

# Fertility & Sterility

**Artículos Seleccionados Traducidos**



# FERTILITY AND STERILITY

## Editor-in-Chief:

Alan H. DeCherney, M.D.  
Chief, Reproductive Biology and Medicine Branch,  
National Institutes of Health, Bethesda, Maryland

A Publication of the American  
Society for Reproductive Medicine

[www.fertstert.org](http://www.fertstert.org)

ISSN: 0015-0262

For more information about  
submission to *Fertility & Sterility*,  
please contact:

Eric Steinmull, Managing Editor  
*Fertility and Sterility* Editorial Office  
American Society for Reproductive  
Medicine

1209 Montgomery Highway  
Birmingham, AL 35216-2809  
Tel: 205-978-5000

Email: [esteinmull@asrm.org](mailto:esteinmull@asrm.org)

Submit manuscripts online at  
<http://ees.elsevier.com/fst>

For information about  
advertising in *Fertility & Sterility*,  
please contact:

Carol Clark  
Elsevier  
360 Park Avenue South  
New York, New York 10010

Tel: 212-633-3719

Fax: 212-633-3820

Email: [ca.clark@elsevier.com](mailto:ca.clark@elsevier.com)



ELSEVIER 1105560/04

*Fertility and Sterility* is a monthly international journal for obstetricians, gynecologists, reproductive endocrinologists, urologists, basic scientists and others who treat and investigate problems related to infertility and other human reproductive conditions.

The Journal publishes peer-reviewed original scientific articles in clinical and laboratory research relevant to reproductive endocrinology, urology, andrology, physiology, immunology, genetics, contraception, and menopause.

*Fertility and Sterility* encourages and supports meaningful basic and clinical research, and facilitates and promotes excellence in professional education, in the field of reproductive medicine.

Access to [www.us.fertstert.org](http://www.us.fertstert.org) is included with your paid subscription!

## For more information or to order, contact

### Phone:

1-800-654-2452 (U.S. and Canada)

1-314-453-7041 (other countries)

### Visit:

[www.us.elsevierhealth.com](http://www.us.elsevierhealth.com)

## Perfil metabólico no invasivo como un complemento de la evaluación morfológica embrionaria no invasiva en mujeres que realizan transferencia de un único embrión

### *Noninvasive metabolomic profiling as an adjunct to morphology for noninvasive embryo assessment in women undergoing single embryo transfer*

Emre Seli, M.D.,<sup>a</sup> Carlijn G. Vergouw, M.Sc.,<sup>b</sup> Hiroshi Morita, B.Agr.,<sup>c</sup> Lucy Botros, M.Sc.,<sup>d</sup> Pieter Roos, Ph.D.,<sup>d</sup> Cornelius B. Lambalk, M.D., Ph.D.,<sup>b</sup> Naoki Yamashita, M.D.,<sup>c</sup> Osamu Kato, M.D.,<sup>c</sup> and Denny Sakkas, Ph.D.<sup>a,d</sup>

<sup>a</sup>Department of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Sciences, Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut; <sup>b</sup>Department of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Medicine, VU University Medical Center, Amsterdam, the Netherlands; <sup>c</sup>Kato Ladies Clinic, Tokyo, Japan; and <sup>d</sup>Molecular Biometrics Inc., New Haven, Connecticut

#### **Resumen**

**Objetivo:** *Determinar si el perfil metabólico de medio de cultivo embrionario utilizado se correlaciona con el potencial reproductivo de embriones humanos.*

**Diseño:** *Estudio retrospectivo.*

**Ámbito:** *Programas académicos y privados de Técnicas de Reproducción Asistida.*

**Paciente(s):** *Mujeres que realizan transferencia de un embrión único después de FIV.*

**Intervención(es):** *El medio de cultivo utilizado fue recolectado después de la transferencia de un único embrión en día 3 (n=304) o día 2 (n= 181) y analizado por espectrometría de infrarrojo cercano. Las regiones de espectrometría de infrarrojo cercano fueron correlacionadas al potencial reproductivo, usando un algoritmo de optimización genético. Los modelos de estas regiones espectrales fueron utilizadas para calcular los índices de viabilidad, y fueron validados por un análisis cegado de un grupo de muestras (n= 60). Las tasas de implantación fueron también comparadas entre los embriones de más altos ( $\geq 0,3$ ) y más bajos ( $< 0,3$ ) índices de viabilidad, y con los grados de morfología de cada uno.*

**Principales resultados obtenidos:** *índice de viabilidad y la viabilidad embrionaria.*

**Resultado(s):** *Los índices de viabilidad de los embriones que resultaron en actividad cardíaca fetal positiva fueron significativamente mayores comparados con los embriones que no lo obtuvieron, tanto para embriones de día 2, como de día 3. La validación cegada del modelo de día 2 probó ser significativa. Los índices de viabilidad crecientes se correlacionaron con un incremento en los embarazos. Los índices de viabilidad resultaron ser independientes de la morfología de embriones en día 2 y en día 3. Las tasas de implantación fueron significativamente mayores cuando los índices de viabilidad fueron  $\geq 0,3$ .*

**Conclusión(es):** *El perfil metabólico del medio de cultivo de embriones humanos utilizando espec-*

trometría infrarroja cercana es independiente de la morfología y se correlaciona con el potencial reproductivo de los embriones.

