007 (**Figura 11**).

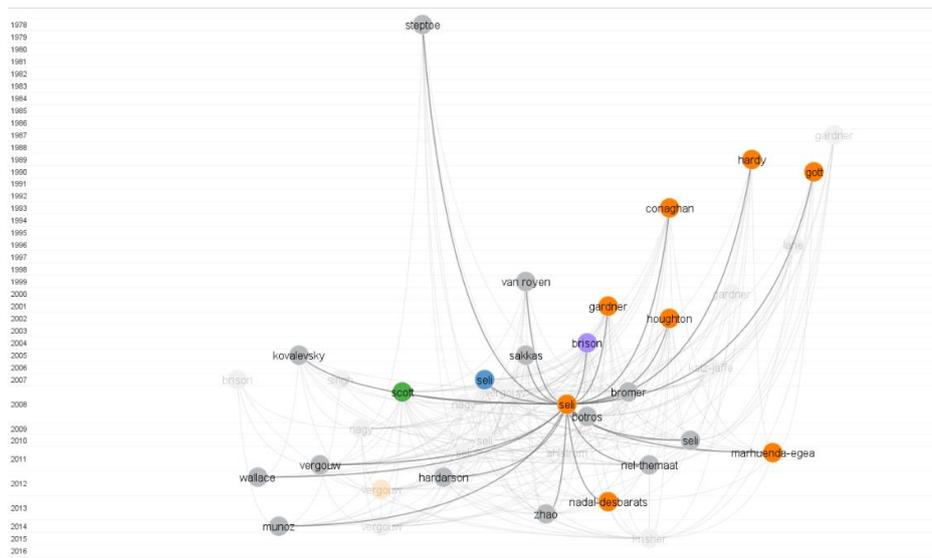


Figura 10. Conectividades observadas en el mapa de citaciones de *CitNetExplorer* (ver **Figura 5** para mapa completo) del trabajo de Seli *et al.* (2008).²⁰

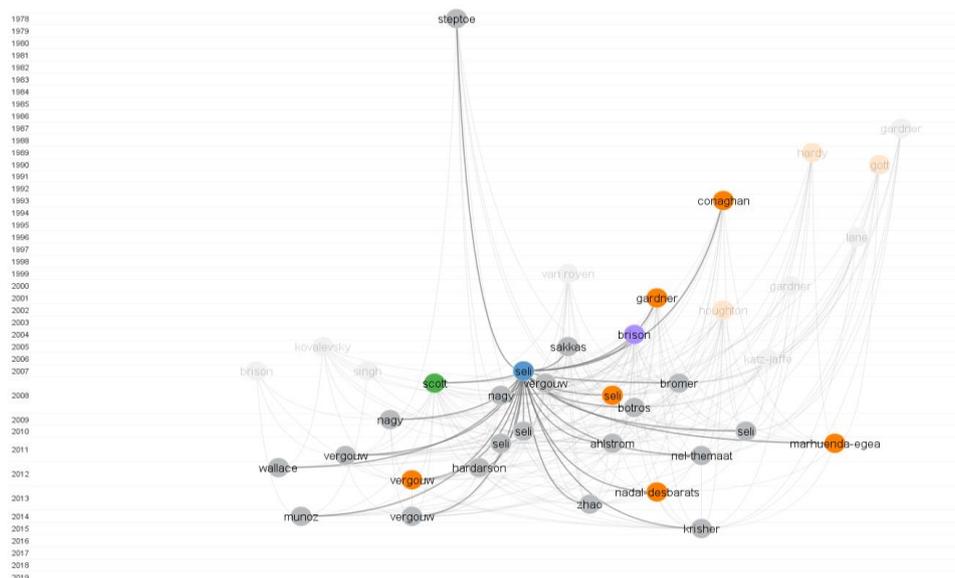


Figura 11. Conectividades observadas en el mapa de citaciones de *CitNetExplorer* (ver **Figura 5** para mapa completo) del trabajo de Seli *et al.* (2007).³⁵

Seguidamente, Ahlström *et al.*⁴⁵ (2011) en base a los datos que Seli *et al.* (2010)⁴⁴ obtuvieron, realizaron el mismo estudio, pero en D+5 del ciclo embrionario, obteniendo una correlación positiva entre la viabilidad y la tasa de implantación.

El grupo de Marhuenda-Egea *et al.*⁴⁶ (2011) analizó los aminoácidos de muestras de medio de cultivo embrionario en D+3 mediante HPLC-MS y HPLC-MS/MS y realizó perfiles metabolómicos mediante ¹H-RMN. Determinaron que existen diferencias metabólicas entre los preembriones que resultaron en embarazo clínico respecto a los que no, por lo que concluyen que los aminoácidos tienen un papel importante en el metabolismo embrionario. También observaron una buena correlación de la tasa de implantación con la zona lipídica de los espectros de ¹H-RMN, por lo que el rol de los lípidos podría adquirir importancia en futuras investigaciones dedicadas al análisis metabolómico del medio de cultivo embrionario.

En 2012, Vergouw *et al.*⁴⁷ llevaron a cabo un nuevo estudio empleando NIR, esta vez centrándose en el D+3 con el objetivo de determinar la posible relación entre los perfiles metabolómicos y las tasas de implantación, y comprobar de este modo si los perfiles junto a los parámetros morfológicos podían mejorar la selección embrionaria. No obstante, concluyen que los perfiles metabolómicos mediante NIR no permiten mejorar la selección embrionaria, en comparación a cuando se emplean sólo los criterios morfológicos.

Pudakalakatti *et al.*⁸ (2013) analizaron mediante ¹H-RMN muestras de cultivo embrionario en D+2 y D+3, y concluyen que los preembriones que implantaron con éxito en D+3 presentaban una baja relación piruvato/alanina. Rinaudo *et al.*⁴⁸, en 2012, realizaron otro estudio similar mediante ¹H-RMN empleando muestras en D+3 del ciclo embrionario. En este caso, no se encontró ninguna diferencia significativa entre los perfiles metabólicos de medios de cultivo de preembriones que implantaron y de los que no lo hicieron, por lo que no se determinó ninguna correlación.

Sfontouris *et al.*⁴⁹ (2013) analizaron muestras de medios de cultivo de preembriones en D+2, D+3 y D+5, con la intención de poner a prueba un instrumento de predicción de viabilidad embrionaria basado en análisis metabolómico mediante NIR, comparando sus resultados con los de los parámetros morfológicos. Como conclusión, no observaron ninguna mejora, aunque sí evidenciaron una mejora de la tasa de implantación en D+5. También se mencionó que estas conclusiones no eran sólidas, y que habían incluido un número limitado de pacientes debido a la retirada del instrumento del mercado.

El grupo de Nadal-Desbarats *et al.*⁵⁰ (2013), al analizar el perfil metabolómico de muestras de medio de cultivo embrionario en D+5 mediante ¹H-RMN, observaron ligeras diferencias en el medio de cultivo de preembriones con un mayor desarrollo, principalmente en el contenido de aminoácidos. Sin embargo, dichas diferencias no fueron estadísticamente significativas, por lo que concluyeron que esta no era una técnica útil para predecir la viabilidad embrionaria, y que otras técnicas analíticas serían necesarias para verificar sus conclusiones.

Fu *et al.*⁵¹ (2013) analizaron muestras provenientes de medios de cultivo embrionario en D+3 mediante NIR, y determinaron una correlación entre estas y el potencial de implantación. Además, también puntualizaron que aquellos preembriones pertenecientes a la misma categoría morfológica tienen una actividad

metabólica diferente a los demás, por lo que el uso de los criterios morfológicos junto a los metabolómicos podía ser de utilidad en este campo.

El equipo de Wallace *et al.*⁵² (2014) se propuso determinar nuevos biomarcadores de viabilidad embrionaria llevando a cabo un estudio sobre muestras de cultivo embrionario en D+2 empleando ¹H-RMN, y concluyó que las relaciones de formiato con 3-aminoisobutirato, acetato, glutamato, glicina y triptófano aumentaban en medios de cultivo de preembriones que generaron embarazos positivos, mientras que la ratio citrato/alanina disminuía. Un trabajo contradictorio a este último y publicado en el mismo año es el de Kirkegaard *et al.*⁵³, donde realizaron un estudio sobre la obtención de perfiles metabolómicos embrionarios empleando ¹H-RMN en el que analizaron muestras en D+3 y D+5 del ciclo embrionario, concluyendo sin embargo que no existía correlación entre los perfiles metabolómicos y los embarazos.

Más recientemente, Rubessa *et al.*⁵⁴ (2018) llevaron a cabo una investigación sobre el metabolismo embrionario empleando muestras de medio de cultivo bovino a lo largo de los días del ciclo, analizándolas mediante ¹H-RMN. Para ello, dividieron el estudio en dos partes: en la primera obtuvieron que, en general, en D+3 los preembriones que se desarrollaron correctamente experimentaron un mayor consumo de alguno de los aminoácidos aludidos anteriormente (alanina, leucina, isoleucina, valina, histidina, tirosina, lisina, metionina y fenilalanina), la concentración de lactato aumentó, y las concentraciones de mioinositol y citrato decrecieron en los D+1-3. Además, en los D+3-5, se observó una concentración máxima de formiato, y el consumo/producción de piruvato fue constante a lo largo del ciclo. En la segunda parte, basándose en los resultados de investigaciones anteriores, se enfocaron en encontrar nuevas diferencias metabólicas en función del sexo del futuro embrión. Concluyeron que en los D+1-3 la concentración de valina difería entre sexo masculino y femenino, mientras que en los D+5-7 era el consumo de piruvato el que cambiaba, es decir, que existen diferencias metabólicas a lo largo del ciclo embrionario entre ambos sexos. Estos marcadores obtenidos, podrían seguir utilizándose en futuras investigaciones para determinar el sexo del preembrión antes de la transferencia.

La **Tabla A1** (ver anexo) resume los estudios metabólicos más importantes realizados hasta el momento en medios de cultivo embrionario mediante diferentes técnicas analíticas, con el objetivo común de predecir una mejor viabilidad y calidad embrionaria y/o el potencial de implantación y embarazo clínico.⁵⁵⁻⁵⁷

Como podemos observar en estos estudios, la RMN puede llegar a ser una herramienta muy útil en metabolómica embrionaria, ya que, además de no ser destructiva ni invasiva puede proporcionarnos información estructural y conformacional sobre los metabolitos con una única medida, sin necesidad de realizar derivatizaciones o separaciones previas. Además, los avances obtenidos en el área de la quimiometría han logrado proporcionar cada vez más información químicamente relevante de los datos adquiridos instrumentalmente, por lo que se ha convertido en una técnica complementaria indispensable para la interpretación de los resultados obtenidos y poder no sólo predecir la implantación embrionaria sino llegar incluso a predecir el futuro sexo del embrión a transferir.

3.5. ETAPAS DEL ESTUDIO METABOLÓMICO EN EMBRIOLOGÍA

El diseño experimental en todo estudio metabolómico es un punto clave para la obtención de resultados concluyentes, y en general debe estar dirigido con objeto de disminuir la variabilidad inter-muestral. En esta sección se detallan las etapas en las que se ha dividido nuestro estudio y que han sido validadas y optimizadas por separado en función de los objetivos (ver apartado 4):

- (1) Muestreo y preparación de la muestra.
- (2) Adquisición de datos por métodos analíticos.
- (3) Tratamiento de datos mediante métodos quimiométricos.

A lo largo del estudio metabolómico se debe ser metódico y cuidadoso y tener en cuenta diversos factores durante la extracción y la preparación de las muestras, el pre-tratamiento de espectros de $^1\text{H-RMN}$, o el procesado de los datos, ya que pueden influir de forma significativa sobre los resultados. Las dos primeras etapas son imprescindibles, ya que el método analítico empleado dependerá de las propiedades de la muestra. Además, mientras que la adquisición de los datos es un proceso automatizado en general, la preparación de la muestra es un proceso manual y laborioso, por lo que debe simplificarse lo máximo posible. Tras la adquisición de los resultados, finalmente se tratan los datos obtenidos mediante técnicas de análisis estadístico con objeto de identificar los biomarcadores.⁵⁸ En la **Figura 12** se muestra un esquema de las etapas que constituyen un estudio metabolómico en embriología.



Figura 12. Pasos a seguir en un estudio metabolómico embrionario.

3.5.1. Muestreo y preparación de la muestra

Antes de proceder a la extracción de la muestra, cabe mencionar que aquellos pacientes de cuyos preembriones van a ser tomados los medios de cultivo, deben firmar un acuerdo por el cual confirmen su consentimiento de análisis del medio tras retirar los preembriones, según el procedimiento estándar de FIV, que declara que las consideraciones sobre el bienestar de los individuos participantes deben prevalecer

sobre cualquier interés o beneficio colectivo de la sociedad o de la ciencia, según *La Declaración de Helsinki (1964/1975/2000)*.⁵⁹

Las técnicas de fecundación *in vitro* permiten inseminar los ovocitos con los espermatozoides seleccionados tras la capacitación de los mismos, y los ovocitos fecundados iniciarán el ciclo embrionario. Cada día tienen lugar distintos cambios metabólicos, por lo que la recolecta del medio de cultivo requiere de un gran cuidado y precisión mediante un procedimiento estandarizado y optimizado. Dicha metodología permite evitar el arrastre de la parafina líquida que recubre el medio de desarrollo embrionario, cuya función es mantener estables las condiciones de cultivo (pH, osmolaridad, temperatura) durante todo el desarrollo embrionario. Sus señales en los espectros de ¹H-RMN interfieren con las de los metabolitos de interés y es por esta razón por la que se ha de retirar cuidadosamente. Una vez recolectado, el medio embrionario es congelado inmediatamente, evitando así posibles reacciones secundarias que puedan modificar el perfil metabólico. Para ello, se transfiere a un ultracongelador de -80°C hasta su posterior análisis.

3.5.2. Adquisición de datos por métodos analíticos

A la hora de realizar el perfil metabólico de un sistema biológico, existen diversas técnicas espectroscópicas o espectrométricas que proporcionan perfiles ricos en información sobre los metabolitos de interés. Estos métodos son tan comunes en este tipo de análisis, que se emplea el término *bioespectroscopía* para referirse a ellos, o más concretamente *espectroscopía basada en metabólica*. Quizás las técnicas con mayor importancia son la espectroscopía de RMN, y la espectrometría de MS, esta última acompañada inevitablemente por métodos separativos como la cromatografía de gases (GC), o la de líquidos (LC).

Las técnicas GC-MS y LC-MS presentan una alta sensibilidad y reproducibilidad, siendo capaces de determinar metabolitos secundarios en bajas concentraciones. Sin embargo, tienen ciertas desventajas entre las cuales destacan: (1) son técnicas destructivas de la muestra, (2) requieren ese paso previo de separación impuesto por la técnica cromatográfica, (3) en el caso de GC-MS, suele requerir de derivatización, que puede hacer que los resultados se vean afectados por el propio proceso de síntesis, (4) y en el caso de LC-MS, no permite la identificación de metabolitos por comparación directa con una biblioteca debido a la formación de aductos, por lo que requiere de la presencia de algún tipo de analizador para hallar la información estructural a partir de fragmentación.

Por otro lado, otras técnicas analíticas basadas en espectroscopía vibracional con gran relevancia en metabólica son la espectroscopía Raman y la infrarroja (IR). Esta última, se divide en función de la longitud de onda empleada en infrarroja cercana (NIR) e infrarroja por transformada de *Fourier* (FTIR). Tal y como se ha hecho referencia anteriormente, hasta hace poco tiempo, la espectroscopía NIR era una de las más ampliamente empleadas en diversos estudios para tratar de hallar la relación entre el metaboloma y la viabilidad embrionaria, sin embargo, presenta menor sensibilidad y selectividad que MS, además de que su poder estructural en relación con la identificación de metabolitos es muy limitado.

La espectroscopía de RMN, sin embargo, se trata de una herramienta muy poderosa en términos de identificación de metabolitos concretos presentes incluso en mezclas complejas sin necesidad de separación, realiza un análisis no destructivo y

no invasivo de la muestra, y proporciona información cuantitativa y estructural al mismo tiempo, sin las desventajas que presenta MS. La **Tabla 3** recoge un resumen de las ventajas y desventajas que este tipo de técnicas presentan. En el caso de la RMN, quizás uno de sus principales inconvenientes es su baja sensibilidad, si bien es un aspecto que ha sido parcialmente mitigado con la utilización de campos magnéticos cada vez más intensos y, con el uso de sondas específicas llamadas criosondas, que consiguen disminuir el ruido, aumentando la sensibilidad, y, por lo tanto, permitiendo detectar los metabolitos secundarios en bajas concentraciones.^{60 61}

Tabla 3. Ventajas y desventajas de técnicas analíticas RMN, GC-MS, LC-MS NIR y Raman.^{55, 62}

| Técnica analítica | Ventajas | Desventajas |
|--------------------------|--|--|
| RMN | <ul style="list-style-type: none"> - Robusta. - Altamente reproducible. - Cuantitativa. - No destructiva. - Mínima preparación de la muestra (ni derivatización, ni separación). - Rápida (2-6 min/ muestra). - Información estructural total incluso conformacional. - No requiere patrones. - No depende de la ionización de los metabolitos. | <ul style="list-style-type: none"> - Baja sensibilidad (mejorable con criosondas). - Instrumentación y mantenimiento costoso. - Interpretación de datos espectrales laboriosa. |
| GC-MS | <ul style="list-style-type: none"> - Tiempo retención reproducible. - Compuestos volátiles y semivolátiles. - Bajo coste económico frente a RMN y LC-MS. - Cuantitativa (mediante calibración). - Bajo límite de detección. - Alto poder de resolución y precisión. | <ul style="list-style-type: none"> - Destructiva. - Derivatización. - Separación. - Lenta (20-30 min/muestra). - Dificultad de identificar nuevos compuestos. - Necesita de patrones y de la construcción de rectas de calibrado - La intensidad de la señal depende de la ionización de los metabolitos. |
| LC-MS | <ul style="list-style-type: none"> - Muy bajo límite de detección. - Alta precisión, poder de resolución y especificidad. - Aplicable a matrices complejas, compuestos polares y apolares. | <ul style="list-style-type: none"> - Destructiva. - Menos robusta que RMN y GC-MS. - Problemas de efecto matriz. - Formación de aductos |

| | | |
|--------------|--|--|
| | | múltiples. |
| | | - Necesita de patrones y de la construcción de rectas de calibrado. |
| | | - La intensidad de la señal depende de la ionización de los metabolitos. |
| NIR | - Alta sensibilidad. | - Requiere profesional cualificado para interpretar los datos espectrales. |
| | - No requiere preparación de la muestra. | - No permite la identificación de metabolitos concretos. |
| | - Bajo coste económico. | - Identificación de resultados laboriosa. |
| | - Resultados más precisos y cuantitativos. | |
| | - No destructiva. | |
| Raman | - No requiere preparación de la muestra. | - Elevado coste económico. |
| | - Capaz de detectar enlaces sin momento dipolar ausentes en IR. | - Las señales más débiles requieren un detector de alta sensibilidad. |
| | - Registra la señal del agua proveniente de muestras acuosas como débil, por lo que es útil en muestras de fluidos biológicos. | - No permite la identificación de metabolitos concretos. |
| | | - La fluorescencia de algunas muestras puede dificultar las mediciones. |

La espectroscopía de RMN, que es la empleada en este Trabajo de Fin de Grado, analiza la absorción y emisión de la energía de radiación electromagnética que experimentan aquellos núcleos atómicos con momento magnético y número cuántico de espín nuclear distinto de cero como ^1H o ^{13}C en presencia de un campo magnético externo. En la **Figura 13** se muestra el espectrómetro de RMN 600 MHz dotado de criosonda cuádruple que ha sido empleado en este estudio.



1



2

Figura 13. (1) Espectrómetro Bruker Avance III 600 equipado con (2) automuestreador termostatzado SampleCase de 24 posiciones. Imágenes extraídas de la referencia 63.

Los espectros monodimensionales (1D) de RMN dependen de la naturaleza del grupo químico de cada núcleo y de su entorno magnético, y nos aportan información sobre ellos mediante la posición de las señales en el espectro (desplazamiento químico) y sus desdoblamientos, que dependen de la interacción con los núcleos con espín distinto de cero adyacentes. El área que ocupa cada señal, es decir, su integral, es proporcional a la abundancia de los núcleos que la forman, y la anchura proporciona datos de relajación transversal (T_2). La información proporcionada por los espectros de RMN permite identificar inequívocamente los metabolitos presentes en una muestra, sin embargo, es frecuente obtener espectros monodimensionales en los que extraer información es muy complejo debido al elevado solapamiento de señales, por lo que se recurre a espectros de RMN bidimensionales (2D) para la resolución de este problema. Algunas de las secuencias 2D más empleadas en análisis metabolómicos son ^1H , ^1H -COSY, ^1H , ^1H -TOCSY, ^1H , ^1H -NOESY, ^1H , X-HSQC y ^1H , X-HMBC. La X suele hacer alusión a los núcleos de ^{13}C , ^{15}N y en algunas ocasiones ^{31}P .

En general, las muestras empleadas en metabolómica presentan grandes diferencias de concentración entre el agua presente en ellas y la de los propios metabolitos, por lo que suele ser necesaria la eliminación de la señal del agua para evitar su solapamiento con señales de interés, ya que la señal del disolvente puede llegar a ser hasta cuatro órdenes de magnitud superior a las de los metabolitos. La técnica de supresión de agua más empleada, debido a su efectividad y sencillez de uso, es la presaturación de la señal del disolvente empleando un campo magnético débil, que permite su eliminación selectivamente. También es muy empleado el experimento monodimensional 1D-NOESY PRESAT, que, mediante una secuencia de tres pulsos de 90° combinada con la de presaturación, consigue anular la señal del agua de forma muy efectiva y sin apenas distorsiones en las señales cercanas a la del agua. En los espectros de la **Figura 14** se puede observar la diferencia que se obtiene entre muestras de extractos celulares con y sin presaturación de la señal del agua. Como puede apreciarse, en el espectro sin presaturación no se consiguen ver las señales de interés debido a la gran intensidad de la señal del agua, mientras que, en el de la derecha, pueden observarse claramente gracias a la secuencia 1D-NOESY PRESAT.

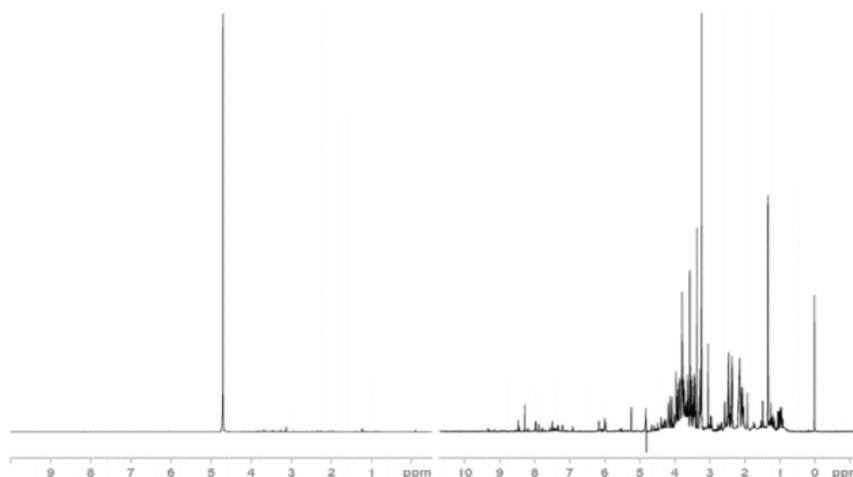


Figura 14. Señales de un extracto celular adquiridas en un espectrómetro de 700 MHz. En el espectro de la derecha fue aplicada la secuencia de pulsos 1D- NOESY PRESAT. Figura obtenida de la referencia 62.

En ocasiones, la eliminación de señales en función del peso molecular es necesaria. Para ello, por un lado, se emplean *filtros de difusión* cuando se tratan de señales procedentes de metabolitos de bajo peso molecular, o por el contrario se emplean los denominados *filtros de relajación* cuando los metabolitos que se desean suprimir son de alto peso molecular, o en términos más exactos, son de movimiento molecular lento. Los filtros de difusión se basan en secuencias de eco de espín, en las que tiene lugar la aplicación de pulsos de gradiente de campo magnético, consiguiendo así que los compuestos de bajo peso molecular atenúen sus señales. Los filtros de relajación están basados en la secuencia de pulsos *Carr Purcell Meiboom Gill* (CPMG), también conocida como *filtro T_2* , en la que tienen lugar pulsos consecutivos de radiofrecuencia de 180° a ambos lados separados por un tiempo concreto del orden de milisegundos. Con este filtro son eliminadas las señales de todas las especies que relajan con cierta rapidez (señales anchas), mientras que, si son especies que relajan lentamente (señales estrechas, con valores de T_2 largos), sus señales se observan sin apenas atenuación.⁶²

En la **Figura 15** se muestran dos espectros de ^1H -RMN provenientes de un mismo medio de cultivo embrionario. En la parte superior se ha aplicado la secuencia 1D-NOESY PRESAT, y en la inferior la secuencia CPMG, lo que permite la supresión de las señales anchas provenientes de macromoléculas, tales como péptidos y proteínas.

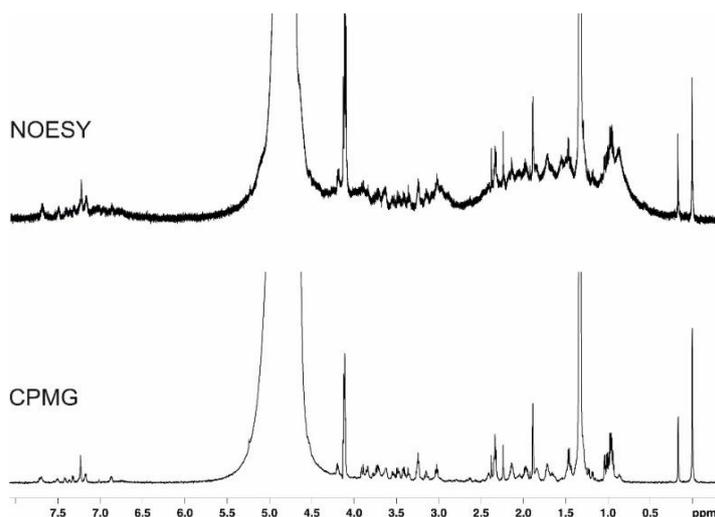


Figura 15. Espectros de ^1H -RMN de un mismo medio de cultivo embrionario obtenido mediante secuencia 1D-NOESY PRESAT (arriba), y por secuencia CPMG (abajo).

3.5.3. Interpretación de datos mediante quimiometría

Debido a la gran amplitud de muestras que conlleva un estudio metabolómico, es necesaria una interpretación de los datos que ayude a reducir su dimensión, para lograr una interpretación más adecuada y correcta. Para ello, se emplea la quimiometría, que es la metodología basada en procedimientos matemáticos y estadísticos que permite extraer la información más importante de los datos experimentales obtenidos, logrando mejorar el proceso analítico y dando calidad a los resultados.

Los métodos quimiométricos son conocidos desde principios de los años 70, aunque los cálculos y algoritmos necesarios han supuesto durante mucho tiempo una

desventaja, que ha podido verse corregida en estos últimos años gracias a los ordenadores actuales, capaces de procesar y llevar a cabo cálculos de grandes conjuntos sin dificultad. Los dos primeros métodos que se comenzaron a aplicar para el reconocimiento de patrones fueron el algoritmo *NIPALS* (*Nonlinear Iterative Partial Least Squares*), y el método *SIMCA* (*Soft Independent Modeling of Class Analogy*). Hoy en día, la quimiometría se emplea sobre todo en el área de la química analítica para procesar señales, realizar el diseño experimental, reducir variables, explorar los datos obtenidos, llevar a cabo un análisis multivariante, y reconocer patrones.⁶⁴

Los análisis estadísticos pueden clasificarse principalmente en análisis multivariantes, y análisis univariantes. Por un lado, los análisis univariantes emplean información de cada variable por separado, y por el otro, los multivariantes emplean la información de todas las variables de un conjunto, para predecir las características de otro.

En ambos casos, antes de aplicar el propio método estadístico, es necesario realizar un estudio de los valores, con el objetivo de comprobar si su distribución es normal y las varianzas son homogéneas en cada grupo de muestras. Para ello, se suele emplear el *test de Kolmogorov-Smirnov*, la *correlación de Lilliefors*, o el *test de Shapiro-Wilk*, con los cuales obtenemos la probabilidad de que las variables sigan una distribución normal. Tras este paso, se deben aplicar pruebas estadísticas *paramétricas* si los datos siguen una distribución normal, y si no lo son, se deben seguir pruebas estadísticas *no paramétricas*. Por último, para comprobar la homogeneidad de las varianzas de las variables, se pueden emplear análisis como el *test de Levene*.

Para analizar estadísticamente los datos de RMN, es decir, los empleados en este TFG, es necesario transformar los datos espectrales obtenidos en una matriz de datos. Con este propósito, se realiza un proceso denominado *bucketing*, en el cual, el espectro se divide en regiones de unos 0.04 ppm denominadas *buckets*. Las matrices se organizan en tantas filas como muestras haya, y en tantas columnas como *buckets* se hayan realizado. Este proceso, servirá para crear una tabla de datos que contenga los valores de las integraciones de los espectros.

El análisis univariante se trata de una prueba de análisis de la varianza, que, tiene como objetivo principal, la detección de los *buckets* significativamente diferentes al resto, es decir, aquellos que tienen un valor $p < 0.05$. Los test más significativos dentro de estos análisis, ambos paramétricos, son el de la *t de student* (al comparar dos grupos), y el *ANOVA* (si hay más de dos grupos).