**Palabras clave:** Evaluación no invasiva de embriones. Transferencia única de un embrión. Infrarrojo cercano. Espectrometría. Perfil metabolómico. Fecundación in vitro.

### **Summary**

**Objective:** *To determine whether metabolomic profiling of spent embryo culture media correlates with reproductive potential of human embryos.*

**Design:** *Retrospective study.*

**Setting:** *Academic and a private assisted reproductive technology (ART) programs.*

**Patient(s):** *Women undergoing single embryo transfer after IVF.*

**Intervention(s):** *Spent embryo culture media were collected after single embryo transfer on day 3 (n = 304) or day 2 (n = 181) and analyzed by near infrared spectroscopy. Near infrared spectral regions were correlated to reproductive potential using a genetic algorithm optimization. Models of these spectral regions were used to calculate viability indices, and were validated by blinded analysis of a subset (n = 60) of samples. Implantation rates were also compared between embryos of higher ( $\geq 0.3$ ) and lower ( $< 0.3$ ) viability indices, and within each morphology grade.*

**Main Outcome Measure(s):** *Viability index and embryo viability.*

**Result(s):** *Mean viability indices of embryos that resulted in positive fetal cardiac activity were significantly higher compared with embryos that did not for both day 2 and day 3 embryos. Blinded validation of the day 2 model proved to be significant. Increasing viability index values correlated with an increase in pregnancy. Viability indices were found to be independent of morphology for both day 2 and day 3 embryos. Implantation rates were significantly higher among embryos with viability indices  $\geq 0.3$ .*

**Conclusion(s):** *Metabolomic profiling of human embryo culture media using near infrared spectroscopy is independent of morphology and correlates with reproductive potential of embryos. (Fertil Steril® 2010; 94: 535–42. ©2010 by American Society for Reproductive Medicine.)*

**Key words:** Noninvasive embryo assessment. Single embryo transfer (SET). Near infrared (NIR). Spectroscopy, Metabolomic profiling. In vitro fertilization (IVF).

En más de 90% de los ciclos de FIV realizados en los Estados Unidos, múltiples embriones son simultáneamente transferidos para maximizar la posibilidad de un recién nacido vivo (1). Consecuentemente, más del 30% de los embarazos por FIV son gemelares o gestaciones múltiples, y más de la mitad de todos los neonatos por FIV son producto de gestaciones múltiples (2), una frecuencia 15 a 20 veces mayor que las concepciones espontáneas (3).

Las tasas de embarazo (PR) múltiples elevadas asociadas con FIV tienen una consecuencia en la salud pública (4). Además de arriesgar la salud de la madre, incrementando de 2 a 4 veces la hipertensión inducida por el embarazo y hemorragia postparto (5); las tasas incrementadas de partos pretérmino en embarazos de múltiples infantes, compromete la supervivencia de neonatos e incrementa su riesgo de discapacidad de por vida (6, 7). Consecuentemente, las

complicaciones médicas y económicas asociadas con embarazos múltiples han obligado a numerosos países a imponer restricciones legales en el número de embriones transferidos en ciclos de FIV (4). Desafortunadamente, aunque se han emitido guías sobre el número de embriones a transferir en los Estados Unidos (8), su efectividad ha sido limitada debido a las propias presiones económicas de los pacientes y de los proveedores de FIV deseando proteger sus tasas de éxito públicamente reportadas.

Otro problema significativo asociado con el FIV es la falla de aproximadamente 8 de 10 embriones transferidos para implantar y el fallo de 2 de 3 ciclos de FIV para lograr un embarazo (4, 9, 10). Nuestra inhabilidad para determinar los embriones con el más alto potencial reproductivo parece ser al menos en parte responsable de los ciclos de FIV fallidos, por ejemplo las mujeres bajo FIV que utilizan embriones

congelados después de ciclos en fresco fallidos que consiguen un 7%-11% de tasas de implantación por embrión transferido y un 13%-17% de tasas de embarazos en curso por transferencia (11, 12).

Para incrementar las tasas de implantación, y limitar los embarazos múltiples, una mejora de las metodologías de análisis utilizadas actualmente sería beneficioso. Esta motivación ha movilizó a muchos investigadores a proponer nuevas tecnologías para determinar el potencial reproductivo de cada embrión. Varios parámetros metabólicos de los embriones en desarrollo y de los medios de cultivo embrionario utilizados han sido estudiados utilizando una variedad de técnicas no invasivas (13). Por ejemplo, Gardner y colegas (14) reportaron que la captación de glucosa fue mayor en blastocitos humanos de mayor grado, mientras Brison et al. (15) encontraron que la asparagina elevada, y los niveles de glicina y leucina disminuida en el medio de cultivo embrionario correlacionan con los embarazos. Esto y un número significativo de estudios adicionales sugieren que los embriones con un potencial reproductivo positivo y negativo alternan su ambiente en forma diferente y que esto es reflejado en los metabolitos que los rodean (4).