Por otro lado, el análisis multivariante requiere de un preprocesado de la matriz de datos antes de su aplicación. Para ello se debe:

- (1) Eliminar filas o columnas con ausencia de datos, correspondientes a metabolitos por debajo del límite de detección o que han fallado experimentalmente.
- (2) Dividir las variables de la matriz entre un factor escalar, es decir, *escalar* la matriz. Se trata de un punto de gran importancia, ya que será el responsable de que las variables con un valor numérico elevado no valgan más que las de menor valor. Existen varios tipos de escalado, pero quizás los dos más importantes en metabolómica son los denominados *Unit Variance* (UV) (**Ecuación 1**), que emplea el valor medio del *bucket* y la desviación estándar de

cada una de las variables como factor de escalado (hace que cada variable pese igual en la totalidad del espectro final, independientemente al inicial, es decir, que todos los *buckets* tengan la misma importancia), y el denominado *Pareto (Par)* (**Ecuación 2**), que emplea el valor medio del *bucket* y la raíz cuadrada de la desviación estándar de cada variable como factor escalar, lo que provoca una disminución de la importancia de los valores altos, es decir, de aquellos *buckets* en mayor concentración.

$$\widetilde{X}_{ij} = \frac{x_{ij} - \bar{x}_i}{s_i} \quad (1)$$

$$\widetilde{X}_{ij} = \frac{x_{ij} - \bar{x}_i}{\sqrt{s_i}} \quad (2)$$

- (3) Centrado o traslación del origen de coordenadas, para que todos los espectros tengan una misma escala de desplazamientos químicos.
- (4) Eliminación de valores anómalos.
- (5) Normalización de los valores obtenidos.

Este tipo de análisis multivariantes pueden clasificarse en función de si los métodos no son supervisados, los cuales no tienen en cuenta el hecho de que los datos se clasifiquen dentro de un grupo o no, y de si los métodos son supervisados, los cuales emplean esta información para maximizar la separación entre grupos. Normalmente, primero se emplean métodos no supervisados, para después profundizar con los supervisados. Los métodos no supervisados se emplean en análisis exploratorios, y utilizan algoritmos para conseguir agrupar los datos de la variable X (es decir, los datos de los espectros de RMN de la matriz), según similitudes y diferencias, pudiendo así ver la tendencia de los datos mediante una representación gráfica. Además, permiten identificar y eliminar muestras atípicas (*outliers*). Algunos de los métodos no supervisados más comunes son *Análisis de Componentes Principales* (PCA), y *Análisis de Agrupamientos Jerárquicos* (HCA), siendo el primero el más empleado en estudios metabólicos.⁶⁵

Por otro lado, entre los métodos supervisados, encontramos el *Análisis por Mínimos Cuadrados Parciales* (PLS), y el *Análisis de Mínimos Cuadrados Parciales Ortogonales* (OPLS). El análisis por PLS consigue relacionar dos matrices de datos, X e Y, mediante un modelo lineal multivariante, en donde la matriz X contiene los datos extraídos de los espectros de RMN de cada muestra, y la matriz Y, información adicional sobre los tipos de muestras analizadas. El análisis OPLS, es un tipo de análisis PLS mejorado, el cual elimina los valores de X que no correlacionan con los de Y. Gracias a estos métodos, podemos observar cómo influye la variable dependiente X sobre la independiente Y, junto a la tendencia de los datos en una representación gráfica.

Cuando finalmente se obtiene un modelo estadístico, este debe ser validado mediante pruebas de validación o pruebas de permutación. Mediante estas pruebas se obtienen dos coeficientes, el coeficiente de predicción Q^2 , que refleja la capacidad de predicción del modelo, y el coeficiente de ajuste R^2 , que mide el grado de fiabilidad del modelo ajustado a un conjunto de datos. Cuanto más cercano a la unidad es el valor de R^2 , mejor se ajusta el modelo a los datos, mientras que valores de Q^2 superiores a 0.5 son normalmente aceptables e indican una buena capacidad de predicción del modelo.⁶⁶

4. OBJETIVOS

Este Trabajo de Fin de Grado tiene tres objetivos principales y uno transversal a todos ellos:

El primero corresponde a la elaboración de una breve revisión bibliográfica en la cual se analice, por orden cronológico, el progreso de algunas de las principales investigaciones dedicadas a la mejora de los parámetros de selección embrionaria en FIV, con o sin la ayuda de los parámetros morfológicos empleados actualmente para este propósito.

El segundo objetivo de este TFG corresponde a la obtención de los perfiles metabólicos mediante ^1H -RMN de 73 muestras de medio de cultivo embrionario VitrolifeTM a lo largo del ciclo de desarrollo embrionario. Para ello, las muestras procedentes de preembriones obtenidos por FIV convencional e ICSI, fueron recolectadas en el Hospital Universitario Torrecárdenas (Almería) durante 5 meses tras el ciclo de desarrollo embrionario, y los datos considerados relevantes asociados a dichas muestras fueron recopilados en una base de datos.

El tercero de los objetivos persigue el análisis estadístico multivariante (PCA y PLS) de todos esos perfiles de RMN que junto con los datos asociados a las muestras permita obtener un conjunto de metabolitos discriminantes (biomarcadores) de desarrollo y calidad embrionaria.

De forma transversal a estos tres objetivos, la realización de este trabajo pretende proporcionar las competencias específicas propias de mejorar el conocimiento del lenguaje científico-técnico en inglés, mejorar la capacidad de toma de decisiones, así como la de emitir juicios críticos y sobre todo justificar razonablemente el porqué de las decisiones adoptadas.

5. MÉTODOS EXPERIMENTALES

5.1. MUESTREO Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Las muestras recolectadas para el estudio correspondieron a medios de cultivo de embriones humanos. Se recogieron un total de 165 muestras procedentes de 42 pacientes sometidos al proceso de Fecundación *In Vitro* en el Hospital Universitario Torrecárdenas en el período de 2019/2020, quienes firmaron previamente los consentimientos pertinentes detallados en el apartado 3.4.1. de este TFG. Del total de muestras, sólo 73 provenientes de 21 pacientes pudieron ser empleadas en este estudio.

Todas las muestras se tomaron de medios de cultivo donde permanecieron los embriones desde el momento en el que fueron fecundados hasta su transferencia. Este medio de cultivo fue equilibrado antes de su uso en un incubador Labotect[®] hasta alcanzar las condiciones de 6 % CO_2 y 37 °C de temperatura, con una humedad relativa en torno al 100 % durante un mínimo de 4 horas. El medio de cultivo empleado, VitrolifeTM, está compuesto de un medio tamponado que contiene ácido hialurónico. Seguidamente, el biólogo clínico preparó el medio de cultivo en placas multipocillo, llenando con 30 μL de medio de cultivo tantos pocillos como embriones hubiera, cubiertos de 5 mL de aceite mineral OvoilTM. Se emplearon dos microgotas de medio de cultivo para el lavado de los mismos antes de ser colocados en sus pocillos correspondientes.⁵⁷ En cada placa, se detalló el código de

identificación de cada paciente (**Figura 16**) en la parte superior e inferior, y se rotuló sobre cada pocillo en el que hubiese un embrión, un número para distinguirlos. Estos códigos, fueron empleados a lo largo de todo el estudio para distinguir las muestras, que se recogieron en una base de datos generada con Excel (Microsoft Office Profesional 2016), donde, además, se añadieron una serie de parámetros.

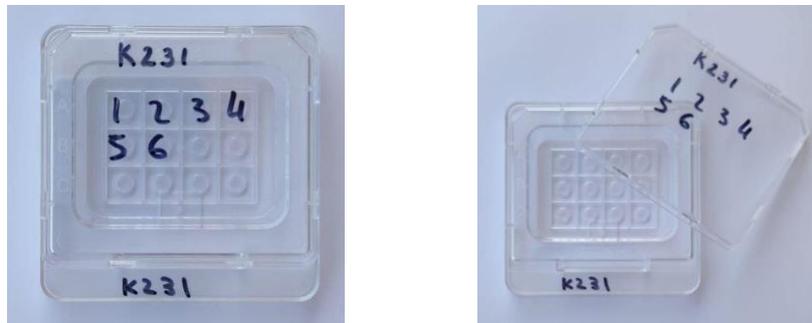


Figura 16. Placa multipocillo empleada en el laboratorio. Código generado aleatoriamente, sin ningún tipo de correspondencia con los pacientes.

Después de que el biólogo clínico hubiera retirado los embriones del medio con el objetivo de transferirlos mediante un protocolo, las muestras de medio de cultivo embrionario fueron recolectadas. El volumen tomado de cada muestra correspondió a 20 μ L del medio de cultivo empleando para ello una micropipeta automática con puntas estériles.

El procedimiento de toma de la muestra tuvo lugar mediante el estándar del laboratorio, el cual se encuentra optimizado para asegurar la mínima toma de parafina (componente mayoritario del aceite mineral OvoilTM) junto a la muestra. La parafina, como se mencionará en el apartado 3.5.1 de este trabajo, es empleada como prevención para la modificación de las condiciones del medio de cultivo durante el desarrollo embrionario, y se debe evitar el arrastre de dicho compuesto debido a que sus señales en ¹H-RMN interfieren con las de los metabolitos de interés. El procedimiento para su retirada tiene lugar según los siguientes pasos:

- (1) Colocación de uno de los extremos de la placa multipocillo sobre un número concreto de portaobjetos, hasta crear un ángulo de 30° aproximadamente con la superficie de apoyo.
- (2) Con ayuda de una pipeta Pasteur desechable se retira la parafina de la placa, teniendo especial cuidado con los pocillos en los que se encuentren las muestras.
- (3) Toma de 20 μ L de muestra con ayuda de una micropipeta automática.
- (4) Limpieza de la punta desechable con papel de laboratorio.
- (5) Eyección de la muestra en un tubo Eppendorf de 0.2 mL rotulado con el código de identificación de la muestra y su posterior cierre.
- (6) Almacenamiento en un congelador a -20 °C de las muestras en bolsas identificadas con la fecha de toma.

Este procedimiento se trató de optimizar mediante una pequeña modificación del paso (2). Para ello, se tomaron 15 muestras a las que, además de retirarles la parafina con una pipeta Pasteur, también se les retiró este producto de las zonas más próximas a los pocillos haciendo uso de una micropipeta automática, donde sería más

complicado de retirar con una pipeta Pasteur común. Sin embargo, al obtener los espectros de RMN, no se observaron diferencias entre las muestras recogidas mediante el método ya validado y el puesto a prueba, por lo que se empleó el primer procedimiento debido a su mayor rapidez como procedimiento para la toma de muestras. Por último, las muestras fueron ultracongeladas a -80°C en la Universidad de Almería para preservar los metabolitos intactos, donde permanecieron almacenadas hasta el momento del análisis.

5.2. ADQUISICIÓN Y PROCESADO DE DATOS DE RMN

A la hora de medir los perfiles de RMN, se descongelaron las muestras de medio de cultivo y se procedió a la preparación de las mismas para su posterior análisis. Para ello se tomaron $15\ \mu\text{L}$ de muestra que se transfirieron directamente al tubo de RMN de $5\ \text{mm}$ y se añadieron $400\ \mu\text{L}$ de NaCl (0.9%) en D_2O conteniendo ácido 2,2,3,3-*d*₄-(trimetilsilil)propanoico (TSP, 0.01%). En total, fueron medidas 73 muestras mediante el uso de un espectrómetro Bruker Avance III 600 MHz, equipado con una criosonda cuádruple indirecta QCI $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}/^{31}\text{P}$ de $5\ \text{mm}$ dotada de unidad de gradientes de campo magnético y un automuestreador SampleCase termostatzado de 24 posiciones. Esta configuración permite realizar medidas de alta resolución y sensibilidad, con un rango dinámico cinco veces superior al ofrecido por una sonda convencional.

Se empleó la secuencia de pulsos *Carr Purcell Meibom Gill* (CPMG, secuencia *cpmgpr1d* de Bruker) con supresión de agua tal y como se ha comentado en secciones precedentes. Esta secuencia permite atenuar señales anchas provenientes de moléculas de gran peso molecular tales como lipoproteínas o proteínas. Todas las muestras se midieron a $293 \pm 0.1\ \text{K}$, sin rotación. Los parámetros empleados en la adquisición de los espectros de ^1H -RMN se resumen a continuación: NS (número de *scans*): 256; DS (*dummy scans*): 16; AQ (tiempo de adquisición): 1.24 s; SW (anchura espectral): 13227.5 Hz (22.0 ppm); TD (tamaño de FID): 32768 K; D1 (tiempo de reciclado): 3 s; RG (ganancia del receptor): 203; FIDRES (resolución de la FID): 0.81 Hz, *d*20 (tiempo de espín eco): 0.4 ms; L4 (número de espín ecos o loops): 120. El *lock* se llevó a cabo empleando la señal de deuterio de D_2O . La línea de base y la fase de los espectros fueron automáticamente corregidos y calibrados respecto a la señal del TSP, asignándole el valor de $\delta_{\text{H}}\ 0\ \text{ppm}$. La adquisición y procesado de los espectros se llevó a cabo con el *software TopSpin* (v. 3.6.2).

5.3. ASIGNACIÓN DE METABOLITOS

La asignación de los metabolitos en los medios de cultivo se llevó a cabo mediante el uso del *software Chenomx* (v. 8.5, Edmonton, Canadá), el cual permite asignar las señales de los espectros adaptándolas a las bibliotecas de referencia de metabolitos que ofrece, desde pH 4 a 9, e intensidades de campo de RMN desde 400 MHz hasta 800 MHz. Las multiplicidades observadas fueron asignadas según s = singlete, d = doblete, dd = doblete de dobletes, t = triplete, c = cuádruplete y m = multiplete. Debido a la falta de tiempo consecuencia de las medidas adoptadas en el estado de alarma debido a la crisis sanitaria COVID-19, no pudieron llevarse a cabo experimentos bidimensionales tales como ^1H , ^1H -COSY, ^1H , ^1H -TOCSY, ^1H , ^{13}C -HSQC y ^1H , ^{13}C -HMBC, que hubieran permitido confirmar las asignaciones realizadas.

5.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el *bucketing* de los espectros de RMN, se usó el *software Amix* (v. 3.9.12, Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Alemania). Los *buckets* se obtuvieron empleando intervalos de 0.04 ppm normalizando la intensidad de los picos individuales en relación a la intensidad total registrada en la región de δ_H 0.2-10.0 ppm. La región de δ_H 4.25-5.72 ppm de la señal residual del agua fue excluida del modelo.

La tabla con los *buckets* obtenidos se analizó mediante métodos de análisis multivariante de datos empleando el *software SIMCA* (v. 14.0, Umetrics, Suecia). Algunas variables morfológicas de los pacientes (edad de la mujer, número de ovocitos, recuento de semen, día de transferencia, etc.) y de los embriones (calidad embrionaria) fueron añadidas a la tabla de *bucketizado* (**Figura 17**). Finalmente, técnicas de análisis multivariante de datos no supervisadas (PCA) y supervisadas (PLS) fueron aplicadas sobre los datos de RMN para la identificación de los metabolitos discriminantes (biomarcadores) correlacionados con un mejor y peor desarrollo y con la calidad embrionaria. El modelo PCA fue escalado mediante *Pareto* (**Ecuación 2**) y el modelo PLS fue escalado mediante *unit variance* (**Ecuación 1**). Para estudiar la viabilidad del modelo, se tuvieron en cuenta los valores de los coeficientes R^2 y Q^2 .

| | A | B | C | D | E | F | G | H | I | J | K | L | M | N | O |
|----|----------------------|-----|---------|-----------|----------|---------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 1 | Muestra | Día | CALIDAD | EDAD ELLA | OVOCITOS | SEMEN | 9.9800000 | 9.9400000 | 9.9000000 | 9.8600000 | 9.8200000 | 9.7800000 | 9.7400000 | 9.7000000 | 9.6600000 |
| 2 | "20200305_K244.1_1_ | D+3 | 3 | 34 | 12 | 1E+07 | -0.00014 | -0.00025 | -0.00013 | -0.00035 | 0.000143 | -0.00034 | -0.00013 | 3.75E-05 | -0.00021 |
| 3 | "20200312_K244.2_1_ | D+3 | 3 | 34 | 12 | 1E+07 | -0.00045 | -8.8E-05 | -0.00031 | -0.00031 | -0.00077 | 2.95E-05 | -8.1E-05 | -9.5E-05 | -0.00018 |
| 4 | "20200312_K244.3_1_ | D+3 | 2 | 34 | 12 | 1E+07 | -1.8E-05 | 0.000129 | 9.48E-05 | -5.3E-05 | 0.000166 | -0.00012 | 1.03E-05 | -0.00012 | -0.0003 |
| 5 | "20200312_K244.4_1_ | D+3 | 2 | 34 | 12 | 1E+07 | 0.000294 | 0.000318 | -8.9E-05 | 3.35E-05 | -0.00027 | -1.5E-05 | 0.000206 | -6.1E-05 | -0.00036 |
| 6 | "20200312_K244.5_1_ | D+3 | 4 | 34 | 12 | 1E+07 | -0.00019 | 0.000356 | -0.0002 | -0.00044 | -0.00014 | -0.00049 | -0.00014 | -0.00031 | 0.000161 |
| 7 | "20200312_K244.8_1_ | D+3 | 4 | 34 | 12 | 1E+07 | -1.1E-05 | -6.8E-05 | -0.0002 | 5.5E-05 | 0.000239 | -0.00043 | -0.00019 | 4.21E-05 | -0.00034 |
| 8 | "20200305_K248.7_1_ | D+3 | 4 | 28 | 31 | 4000000 | -9.4E-05 | -4.7E-05 | 0.000112 | 0.000361 | -3.9E-05 | -0.00016 | 4.1E-05 | -6.4E-05 | 0.000138 |
| 9 | "20200305_K248.14_2_ | D+3 | 4 | 28 | 31 | 4000000 | -0.00042 | 3.42E-05 | 0.000334 | -0.00028 | 2.81E-05 | -0.00023 | 0.000199 | 0.000138 | -0.00038 |
| 10 | "20200305_K248.15_1_ | D+3 | 4 | 28 | 31 | 4000000 | -3.6E-05 | -8.1E-05 | -0.0001 | -0.00035 | -0.00011 | 3.42E-05 | -0.00015 | -0.0001 | -0.0001 |
| 11 | "20200305_K248.16_1_ | D+3 | 3 | 28 | 31 | 4000000 | 0.000118 | -1.7E-05 | -0.00013 | -1.8E-05 | -0.00015 | -9.5E-05 | 4.33E-06 | 6.61E-05 | 0.000108 |
| 12 | "20200305_K248.18_1_ | D+3 | 4 | 28 | 31 | 4000000 | -0.00031 | 0.000325 | 0.000103 | -0.00051 | -0.00014 | -0.0003 | 2.41E-05 | -6.5E-06 | 0.000141 |
| 13 | "20200305_K248.19_1_ | D+3 | 4 | 28 | 31 | 4000000 | 0.0001 | -0.00014 | -0.00015 | 7.25E-05 | -3.7E-05 | -0.00011 | -0.00038 | 0.00016 | 0.000133 |
| 14 | "20200305_K248.20_1_ | D+3 | 4 | 28 | 31 | 4000000 | -0.00039 | 2.38E-05 | 0.000753 | -0.00021 | -0.00015 | -0.00034 | -0.00011 | 0.000219 | 0.000431 |
| 15 | "20200305_K248.21_1_ | D+3 | 4 | 28 | 31 | 4000000 | 6.31E-05 | 6.94E-05 | -4E-05 | -2.6E-05 | -8.6E-05 | -1.2E-05 | -8.1E-05 | -5.8E-05 | -0.00014 |
| 16 | "20200305_K248.22_1_ | D+3 | 4 | 28 | 31 | 4000000 | -3.1E-05 | -0.00014 | -0.00016 | 3.2E-05 | 7.97E-06 | 0.000188 | 1.66E-06 | -0.00013 | -1E-04 |
| 17 | "20200305_K248.23_1_ | D+3 | 4 | 28 | 31 | 4000000 | -8.4E-05 | -0.00013 | -9.6E-05 | -0.00011 | 8.08E-05 | 0.000127 | -0.00018 | -0.00036 | -0.0002 |
| 18 | "20200305_K248.24_1_ | D+3 | 4 | 28 | 31 | 4000000 | -3.9E-05 | -4.8E-05 | -6.6E-05 | 0.000324 | -9.8E-05 | -0.00015 | -1E-05 | 0.000334 | -0.00032 |
| 19 | "20200305_K253.1_1_ | D+3 | 3 | 27 | 6 | 3500000 | -0.00025 | -0.00017 | -0.00036 | 1.59E-05 | 0.000199 | -7.2E-05 | -0.00022 | -0.00025 | 0.000131 |
| 20 | "20200305_K253.2_1_ | D+3 | 3 | 27 | 6 | 3500000 | -8.2E-06 | -0.00015 | -0.00031 | -0.00034 | -0.00025 | -0.00019 | 0.000221 | -0.00013 | -0.00062 |
| 21 | "20200305_K253.3_1_ | D+3 | 2 | 27 | 6 | 3500000 | -0.00052 | -0.00038 | 3.97E-06 | -0.00013 | 0.000595 | 3.44E-05 | 0.000244 | -0.00047 | -9.8E-05 |
| 22 | "20200305_K253.4_1_ | D+3 | 2 | 27 | 6 | 3500000 | 0.000116 | -0.00029 | -0.00033 | -5.2E-05 | 4.25E-05 | -0.00018 | -8.7E-05 | 9.83E-06 | 0.000348 |
| 23 | "20200312_K253.6_1_ | D+3 | 4 | 27 | 6 | 3500000 | -0.00023 | -0.00025 | 1.55E-05 | -0.00028 | -0.00028 | -0.00028 | -9.9E-05 | 6.6E-05 | -0.00027 |
| 24 | "20200305_K254.1_1_ | D+3 | 4 | 37 | 7 | 8500000 | -0.00027 | -0.0002 | -0.00032 | -0.00035 | 5.37E-05 | -0.0002 | 7.23E-05 | 0.000294 | -4.7E-05 |
| 25 | "20200305_K254.2_1_ | D+3 | 2 | 37 | 7 | 8500000 | 0.000303 | 0.000403 | 0.000189 | -1.3E-05 | 0.000355 | -9.4E-05 | -0.00024 | -6.3E-05 | 0.000321 |
| 26 | "20200305_K254.3_1_ | D+3 | 2 | 37 | 7 | 8500000 | 0.000435 | 0.00023 | 0.00028 | -0.00017 | 0.000391 | -0.00011 | 5.67E-05 | 0.000185 | 0.000115 |
| 27 | "20200305_K254.4_1_ | D+5 | 4 | 37 | 7 | 8500000 | -0.00022 | -0.0003 | -5.2E-05 | -4.9E-05 | -9.4E-05 | 7.87E-05 | -0.00018 | -3.9E-05 | 2.97E-05 |
| 28 | "20200305_K256.2_1_ | D+5 | 4 | 40 | 5 | 1.5E+07 | 5.17E-05 | 0.000239 | -8.8E-05 | -5.3E-05 | -0.00025 | 0.000105 | -0.00016 | 0.000141 | 0.000293 |
| 29 | "20200312_K256.3_1_ | D+3 | 4 | 40 | 5 | 1.5E+07 | 0.00031 | -0.00015 | -0.00026 | -0.00056 | 5.88E-05 | -2.1E-05 | -0.00049 | -0.00043 | 9.05E-05 |

Figura 17. Fragmento de la tabla de *bucketizado* obtenida para el análisis estadístico.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Este Trabajo de Fin de Grado se centra en el estudio del perfil metabólico del medio de cultivo embrionario VitrolifeTM en los días D+3, D+4 y D+5 del ciclo embrionario. Para ello, fueron empleadas técnicas de análisis multivariante de datos, tales como PCA y PLS, que permiten la correlación de los datos de RMN con la calidad embrionaria y los días de transferencia, dando lugar a la identificación de biomarcadores de calidad embrionaria.

6.1. IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS MEDIANTE RMN

En estas muestras de medio embrionario se identificaron 16 metabolitos correspondientes a compuestos de tipo aminoácido, ácido orgánico, ácido graso, carbohidrato y ácido nucleico. En la **Figura 18** se observa un espectro ^1H -RMN representativo en el que se aprecian las señales correspondientes a la mayoría de los metabolitos asignados en los espectros.

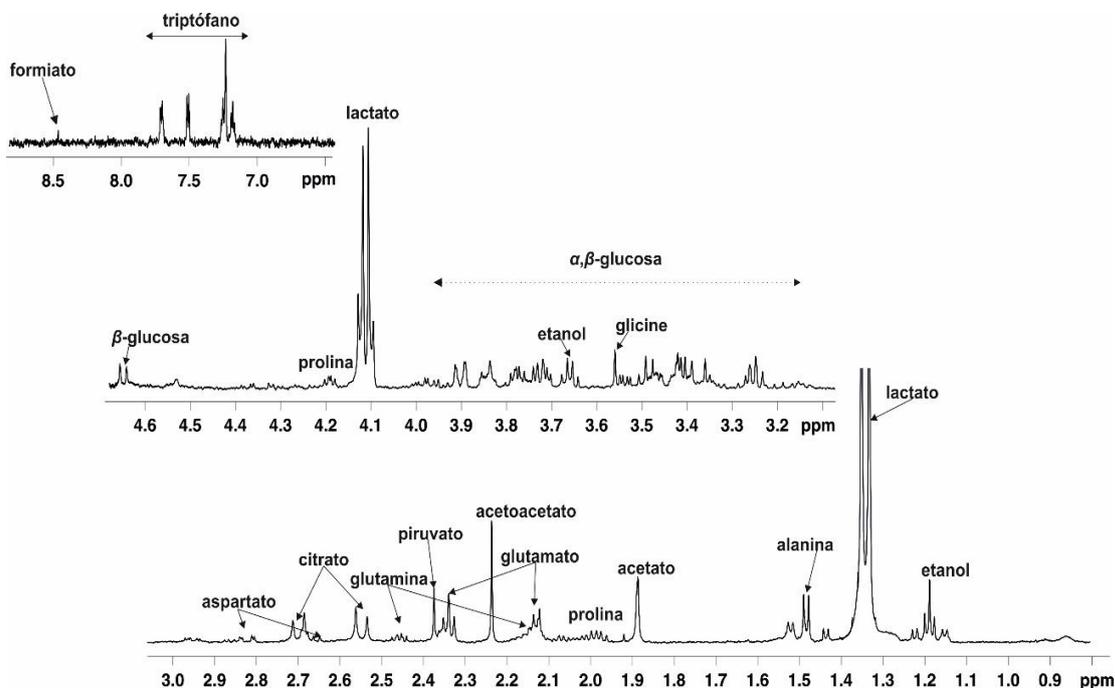


Figura 18. Ampliaciones de un espectro de ^1H -RMN de un medio de cultivo representativo en el que se muestran tres ampliaciones.

Las señales de los compuestos identificados se encuentran enumeradas del 1 al 16 en la **Tabla 4**, en la cual se registran también sus desplazamientos químicos, multiplicidades y constantes de acoplamiento. Esta identificación se llevó a cabo mediante datos obtenidos de la literatura relacionada y revisada en el apartado 3.5, y mediante el uso del *software* *Chenomx*, tal y como se ha mencionado en el apartado de métodos.

Tabla 4. Desplazamientos químicos (ppm), multiplicidad y constantes de acoplamiento (Hz) para los metabolitos identificados en el medio de cultivo embrionario.

| Metabolitos | Desplazamientos químicos (ppm), multiplicidad y constantes de acoplamiento (Hz) |
|-------------|---|
| 1. Etanol | 1.19 (t, $J = 7.0$ Hz), 3.66 (c) |
| 2. Lactato | 1.33 (d, $J = 7.3$ Hz), 4.11 (c) |
| 3. Alanina | 1.46 (d, $J = 7.8$ Hz) |
| 4. Acetato | 1.89 (s) |

| | |
|-----------------------|--|
| 5. Acetoacetato | 2.24 (s) |
| 6. Prolina | 1.98 (m), 2.02 (m), 2.03 (m), 3.35 (m), 3.40 (m), 4.20 (m) |
| 7. Glutamato | 2.08 (m), 2.13 (m), 2.33 (m) |
| 8. Glutamina | 2.14 (m), 2.41 (m) |
| 9. Piruvato | 2.37 (s) |
| 10. Citrato | 2.54 (d, $J = 16.1$ Hz), 2.67 (d, $J = 16.1$ Hz) |
| 11. Aspartato | 2.80 (dd, $J = 16.9, 3.8$ Hz), 2.64 (m) |
| 12. Glicina | 3.56 (s) |
| 13. α -Glucosa | 5.23 (d, $J = 3.9$ Hz) |
| 14. β -Glucosa | 4.65 (d, $J = 8.0$ Hz) |
| 15. Triptófano | 7.70 (d, $J = 7.7$ Hz), 7.51 (d, $J = 7.7$ Hz), 7.25 (m), 7.18 (m), 7.23 (s), 3.14 (dd), 3.36 (dd) |
| 16. Formiato | 8.46 (s) |

Respecto a los ácidos orgánicos encontrados en las muestras, se pudieron observar aquellos correspondientes a lactato, acetato, acetoacetato, piruvato, citrato y formiato. Por otro lado, los aminoácidos elucidados fueron alanina, prolina, glutamato, glutamina, aspartato, glicina, prolina y triptófano. Se observaron también las señales correspondientes a la α y β -glucosa, y señales de etanol. La RMN no permite la identificación inequívoca de los ácidos grasos presentes en el medio de cultivo. Para ello, otras técnicas analíticas podrían ser empleadas, tales como GC-FID.

Haciendo uso de la página web *Metaboanalyst*,⁶⁷ se encontraron las distintas relaciones metabólicas entre los metabolitos obtenidos, muchas de ellas contrastando la información adquirida en el apartado de revisión bibliográfica.

El metabolismo de carbohidratos es desde hace años la vía más estudiada en relación al metabolismo embrionario. Se ha llegado a la conclusión de que en los primeros días del ciclo embrionario (hasta el tercer día), en ausencia de aminoácidos en el medio de cultivo, tanto el piruvato como el lactato son las fuentes energéticas principales del preembrión, mientras que el consumo de glucosa es mínimo. Si en el medio embrionario hay presencia de aminoácidos, el embrión puede utilizar el lactato como fuente energética mediante su conversión en piruvato.

Este consumo de glucosa proviene de la glucólisis, la cual, en los primeros días de desarrollo se encuentra restringida por la regulación alostérica de la enzima fosfofructoquinasa (PFK), que se refleja con una baja necesidad energética. El piruvato puede provenir tanto de la glucólisis, como directamente del medio de cultivo embrionario, y, además, puede interferir en el ciclo del ácido cítrico (TCA) o ciclo de Krebs, que podría explicar la presencia de otros de los compuestos, como el citrato, la prolina, la glutamina o el glutamato.

A partir del cuarto día el consumo de glucosa aumenta, acompañado de un aumento de producción de lactato al medio y una disminución en el consumo de piruvato. Esta liberación de la glucosa es debida a la activación de la enzima PFK gracias al consumo de ATP que se genera por el aumento de división celular a lo largo del ciclo, que es un proceso que requiere un gran consumo energético. Otros productos de la glucólisis, presentes en los medios de cultivo medidos, son el etanol, el acetato y el acetoacetato.⁵⁷

La **Figura 19** muestra las estructuras de los compuestos implicados en el metabolismo de carbohidratos. La presencia de lactato (**Figura 19.1**) en las muestras se confirmó mediante un doblete proveniente del grupo metilo de la molécula a δ_H 1.33 ppm y un cuadruplete a δ_H 4.11 ppm proveniente del protón del carbono quiral de tipo metino. El piruvato (**Figura 19.2**), por otro lado, fue detectado mediante un singlete a 2.37 ppm del grupo metilo en posición *alfa* respecto al grupo carbonilo. También se observaron las señales correspondientes a los protones anoméricos de la α -glucosa (**Figura 19.3**) y de la β -glucosa (**Figura 19.4**) con sus característicos dobletes a δ_H 5.23 y 4.64 ppm, respectivamente.

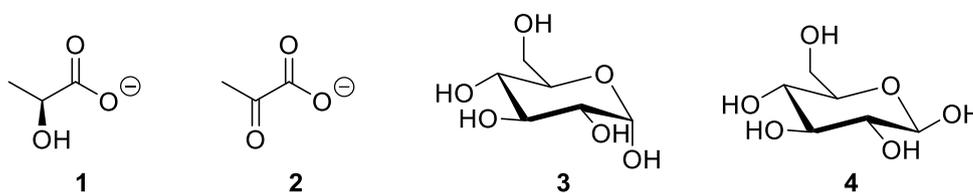


Figura 19. Estructuras químicas del lactato (1), piruvato (2), α -glucosa (3) y β -glucosa (4).

Sin embargo, la glucólisis no genera la energía necesaria para llevar a cabo todo este proceso, por lo que se cree que actúa para satisfacer la necesidad de carbono de los procesos biosintéticos que se dan lugar a lo largo del ciclo.⁶⁸

Todos los aminoácidos dilucidados fueron no esenciales (aquellos que el organismo puede producir naturalmente) con la excepción del triptófano. El metabolismo de aminoácidos en los medios de cultivo ha demostrado ser beneficioso para el desarrollo temprano embrionario, y por ello, como se menciona en el apartado de revisión bibliográfica, la producción y el consumo de estos compuestos ha sido relacionado con las tasas de desarrollo e incluso embarazos clínicos, como en el caso de Houghton *et al.* (2002).³⁹ En la **Figura 20** pueden observarse las estructuras de los aminoácidos identificados. La alanina (**Figura 20.5**) fue identificada mediante un doblete a 1.46 ppm, el cual corresponde al grupo metilo de la molécula. Se observó la presencia de prolina (**Figura 20.6**) mediante varios multipletes correspondientes a sus protones a δ_H 1.98, 2.02, 2.03, 3.35, 3.40 y 4.20 ppm. El glutamato (**Figura 20.7**) se distinguió mediante multipletes a δ_H 2.08, 2.13 y 2.33 ppm. Los protones de la glutamina (**Figura 20.8**) dieron lugar a multipletes a δ_H 2.14 y 2.41 ppm. El aspartato (**Figura 20.9**) fue identificado mediante un doblete a δ_H 2.80 ppm, proveniente del protón del carbono quiral en posición *alfa* al carbonilo, y un multiplete correspondiente a los dos protones metilénicos a δ_H 2.64 ppm. Los protones de la glicina (**Figura 20.10**) dieron un singlete a δ_H 3.56 ppm. En el caso del triptófano (**Figura 20.11**), los protones del anillo aromático de seis carbonos dieron lugar a dos dobletes a δ_H 7.70 y 7.51 ppm, y a dos multipletes a δ_H 7.25 y 7.18 ppm, además de

un singlete a δ_H 7.23 ppm del protón del anillo de cinco carbonos, y dos dobles dobles de los protones metilénicos a 3.14 ppm y 3.36 ppm.

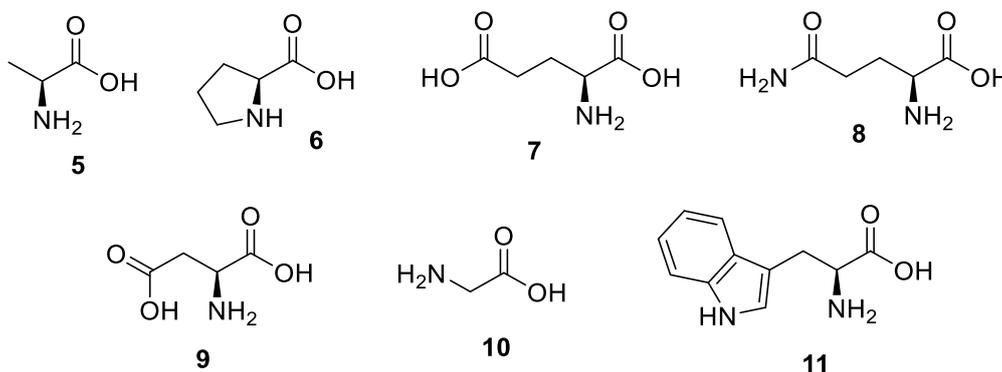


Figura 20. Estructuras químicas de los aminoácidos asignados en el medio de cultivo embrionario: alanina (5), prolina (6), glutamato (7), glutamina (8), aspartato (9), glicina (10) y triptófano (11).

Por otro lado, el formiato (**Figura 21.12**) es una fuente de carbono clave en la síntesis de la purina, empleado en la formación del N10-formil tetrahidrofolato.⁵² Aunque el metabolismo de ácidos grasos no ha cobrado una gran relevancia en los estudios metabólicos del medio embrionario, algunas investigaciones han demostrado que estos compuestos son esenciales para el correcto desarrollo de embriones de origen animal, como en el caso de Dunning *et al.* (2010).⁶⁹ Este compuesto fue identificado mediante un singlete proveniente del protón del grupo aldehído a δ_H 8.46 ppm. El etanol (**Figura 21.13**), que fue identificado mediante un triplete a δ_H 1.19 ppm proveniente de su metilo, y un cuadruplete a δ_H 3.66 ppm originado por el grupo metileno unido a oxígeno, podría estar relacionado con la glucólisis. Mientras que el citrato (**Figura 21.14**), que da lugar a un doblete a δ_H 2.54 ppm y otro a δ_H 2.67 ppm provenientes de sus protones metilénicos, posiblemente tenga relación con el ciclo de TCA.⁶⁷

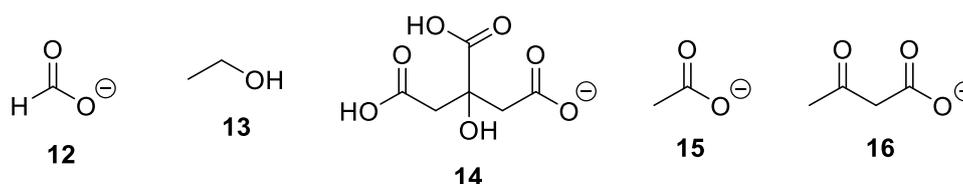


Figura 21. Estructuras químicas del formiato (12), etanol (13), citrato (14), acetato (15) y 3-oxo-butanoato (16).

Otros metabolitos identificados fueron el acetato (**Figura 21.15**) y el 3-oxo-butanoato (**Figura 21.16**), que podrían tener relación con las reacciones de síntesis y degradación de cuerpos cetónicos, relacionadas con la glucólisis y el metabolismo del piruvato.⁶⁷ El acetato fue caracterizado mediante un singlete a δ_H 1.89 ppm de su grupo metilo, y el 3-oxo-butanoato (también denominado acetoacetato) por un singlete a δ_H 2.24 ppm proveniente también del grupo metilo.

6.2. APLICACIÓN DE MÉTODOS ESTADÍSTICOS

Una vez adquiridos todos los espectros, se generó una tabla de *bucketizado*, tal y cómo se ha explicado anteriormente en la sección de métodos. Además de datos de RMN, se incluyeron en esta tabla (**Figura 17**) algunos datos que pudieran ser importantes para la discriminación de los cultivos, tales como la calidad embrionaria obtenida mediante los parámetros morfológicos ASEBIR introducidos en el apartado 3.2, el día de implantación (D+3, D+4, D+5), la edad de la mujer, o el número de ovocitos generado por cada paciente.

Se aplicaron métodos de análisis de datos multivariante sobre los datos de ^1H -RMN y las calidades obtenidas mediante gradación morfológica, con el objetivo de estudiar e identificar las principales diferencias en el perfil metabólico que caracterizan a cada una de las calidades embrionarias.

De esta manera, se realizó en primer lugar un análisis de componentes principales (*Principal Component Analysis*, PCA), para obtener una visión general de la varianza metabólica de un conjunto complejo de datos al ser un método exploratorio no supervisado. Este análisis permite agrupar las muestras de acuerdo con su similitud y revelar las principales tendencias en los datos de ^1H -RMN, así como la existencia de otras variables analíticas y/o biológicas no previstas que afecten a los datos. La aplicación del modelo PCA supone la generación de un nuevo sistema de variables, denominadas componentes principales (PC). La primera de estas componentes contiene la mayor parte de la información del conjunto inicial de datos, mientras que la segunda componente contiene el máximo de la variación restante, y así sucesivamente.⁷⁰

Tras la aplicación del análisis PCA al conjunto de datos de ^1H -RMN, se generan dos tipos de gráficos denominados de “*scores*” y de “*loadings*”. El gráfico de *scores* mostrado en la **Figura 22.1** considera las dos primeras componentes principales (PC1 y PC2) representando una frente a la otra, y revela un 35% y 17% de la varianza total, respectivamente. En este gráfico es posible observar que todas las muestras se agrupan en un *clúster* central, con la excepción de algunas muestras que se alejan del grupo principal (*outliers*). Por otro lado, en la **Figura 22.2** se observa el gráfico correspondiente a *loadings*, que permite identificar el conjunto de las variables responsables de la discriminación entre grupos observada en el gráfico de *scores*, es decir, las áreas espectrales y los datos asociados a las muestras. En el gráfico de *scores*, la posición de las muestras en una determinada dirección se ve influenciada por las variables (*loadings*) que se encuentran posicionadas en la misma dirección en el gráfico correspondiente a *loadings*. De este modo, los *loadings* más alejados del centro de la gráfica, es decir, los discriminantes, representan las áreas espectrales con mayor influencia en la discriminación observada en el gráfico de *scores*, que en las **Figuras 22.1** y **22.2** se encuentran señaladas en rojo.

El análisis de los *loadings* en este estudio permitió concluir que dichas muestras presentan algunas señales asignadas a la parafina proveniente del aceite mineral empleado en FIV como podemos ver en la **Figura 22.3**, pero también señales de compuestos de tipo dimetilsulfóxido (DMSO) y etilenglicol, los cuales provienen de los medios de criopreservación embrionarios y que pudieron verse arrastrados en la descongelación de los mismos.

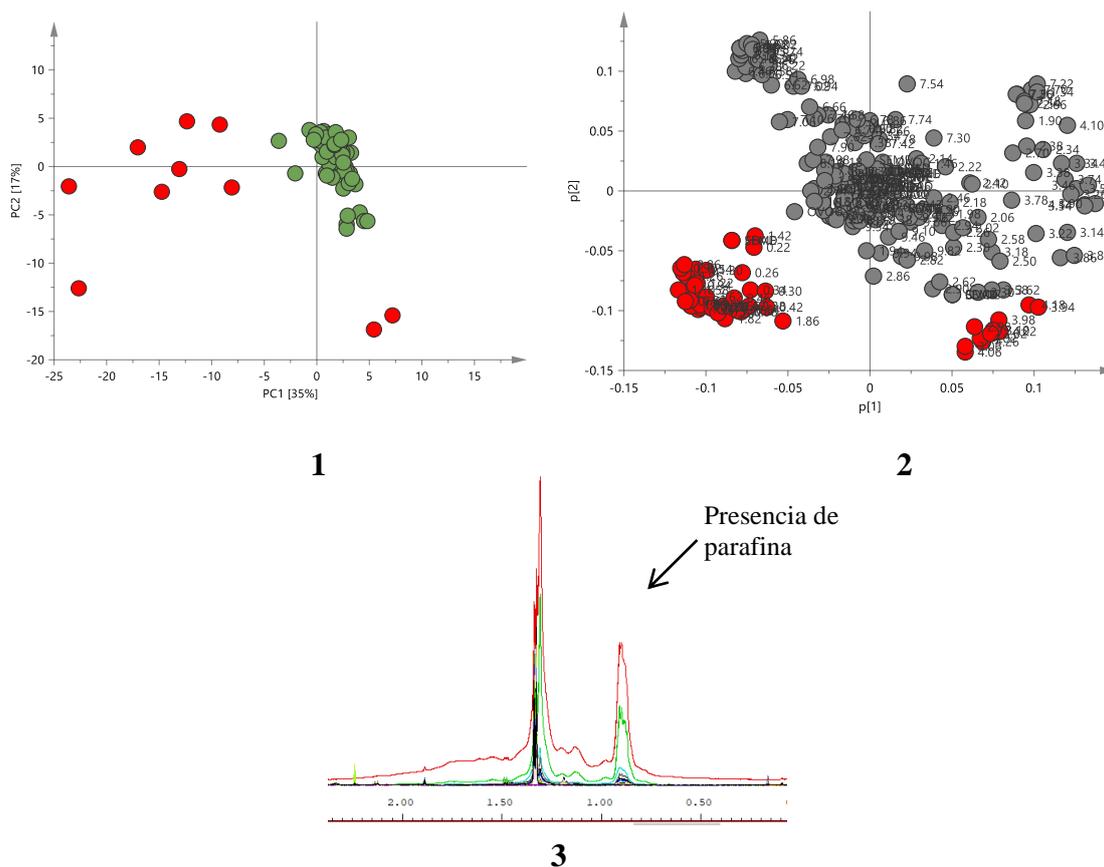


Figura 22. Gráfico PCA (PC1/PC2) de *scores* (1) y de *loadings* (2) obtenido a partir de espectros ^1H -RMN de muestras de cultivos embrionarios (modelo escalado con *Pareto*). En el gráfico de *scores* es posible observar algunos *outliers* (rojo) que se deben a un aumento de parafina, de etilenglicol (δ_{H} 3.67 ppm, s) y dimetilsulfóxido (δ_{H} 2.74 ppm, s) tal y cómo se evidenció en la gráfica de *loadings*. (3) Espectro de ^1H -RMN indicando señales provenientes de la parafina.

Seguidamente, los *loadings* correspondientes a las señales de dichos compuestos “contaminantes” fueron eliminados del análisis con el objetivo de mejorar la discriminación y de evitar las interferencias provenientes de variables secundarias, y volvió a aplicarse un modelo PCA a los datos obtenidos mediante ^1H -RMN.

En la **Figura 23** podemos observar el modelo PCA obtenido tras la representación de PC1 frente a PC2, que explica el 21% y 17% de la varianza total, respectivamente. En esta ocasión, los *loadings* se encuentran representados de acuerdo con la calidad embrionaria correspondiente a cada muestra mediante un código de color (de 1 a 4, **Figura 23.1**), y de acuerdo con el día de implantación de cada uno (D+3, D+4, D+5, **Figura 23.2**), ya que se consideraron que eran las variables que podrían influir más en la discriminación de las muestras.

Sin embargo, una vez se obtuvieron los resultados, no se encontró ningún tipo de agrupamiento entre las muestras, por lo que se pudo concluir en la existencia de otras variables secundarias no previstas que podían estar afectando a la discriminación de los datos.

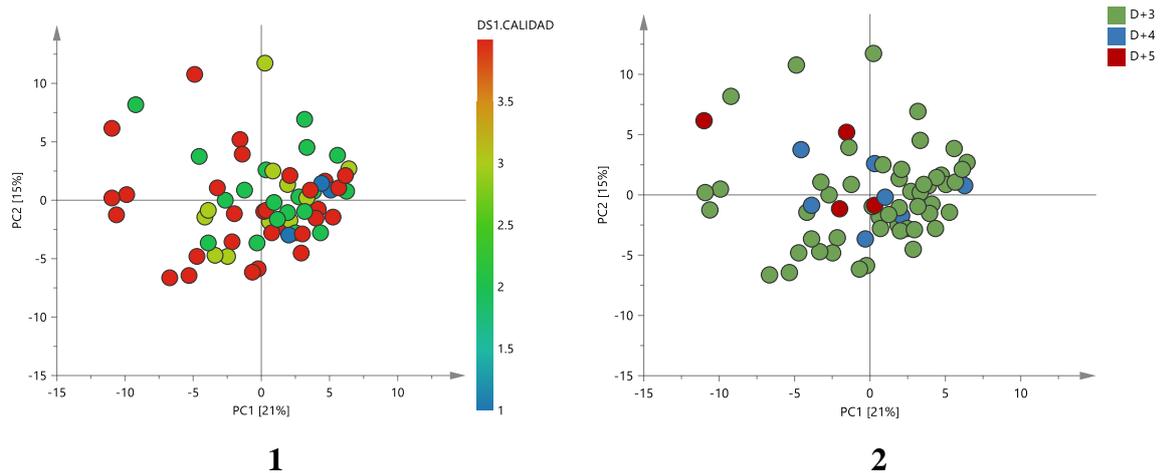


Figura 23. Gráficos de *scores* obtenidos a través de un análisis PCA de los datos de RMN de ^1H y morfológicos de los cultivos embrionarios coloreados de acuerdo con (1) la calidad embrionaria (de 1 – mejor, a 4 – peor) y (2) día de implantación (D+3, D+4, D+5). Los modelos fueron escalados a *Pareto*.

Con el objetivo de optimizar la separación entre los embriones de distintas calidades y eliminar las interferencias por otras variables secundarias no previstas, se realizó un análisis por mínimos cuadrados parciales (PLS) sobre los datos de ^1H -RMN. Este modelo, como se ha comentado anteriormente, es un método supervisado con mayor poder discriminatorio que PCA. Nos permite relacionar dos matrices de datos X e Y entre sí mediante una regresión lineal multivariante, en donde la matriz X contiene los datos extraídos de los espectros de ^1H -RMN de cada muestra, mientras que la matriz Y contiene información adicional sobre los tipos de muestras analizadas, que en nuestro caso se trata de la calidad embrionaria. En la **Figura 24** podemos observar los gráficos de *scores* y de *loadings* tras la aplicación de un modelo PLS escalado mediante *unit variance*. Así, el gráfico PLS permite mejorar la discriminación de las muestras de acuerdo con su calidad embrionaria, al observar que las muestras de peor calidad embrionaria se encuentran ubicadas preferentemente en la parte superior derecha del gráfico de *scores* (**Figura 24.1**).

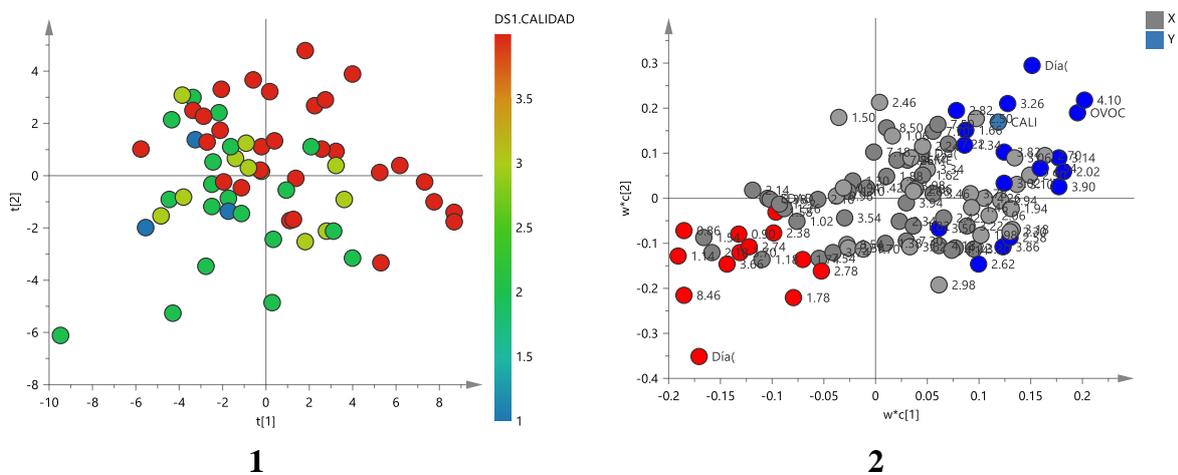


Figura 24. Gráfico de (1) *scores* y de (2) *loadings* tras la aplicación de un modelo PLS sobre los datos de ^1H -RMN y datos de calidad embrionaria (de 1–mejor, a 4–peor). El modelo fue escalado a través de *Pareto*. Parámetros de calidad del modelo: $R^2\text{X} = 0.52$, $R^2\text{Y} = 0.73$, $Q^2 = 0.13$.

El gráfico de *loadings* de la **Figura 24.2**, muestra las variables responsables de la discriminación de los embriones en función de su calidad. Sin embargo, no todas los *buckets* presentes en el gráfico de *loadings* tienen el mismo peso para el modelo, por lo que, paralelamente, se ha realizado la selección de esos *buckets* discriminantes mediante un análisis VIP (*Variable Importance in Projection*). Aquellos *loadings* que presentan valores VIP por encima de 1, coloreados en rojo y azul en la **Figura 24.2**, son considerados estadísticamente más importantes para el modelo, y permiten explicar la discriminación obtenida entre muestras de mejor y peor calidad embrionaria, respectivamente. Todas los *buckets* discriminantes obtenidas en nuestro modelo PLS, se encuentran recogidos en la **Tabla 5** por orden de importancia (valor VIP).

Tabla 5. Tabla con la descripción de las variables que más contribuyen a la discriminación de los cultivos de acuerdo con su calidad embrionaria. Los *buckets* numéricos representan el centro de la región espectral (ppm) \pm 0.02 ppm.[a]

| Disminución de calidad embrionaria | | | Aumento de calidad embrionaria | | |
|------------------------------------|------|-----------------------------|--------------------------------|------|---------------|
| Variable | VIP | Asignación | Variable | VIP | Asignación |
| D+5 | 1.76 | | D+4 | 1.65 | |
| 1.66 | 1.48 | - | 1.58 | 1.35 | Ácidos grasos |
| 4.10 | 1.33 | Lactato | 1.78 | 1.31 | - |
| 2.24 | 1.32 | Acetoacetato | 8.46 | 1.19 | Ácido fórmico |
| 3.42 | 1.26 | β -Glucosa | 1.74 | 1.16 | - |
| 3.26 | 1.26 | β -Glucosa | 2.38 | 1.11 | Piruvato |
| 3.34 | 1.25 | β -Glucosa | 3.66 | 1.10 | Etanol |
| 2.54 | 1.18 | Citrato | 1.14 | 1.09 | NI |
| Ovocitos | 1.16 | | 2.78 | 1.07 | - |
| 3.02 | 1.12 | - | 3.70 | 1.05 | |
| 1.34 | 1.11 | Lactato | 0.86 | 1.05 | Ácidos grasos |
| 2.66 | 1.11 | Citrato, aspartato | 2.74 | 1.04 | - |
| 2.62 | 1.11 | Citrato | 1.70 | 1.04 | - |
| 3.50 | 1.10 | α y β -Glucosa | 0.90 | 1.03 | Ácidos grasos |
| 2.58 | 1.09 | - | 3.58 | 1.02 | Glicina |
| 2.02 | 1.09 | Prolina | 0.94 | 1.01 | Ácidos grasos |
| 3.98 | 1.09 | α y β -Glucosa | 0.98 | 1.00 | Ácidos grasos |
| 3.82 | 1.08 | α y β -Glucosa | | | |
| 3.86 | 1.07 | α y β -Glucosa | | | |
| 2.82 | 1.05 | Aspartato | | | |
| 3.14 | 1.04 | Triptófano | | | |
| 3.90 | 1.03 | α y β -Glucosa | | | |

[a] Los *buckets* con “-“ no fueron asignados debido a la presencia de ruido, señales solapadas o se corresponden con señales de metabolitos no identificados.

El análisis de los *loadings* discriminantes permitió concluir que aquellos medios de cultivo embrionario correspondientes a una calidad morfológica inferior correlacionaron con transferencias en D+5, con un aumento del número de ovocitos, y con un mayor contenido, es decir, un menor consumo por parte de los embriones, de algunos metabolitos entre los que destacaron α y β -glucosa (**Figura 19.3** y **Figura 19.4**, respectivamente), acetoacetato (**Figura 21.16**), lactato (**Figura 19.1**), citrato (**Figura 21.14**), prolina (**Figura 20.6**), triptófano (**Figura 20.11**) y aspartato (**Figura 20.9**). El hecho de que estos medios de cultivo presentasen un mayor contenido de dichos metabolitos podría explicar la baja calidad morfológica de sus embriones.

Finalmente, para validar el modelo estadístico obtenido se le realizaron pruebas de permutación. Mediante estas pruebas se obtienen dos coeficientes, el coeficiente de predicción Q^2 , que refleja la capacidad de predicción del modelo, y el coeficiente de ajuste R^2 , que mide el grado de fiabilidad del modelo ajustado a un conjunto de datos, de forma que valores de R^2 más altos indican un mejor ajuste del modelo. El modelo PLS obtenido en este estudio, presenta un valor de Q^2 bastante bajo ($Q^2 = 0.126$). No obstante, valores de Q^2 bajos se obtienen normalmente para poblaciones muestrales bajas (número reducido de muestras), por lo que, de este modo, sería conveniente profundizar en el estudio mediante un número mayor de muestras de nuevos cultivos embrionarios y añadirlos al modelo para que este fuese totalmente válido.⁷¹

Teniendo en cuenta que estas muestras transferidas en D+5 correlacionaron con una menor calidad morfológica y mostraron una tendencia a un menor consumo de glucosa y de lactato, podemos concluir que nuestros datos concuerdan con los resultados obtenidos por Hardy *et al.*³⁵ y Gott *et al.*³⁶, estudios en los que se concluyó que aquellos embriones que presentaron una fertilización anormal o que detuvieron su desarrollo, presentaron un menor consumo de glucosa, de piruvato y de lactato en D+5, si es que llegaron a estadio de blastocisto. Por otro lado, el aumento en la cantidad registrada de lactato y de acetoacetato podría estar relacionado con la glucólisis, en la cual el piruvato puede reducirse a lactato, y el aumento de citrato podría estar relacionado con la oxidación del piruvato en el ciclo de TCA, que podría explicar el hecho de haber registrado una baja cantidad de dicho compuesto en las muestras de peor calidad embrionaria en comparación con las de una calidad superior. Nuestros resultados también concuerdan en parte con el estudio llevado a cabo por Houghton *et al.*³⁹, quienes registraron que aquellos embriones que llegaron a estadio de blastocisto presentaron un aumento del contenido en aspartato, glutamato y alanina en el medio embrionario, mientras que en nuestro caso registramos un aumento en aspartato, triptófano y prolina. Además, mencionan que aquellos embriones correspondientes a un desarrollo adecuado en D+3 y D+4, presentan una mayor cantidad de aspartato y triptófano, que coincide con los datos obtenidos en nuestro estudio, al observar un aumento de ambos metabolitos.

Por otro lado, aquellos embriones con una mayor calidad morfológica correlacionaron con transferencias embrionarias en D+4 y con un menor consumo, es decir, con un mayor contenido en el medio de cultivo de ácido fórmico, etanol, glicina, piruvato, y de algunos ácidos grasos. Estas muestras de mayor calidad morfológica presentaron un mayor consumo de glucosa y lactato, por lo que estos datos también concuerdan con aquellos obtenidos por Gardner *et al.*³⁸, quienes mencionan que existe un mayor consumo de glucosa en D+4 en embriones de mayor calidad morfológica. El aumento en la cantidad registrada de etanol podría estar

relacionado con la glucólisis, en la cual, el piruvato puede reducirse a etanol y CO₂. El ácido fórmico comenzó a tener relevancia como un posible biomarcador a partir del estudio realizado por Wallace *et al.*⁵², quienes registraron que el aumento de los ratios de formiato con 3-aminoisobutirato, acetato, glutamato, glicina y triptófano en D+2, podría estar relacionado con embarazos clínicos positivos, mientras que, en nuestros resultados obtuvimos que un aumento de la concentración de formiato y de glicina correlaciona con una mayor calidad morfológica embrionaria. Además, encontramos una correlación entre una mejor calidad embrionaria y un aumento de ácidos grasos, los cuales no pueden ser identificados mediante RMN, y que tendrían que ser caracterizados mediante técnicas complementarias.

7. CONCLUSIONES

En este Trabajo de Fin de Grado, en primer lugar, se ha llevado a cabo una breve revisión bibliográfica recogida en la **Tabla A1** sobre aquellas investigaciones involucradas en la mejora de los parámetros de selección embrionaria actuales mediante la búsqueda de metabolitos en el medio de cultivo procedente de embriones humanos. En esta revisión se ha observado una tendencia en la mayoría de los estudios a investigar el metabolismo de carbohidratos en búsqueda de posibles biomarcadores de viabilidad embrionaria, centrándose en concreto en el análisis del consumo de la glucosa y del piruvato, y de la producción de lactosa. En general, se llega a la conclusión de que tanto el piruvato como el lactato son las principales fuentes energéticas hasta el D+3 del ciclo embrionario, y que a partir del D+4, se observa un incremento del consumo de glucosa acompañado de una producción de lactato al medio de cultivo y una disminución en el consumo de piruvato. Además, también se puede observar una tendencia a partir del 2002 a estudiar el consumo o la producción de aminoácidos,³⁹ los cuales han demostrado favorecer el desarrollo embrionario hasta el estadio de blastocisto.

Aunque varios estudios de los mencionados en esta revisión bibliográfica han logrado encontrar diferencias significativas en los perfiles metabólicos entre grupos de embriones implantados con éxito de los que no, y han demostrado la eficacia de la obtención de perfiles metabólicos en combinación a los parámetros de selección embrionaria actuales, la posibilidad de aplicar estos métodos actualmente en las clínicas de fertilidad sigue siendo escasa. Esto es debido a que los perfiles metabólicos en general han demostrado ser poco reproducibles, además de que, dependiendo de la clínica de fertilidad, se emplean distintos volúmenes, medios de cultivo y protocolos de transferencia, por lo que la variabilidad intra-clase debe ser un factor estudiado en estas investigaciones. También hay que tener en cuenta los distintos tipos de medios embrionarios comerciales empleados, ya que, en general se diferencian en la composición de aminoácidos, que puede afectar al comportamiento metabólico. Además, también son factores de importancia la gran variedad de tamaños muestrales que presentan los estudios, ya que, a mayor número, mayor representatividad. También es relevante mencionar que en general las investigaciones se han enfocado en la propia calidad embrionaria, y no tanto en la receptividad del endometrio, no teniéndose en cuenta factores de enfermedades ginecológicas, como el síndrome de ovarios poliquísticos o la endometriosis.³¹

En segundo lugar, se ha realizado un pequeño estudio en el cual se han aplicado métodos de análisis multivariante a datos de RMN de muestras correspondientes a medios embrionarios humanos en D+3, D+4 y D+5 con el objetivo de obtener

perfiles metabolómicos y correlacionarlos con la calidad embrionaria morfológica. En dicho estudio, mediante la técnica RMN se ha logrado la identificación estructural de 16 metabolitos, caracterizándolos mediante espectros monodimensionales y el software *Chenomx* (v. 8.5, Edmonton, Canadá), a falta de tiempo para la confirmación mediante los espectros bidimensionales necesarios. Los metabolitos identificados pertenecen a la clase de los ácidos orgánicos (lactato, acetato, acetoacetato, piruvato, citrato y formiato), de los aminoácidos (alanina, prolina, glutamato, glutamina, aspartato, prolina, glicina y triptófano), de los hidratos de carbono (α y β -glucosa), y de los alcoholes (etanol).

Tras la identificación, se aplicaron métodos estadísticos PCA y PLS, siendo este último el que permitió identificar los metabolitos y variables más correlacionadas con una mejor y peor calidad embrionaria. Para ello, se llevó a cabo un análisis VIP, en el cual se seleccionaron aquellos metabolitos contenidos en los *buckets* que presentaron un valor de VIP superior a 1. Mediante este análisis se llegó a la conclusión de que aquellos medios de cultivo embrionario de una calidad morfológica inferior correlacionaron con transferencias en el D+5, con un aumento del número de ovocitos, y con un menor consumo de glucosa, acetoacetato, lactato, citrato, prolina, triptófano y aspartato. También se concluyó que, por otro lado, aquellas muestras de calidad morfológica superior correlacionaron con transferencias realizadas en D+4 y con un menor consumo de formiato, etanol, glicina, piruvato y de algunos ácidos grasos. Sin embargo, el modelo PLS obtenido en este estudio presentó un valor de Q^2 relativamente bajo ($Q^2 = 0.126$), lo que indica que no es un modelo estadísticamente representativo, y que sería necesario obtener un número mayor de muestras procedentes de nuevos cultivos embrionarios para poder validar el modelo en su totalidad. Además, las señales obtenidas correspondientes a distintos ácidos grasos no pudieron ser identificadas mediante ^1H -RMN, por lo que sería interesante llevar a cabo su caracterización mediante otras técnicas analíticas como GC-FID. En conclusión, aunque no se ha obtenido un modelo representativo, este estudio revela una diferencia en el contenido de metabolitos presentes en el medio de cultivo correspondientes a embriones de distintas calidades morfológicas embrionarias.

Por otro lado, debido a la falta de historiales clínicos, no ha podido llevarse a cabo un estudio que correlacione los datos de ^1H -RMN con la implantación o embarazo, por lo que sería de interés llevar a cabo un estudio metabolómico empleando RMN con un mayor número de muestras y que correlacionara el medio de cultivo embrionario con el éxito de embarazo. Además, podría ser interesante analizar las diferencias en los metabolitos observados en este estudio entre distintos medios de cultivo embrionario comerciales y entre distintas cantidades de muestra recogidas, ya que estos parámetros varían en función de la clínica de fertilidad en la que se lleve a cabo el proceso de FIV.

8. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Mascarenhas, M. N.; Flaxman, S. R.; Boerma, T.; Vanderpoel, S.; Stevens, G. A. *Plos Med* **2012**, 9, e1001356.
- (2) Messinis, I. E.; Messini, C. I.; Daponte, A.; Garas, A.; Mahmood T. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **2016**, 207, 200–204.
- (3) Matorras-Weinig, R.; Coroleu-Lletget, B.; Romeu-Sarrió, A.; Pérez-Milán, F.; *Libro blanco sociosanitario. La Infertilidad en España: Situación Actual y Perspectivas*; Imago Concept & Image Development, S.L.; Matorras-Weinig, R. (ed), Madrid **2011**.

- (4) FIVMadrid; Clínicas de Reproducción Asistida; *Causas del incremento de infertilidad en el mundo*; **2018**. [Online] <https://fivmadrid.es/causas-del-incremento-infertilidad-mundo/> (Página accedida a 19 de noviembre de 2019).
- (5) INE (Instituto Nacional de Estadística); *Edad media de las mujeres embarazadas, desde 1990 hasta 2018*. [Online] <https://www.ine.es/jaxiT3/Datos.htm?t=1579> (Página accedida a 19 de noviembre de 2019).
- (6) De Geyter, C.; *More than 8 million babies born from IVF since the world's first in 1978*; ESHRE Press releases, **2018**. [Online] <https://www.eshre.eu/Annual-Meeting/Barcelona-2018/ESHRE-2018-Press-releases/De-Geyter> (Página accedida a 19 de noviembre de 2019).
- (7) Zhu, J.; Zhu, Q.; Wang, Y.; Wang, B.; Lyu, Q.; Kuang, Y. *Syst Biol Reprod Med* **2019**, *65*, 54-60.
- (8) Pudakalakatti, S. M.; Uppangala, S.; D'Souza, F.; Kalthur, G.; Kumar, P.; Adiga, S. K.; Atreya, H. S. *NMR Biomed* **2013**, *26*, 20-27.
- (9) Ortiz-Movilla, R.; Acevedo-Martín, B. *Rev Pediatr Aten Primaria* **2010**, *12*, 1139-7632.
- (10) WHO; *WHO Laboratory manual for the Examination and processing of human semen*; 5th Ed, WHO Press, **2010**. [Online] https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44261/9789241547789_eng.pdf;jsessionid=B8AA949AE0DB719D903A7CA29AAD988F?sequence=1 (Página accedida a 18 de mayo de 2020).
- (11) Muruamendiaraz, J.; Canyelles, A.; *Con un poco de ayuda: Blog de Reproducción Asistida*; **2017**. [Online] <https://conunpocodeayuda.wixsite.com/conunpocodeayuda/single-post/2017/08/21/FECUNDACION%20IN-VITRO-%20BFQU%2089-ES> (Página accedida a 19 de noviembre de 2019).
- (12) Zafra, A.; *El Supremo anula el despido de una profesora por someterse a fecundación "in vitro"*; Diario16: El diario de la Segunda Transición **2017**. [Online] <https://diario16.com/supremo-anula-despido-una-profesora-someterse-fecundacion-in-vitro/> (Página accedida a 19 de noviembre de 2019).
- (13) *¿En qué consiste la fecundación In Vitro?*; IVI: Reproducción Asistida **2020**. [Online] <https://ivi.es/tratamientos-reproduccion-asistida/fecundacion-in-vitro/> (Página accedida a 4 de diciembre de 2019).
- (14) Hurtado de Mendoza y Acosta, M. V.; Cuadros-Fernández, J.; De los Santos-Molina, M. J.; Figueroa-García, M. J.; Prados-Mondéjar, F. J.; Arroyo-Cardona, G.; Busquets-Bonet, A.; García-Cerrudo, E.; González-Soto, B.; Moragas-Solanes, M.; Mugica de la Iglesia, A.; Pons-Gatell, M. C.; Vilches-Ferrón, M. A.; *Cuaderno de embriología clínica. Criterios ASEBIR de Valoración Morfológica de Oocitos, Embriones Tempranos y Blastocistos Humanos*; 3ª Edición **2015**.
- (15) *Cultivo de embriones hasta blastocisto*; Medicina de la Reproducción: Hospitales HM Fertility Center; Tratamientos de Reproducción Asistida. [Online] <https://www.hmfertilitycenter.com/reproduccion-asistida/tratamientos-reproduccion-asistida/cultivo-de-embriones-hasta-blastocisto> (Página accedida a 4 de diciembre de 2019).
- (16) Eva Fertility Clinics; *¿En qué consiste el cultivo de embriones hasta blastocisto?*; Eva Fertility Clinics: Diagnóstico Genético **2015**. [Online] <https://www.evafertilityclinics.es/novedades-fecundacion-in-vitro/en-que-consiste-el-cultivo-de-embriones-hasta-blastocisto/> (Página accedida a 4 de diciembre de 2019).
- (17) Dexeus mujer; *Todo lo que necesita saber sobre la Fecundación In Vitro*; Dexeus mujer: Fecundación *in vitro*. [Online] <https://www.dexeus.com/informacion-de-salud/enciclopedia-ginecologica/medicina-de-la-reproduccion/fecundacion-in-vitro> (Página accedida a 4 de diciembre de 2019).
- (18) Neri-Vidaurre, P.; Rojas-Hernández, E. M.; Vielma-Valdez, A.; Serviere-Zaragoza, C. *Ginecol Obstet Mex* **2018**, *86*, 597-605.
- (19) ESHRE; *ART Fact sheet*; Press Information; 18 febrero **2018**.
- (20) Seli, E.; Botros, L.; Sakkas, D.; Burns, D. H. *Fertil Steril* **2008**, *90*, 6.
- (21) Ley 14/2006 de 25 de mayo sobre Técnicas de Reproducción Asistida. Boletín Oficial del Estado, 27 de mayo de 2006, núm. 126, España.
- (22) ESHRE; *ART Fact sheet*; Press Information; 4 enero **2017**.
- (23) Informe estadístico de Técnicas de Reproducción Asistida 2017; Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social; Registro Nacional de Actividad **2017** - Registro SEF. [Online]

- https://cnrha.sanidad.gob.es/registros/pdf/Informe_estadisticoSEF_2017.pdf (Página accedida a 15 de diciembre de 2019).
- (24) Factores pronósticos en FIV-ICSI; Recomendaciones SEF (18). [Online] <https://www.sefertilidad.net/docs/biblioteca/recomendaciones/factoresFIV.pdf> (Página accedida a 15 de diciembre de 2019).
- (25) Martínez-Sanz, E.; Barrenetxea-Ziarrusta, G.; De Pablo, J. L.; Salvador, Z.; *Clasificación de los embriones según su día de desarrollo*; Reproducción Asistida ORG **2019**. [Online] <https://www.reproduccionasistida.org/clasificacion-embryones-calidad/#categorias-de-calidad-embryonaria> (Página accedida a 20 de diciembre de 2019).
- (26) Gutiérrez-Aguilar, R.; Frigolet-Vázquez, M.E.; *Ciencias Ómicas, ¿cómo ayudan a las ciencias de la salud?*; Revista digital universitaria **2017**, 18(7).
- (27) Bernal-Ruiz, M. L.; *La era de las ciencias ómicas*; Colegio Oficial de Farmacéuticos de Aragón **2015**, Zaragoza.
- (28) Yanes, O.; *Metabólica: la ciencia Ómica más multidisciplinaria*; Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular, **2020**.
- (29) Sánchez-Ribas, I.; Domínguez, F.; Simón, C.; *Metabólica y Reproducción Humana*; Revista ASEBIR **2010**, 15(1).
- (30) Calomarde-González, C.; Carmona-Saborido, L.; Guerra-Juan, I.; Gutiérrez-Pascual, D.; Santana-Martín, A.; Domingo del Pozo, *J Rev Iberoam Fert Rep Hum* **2016**, 33, 67-72.
- (31) Bracewell-Milnes, T.; Saso, S.; Abdalla, H.; Nikolau, D.; Norman-Taylor, J.; Johnson, M.; Holmes, E.; Thum, M. Y. *Hum Reprod* **2017**, 23, 723-736.
- (32) Base de datos *Web Of Science*. [Online] https://apps.webofknowledge.com/UA_GeneralSearch_input.do?product=UA&search_mode=GeneralSearch&SID=FIArCdmHurumgsKc6yW&preferencesSaved= (Página accedida a 5 de mayo de 2020).
- (33) Software CitnetExplorer ver. 1.0.0, **2020**; Centre for Science and Technology Studies, Leiden University, The Netherlands.
- (34) Software VosViewer ver. 1.6.15, **2020**; Centre for Science and Technology Studies, Leiden University, The Netherlands.
- (35) Hardy, K.; Hooper, M. A. K.; Handyside, A. H.; Rutherford, A. J.; Winston, R. M. L.; Leese, H. J. *Hum Reprod* **1989**, 4, 188-191.
- (36) Gott, A.L.; Hardy, K.; Winston, R. M. L.; Leese, H. J. *Human Reprod* **1990**, 5, 104-108.
- (37) Conaghan, J.; Hardy, K.; Handyside, A. H.; Winston, R. M.; Leese, H. J. *J Assist Reprod Genet* **1993**; 10, 21-30.
- (38) Gardner, D. K.; Lane, M.; Stevens, J.; Schoolcraft, W. B. *Fertil Steril* **2001**, 76, 1175-1180.
- (39) Houghton, F. D.; Hawkhead, J. A.; Humpherson, P. G.; Hogg, J. E.; Balen, A. H.; Rutherford, A. J.; Leese H. J. *Hum Reprod*, **2002**, 17, 999-1005.
- (40) Brison, D. R.; Houghton, F. D.; Falconer, D.; Roberts, S. A.; Hawkhead, J.; Humpherson, P. G.; Lieberman, B. A.; Leese, H. J. *Hum Reprod* **2004**, 19, 2319-2324.
- (41) Seli, E.; Sakkas, D.; Scott, R.; Kwok, J. S.; Rosendahl, S.; Burns, D. H. *Fertil Steril* **2007**, 88, 1350-1357.
- (42) Vergouw, C. G.; Botros, L.; Roos, P.; Lens, J. W.; Schats, R.; Hompes, P. G. A.; Burns, D. H.; Lambalk, C. B. *Hum Reprod* **2008**, 23, 1499-1504.
- (43) Scott, R.; Seli, E.; Miller, K.; Sakkas, D.; Scott K.; Burns, D.H. *Fertil Steril* **2008**, 90, 77-83.
- (44) Seli, E.; Vergouw, C. G.; Morita, H.; Botros, L.; Roos, P.; Lambalk, C. B.; Yamashita, N.; Kato, O.; Sakkas, D. *Fertil Steril* **2010**, 94, 535-542.
- (45) Ahlström, A.; Wikland, M.; Rogberg, L.; Siques-Barnett, J.; Tucker, M.; Hardarson, T. *Reprod Biomed* **2011**, 22, 477-484.
- (46) Marhuenda-Egea, F. C.; Gonsálvez-Álvarez, R.; Martínez-Sabater, E.; Lledó, B.; Ten, J.; Bernabeu, R. *Metabolomics* **2011**, 7, 247-256.
- (47) Vergouw, C. G.; Kieslinger, D. C.; Kosteljik, E. H.; Botros, L.; Schats, R.; Hompes, P. G.; Sakkas, D.; Lambalk, C. B. *Hum Reprod* **2012**, 27, 2304-2311.
- (48) Rinaudo, P.; Shen, S.; Hua, J.; Qian, S.; Prabhu, U.; García, E.; Cedars, M.; Sukumaran, D.; Szyperski, T.; Andrews, C. *J Assist Reprod Gen* **2012**, 29, 1435-1442.

- (49) Sfontouris, I. A.; Lainas, G. T.; Sakkas, D.; Zorzovilis, I. Z.; Petsas, G. K.; Lainas, T. G. *J Hum Reprod Sci* **2013**, *6*, 133-139.
- (50) Nadal-Desbarats, L.; Veau, S.; Blasco, H.; Emond, P.; Royere, D.; Andres, C. R.; Guérif, F. *Magn Reson Mater Phy*, **2013**, *26*, 193-202.
- (51) Fu, J.; Shao, J.; Li, X.; Xu, Y.; Liu, S.; Sun, X. *Acta Biochim Biophys* **2013**, *45*, 1074-1078.
- (52) Wallace, M.; Cottell, E.; Cullinane, J.; McAuliffe, F. M.; Wingfield, M.; Brennan, L. *Syst Biol Reprod Med*, **2014**, *60*, 58-63.
- (53) Kirkegaard, K.; Svane, A. S. P.; Nielsen, J. S.; Hindkjær, J. J.; Nielsen, N. C.; Ingerslev, H. J. *Hum Reprod*, **2014**, *29*, 2413-2420.
- (54) Rubessa, M.; Ambrosi, A.; Gonzalez-Pena, D.; Polkoff, K. M.; Wheeler, M. B. *Metabolomics* **2018**, *14*, 113.
- (55) Botros, L.; Sakkas, D.; Seli, E. *Hum Reprod* **2008**, *14*, 679-690.
- (56) McRae, C.; Sharma, V.; Fisher, J. *Int J Reprod Med* **2013**, ID:603167.
- (57) Olmedo-Illueca, C.; *Modelo predictivo de implantación embrionaria basado en el perfil metabólico del medio de cultivo obtenido mediante Resonancia Magnética Nuclear*; Universidad Miguel Hernández de Elche, Facultad de Medicina, Tesis doctoral, **2015**.
- (58) Tomassini, A.; Capuani, G.; Delfini, M.; Miccheli, A. Elsevier **2013**, *28*, 411-447.
- (59) Declaración de Helsinki de la asociación Médica Mundial; *Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos* (referencia **1964/1975/2000**).
- (60) Abreu, A. C.; Fernández, I. Nuclear magnetic resonance to study bacterial biofilms structure, formation and resilience (chapter 2). *Recent Trends in Biofilm Science and Technology*; Simões M. (ed.), Elsevier **2020**, 23-70.
- (61) Rødgaard, T.; Heegaard, P. M. H.; Callesen, H. *Reprod Biomed* **2015**, *31*, 585-592.
- (62) Castejón-Ferrer, D.; *Avances en el Estudio de Matrices Alimentarias mediante RMN metabólica*; Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Ciencias Químicas, Tesis doctoral, **2015**.
- (63) Fernández de las Nieves, I. *Advanced NMR Methods and Metal-Based Catalysts*; **2019**. [Online] <http://www2.ual.es/NMRMBC/content/gallery-pictures> (Página accedida a 23 de enero de 2020).
- (64) Lavine, B.; Workman, J.; *Chemometrics*; *Anal Chem* **2008**, *80*, 4519-4531.
- (65) Cáceres-Gianni, J. O. *Desarrollo y aplicación de métodos quimiométricos para el estudio de muestras mediante Espectroscopía de Ablación Láser (LIBs)*; Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Ciencias Químicas, Tesis doctoral, **2017**.
- (66) Trygg, J.; Holmes, E.; Lundstedt, T. *J Proteome Res* **2007**, *6*, 469-479.
- (67) Software Metaboanalyst. Página web [Online] <https://www.metaboanalyst.ca/> (Página accedida a 27 de mayo de 2020).
- (68) Lewis, N.; Sturmey, R. G. *Anim Reprod* **2015**, *12*, 521-528.
- (69) Dunning, K. R.; Cashman, K.; Russell, D. L.; Thompson, J. G.; Norman, R. J.; Robker, R. L. *Biol Reprod* **2010**, *83*, 909-18.
- (70) Kostidis, S.; Kokova, D.; Dementeva, N.; Saltykova, I. V.; Kim, H. K.; Choi, Y. H.; Mayboroda, O. A. *BMC Infectious Diseases* **2017**, *17*, 275.
- (71) Fresno, R. V. *Estudio metabólico de biomarcadores nutricionales en estudios de intervención mediante resonancia magnética nuclear. Intervención con alimentos, complementos y patrones alimentarios*. Universidad de Barcelona, Tesis doctoral, **2015**.

ANEXOS

ANEXO 1: INFORMACIÓN OBTENIDA EN LA REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Tabla A1. Estudios metabolómicos realizados hasta la fecha ordenados cronológicamente.[a]

| Estudio | Técnica analítica | Equipo de RMN (MHz) | Tipo de sonda | Diámetro tubo RMN (mm) | Número muestras | Día del ciclo | Conclusión* |
|---|--------------------------|---------------------|---------------|------------------------|-----------------|---------------|--|
| Hardy <i>et al.</i> ³⁸ (1989) | Ultramicro-fluorescencia | - | - | - | 73 | +2-4 | Consumo pir aumenta, glc estable;* |
| | | | | | | +5 | Consumo pir y glc aumentan.* |
| Gott <i>et al.</i> ³⁹ (1990) | Ultramicro-fluorescencia | - | - | - | 40 | +2-4 | Consumo pir aumenta, glc estable;* |
| | | | | | | +5 | Consumo pir y glc aumentan; producción lac.* |
| Conaghan <i>et al.</i> ⁴⁰ (1993) | Ultramicro-fluorescencia | - | - | - | - | +2 y +3 | Tasa de implantación inversamente proporcional al consumo de pir.* |
| Gardner <i>et al.</i> ⁴¹ (2001) | Ultramicro-fluorescencia | - | - | - | 73 | +4 | Consumo pir y glc aumentan;* Mayor consumo de glc en embriones de mejor calidad. |
| Houghton <i>et al.</i> ⁴² (2002) | HPLC | - | - | - | - | +2 | Consumo/producción de aminoácidos correlaciona con mejor desarrollo embrionario. Menor consumo de gln, arg y met, y baja producción de ala y asp;* |

| | | | | | | | |
|---|--------------------|-----|--|---|----------------------|---------|---|
| | | | | | | +3 | Consumo/producción de aminoácidos correlaciona con mejor desarrollo embrionario. Menor consumo de ser, menor producción ala y gli.* |
| Brison <i>et al.</i> ³⁴ (2004) | HPLC | - | - | - | 53 | +2 | Consumo/producción de aminoácidos (bajos niveles de gli y leu, y mayores niveles de asp) correlaciona con implantación y embarazo. |
| Seli <i>et al.</i> ³⁵ (2007) | NIR y Raman | - | - | - | 69 (de 30 pacientes) | +2 y +3 | Índices de viabilidad superiores en preembriones que implantan con éxito. |
| Vergouw <i>et al.</i> ⁴³ (2008) | NIR | - | - | - | 333 pacientes | +2 y +3 | Perfiles NIR correlacionan con viabilidad embrionaria. |
| Scott <i>et al.</i> ³⁶ (2008) | Raman | - | - | - | 41 (de 19 pacientes) | +3 y +5 | Correlación entre perfiles Raman de ambos días con viabilidad embrionaria. |
| Seli <i>et al.</i> ²⁰ (2008) | ¹ H-RMN | 500 | Criosonda de triple resonancia (¹ H, ¹³ C, ¹⁵ N) | 5 | 34 | +3 | Aumento de glu en preembriones que implantaron. Perfiles metabolómicos correlacionan con viabilidad. |

| | | | | | | | |
|--|--------------------|-----|--|---|----------------------------|-------------|--|
| Seli <i>et al.</i> ⁴⁴ (2010) | NIR | - | - | - | 304 (en D+3), 104 (en D+2) | +2 y +3 | No hay relación entre parámetros morfológicos y el perfil metabólico pero hay correlación entre perfil metabólico y potencial de implantación. |
| Ahlstrom <i>et al.</i> ⁴⁵ (2011) | NIR | - | - | - | 137 | +5 | Correlación entre viabilidad embrionaria y tasa de implantación. |
| Marhuenda-Egea <i>et al.</i> ⁴⁶ (2011) | ¹ H-RMN | 400 | Sonda ¹ H-BB- ¹³ C TBI de 5 mm con gradientes en Z | 5 | 46 (de 23 pacientes) | +3 | Perfiles metabólicos de aminoácidos correlacionan con viabilidad embrionaria. |
| Vergouw <i>et al.</i> ⁴⁷ (2012) | NIR | - | - | - | | +3 | No es necesario el uso de NIR para asistir a los parámetros morfológicos. |
| Rinaudo <i>et al.</i> ⁴⁸ (2012) | ¹ H-RMN | 600 | Microsonda de flujo (PROTASIS®) y criosonda[b] | 5 | 228 (108 pacientes) | +3 | No se apreció correlación entre perfiles metabólicos y viabilidad embrionaria. |
| Pudakalakatti <i>et al.</i> ⁸ (2013) | ¹ H-RMN | 500 | Criosonda de triple resonancia (¹ H, ¹³ C, ¹⁵ N) | 5 | 127 (48 pacientes) | +2 y +3 | Ratio pir/ala correlaciona con viabilidad embrionaria en día 3. |
| Sfontouris <i>et al.</i> ⁴⁹ (2013) | NIR | - | - | - | 125 pacientes | +2, +3 y +5 | Aunque no se observó mejora en la predicción de la viabilidad embrionaria, se apreció una mejora de la tasa de implantación en día 5. |

| | | | | | | | |
|--|--------------------|-----|--|-----|------------------------|---------|---|
| Nadal-Desbarats <i>et al.</i> ⁵⁰ (2013) | ¹ H-RMN | 500 | Microsonda inversa TXI (¹ H, ¹³ C, ³¹ P) con gradientes en Z | 5 | 39 | +5 | No se encontró diferencia estadística entre preembriones con alto y bajo potencial de desarrollo. |
| Fu <i>et al.</i> ⁵¹ (2013) | NIR | - | - | - | 239 (172 pacientes) | +3 | Correlación entre los perfiles metabolómicos y la tasa de implantación embrionaria. |
| Wallace <i>et al.</i> ⁵² (2014) | ¹ H-RMN | 600 | [b] | [b] | 58 (de 37 pacientes) | +2 | El aumento de las ratios form con 3-aminoisobutirato, acet, glu, gli y trp, y la disminución de la ratio cit/ala, pueden predecir el éxito en las transferencias. |
| Kirkegaard <i>et al.</i> ⁵³ (2014) | ¹ H-RMN | 500 | Sonda inversa de triple resonancia TXI 5 mm | 5 | 148 (de 161 pacientes) | +3 y +5 | No se apreció correlación entre perfiles metabólicos y viabilidad embrionaria. |
| Rubessa <i>et al.</i> ⁵⁴ (2018) | ¹ H-RMN | 750 | Criosonda de 5 mm PFG de triple resonancia (¹ H, ¹³ C, ¹⁵ N) | 5 | [b] | +1-3 | Contenido en MI y cit decrece; mayor consumo aminoácidos y aumento de lac (sólo en día 3);* |
| | | | | | | +5-7 | Concentración máxima de form;* Pir constante todo el ciclo. |

[a] Las casillas con “-“ simbolizan estudios en dónde no se ha empleado la RMN como técnica analítica.

[b] No se especifican características.

* En muestras de medios correspondientes a preembriones con un desarrollo exitoso hasta blastocisto; Abreviaturas: acet - acetato, ala – alanina, asp - aspartato cit – citrato, form – formiato, glc – glucosa, gli – glicina, gln – glutamina, glu – glutamato, met – metionina, MI – mioinositol, lac – lactato, pir – piruvato, trp – triptófano.