La completa serie de metabolitos moleculares pequeños que son encontrados dentro de un sistema biológico constituye el metaboloma (16). La metabolómica estudia este inventario dinámico de metabolitos como pequeños biomarcadores moleculares representando al fenotipo funcional en un sistema biológico, e intenta determinar y cuantificar los metabolitos asociados con los estados fisiológicos y patológicos (17). Hemos reportado recientemente que el perfil metabolómico no invasivo de los medios de cultivo embrionario usando Raman o espectrometría infrarroja cercana (NIR) (técnicas analíticas vibracionales adecuadas para el análisis veloz de muestras acuosas [revisado en Ref. 18]) se correlaciona con los embarazos obtenidos en mujeres realizando FIV (19). También hemos realizado dos estudios cegados con tamaño muestral pequeño y demostraron que los modelos metabolómicos desarrollados usando NIR o Raman pueden predecir viabilidad embrionaria (19, 20).

En el estudio actual, primero determinamos si un modelo metabolómico robusto utilizando NIR para predecir potencial reproductivo de embriones individuales puede ser establecido usando un gran número de muestras derivadas de transferencia de un único embrión (SET) en día 3 y en día 2. Luego, en un análisis cegado de 60 muestras de día 2, examinamos si nuestro modelo es predictivo de resultados de embarazo. Finalmente, estudiamos si combinando los análisis metabolómicos no invasivos de los medios de

cultivo embrionario con el estudio de la morfología puede ayudar a aumentar la determinación del potencial reproductivo de los embriones en FIV.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Selección de pacientes, tratamiento, y recolección de muestras

Todas las pacientes participantes en el estudio fueron reclutadas del Centro Universitario Médico VU (VUMC) en Amsterdam, Holanda, y Clínica de Mujeres Kato (KLC) en Tokio, Japón. Se obtuvo la aprobación del Comité de Revisión Institucional (IRB) en cada centro antes del inicio del estudio. Todas las pacientes que realizaron FIV y SET desde julio de 2006 a abril de 2007 en VUMC, y desde enero hasta abril de 2007 en KLC fueron considerados para la participación en el estudio.

En VUMC, los protocolos de estimulación fueron realizados como se describió previamente (21, 22). Rápidamente, las pacientes menores de la edad de 38 años o con respuesta previa buena en un tratamiento de FIV, realizaron hiperestimulación ovárica controlada (COH) con un protocolo largo con GnRH agonistas (GnRH-a) (Decapeptyl; Ferring, Copenhagen, Dinamarca) y gonadotropinas (Gonal F; Serono, Génova, Suiza; Puregon; Organon, Oss, Holanda; o Menopur; Ferring). En mujeres mayores de 38 años o con respuesta previa pobre se aplicó un protocolo corto con GnRH-a. 10,000 UI de gonadotropina coriónica humana SC que se administró cuando las pacientes tenían dos o más folículos de 18 mm o mayores de diámetro mayor. La aspiración de los folículos con aguja bajo guía ecográfica transvaginal se realizó bajo una sedación profunda 36 horas después.

En KLC, se siguió un protocolo de estimulación mínima. La estimulación ovárica fue cumplida con citrato de clomifeno (CC, Clomid; Shionogi, Tokyo, Japón), en combinación con hMG (Humegon; Organon). El citrato de Clomifeno fue dado a dosis de 50 mg/día desde el día 3 del ciclo hasta el día antes de la inducción de la maduración ovocitaria. La administración de hMG se comenzó en el día 8 del ciclo a dosis de 75-150 UI a 2 días de intervalos dependiendo de las concentraciones de E<sub>2</sub> y los hallazgos ecográficos. El estadio final de la maduración ovocitaria fue logrado por el disparo de dosis de gonadotropina endógena usando 300 mg de análogo de la GnRH por inhalación (Sprecur; Aventis Pharma, Tokyo, Japón). La aspiración folicular fue realizada 34-35 horas más tarde. El soporte de la fase lútea fue

provisto por administración oral diaria de 30 mg/día de dihidrogestrona (Dephaston; Daiichi-sieyaku, Tokyo, Japan) por 12 días.

Los ovocitos aspirados fueron lavados, graduados y colocados en fluido tubárico humano tamponado con bicarbonato (HTF) (Lonza, Verviers, Bélgica: con 10% de solución de proteínas; Sanquin, Amsterdam, Holanda) a 37°C bajo 5% de CO<sub>2</sub> en aire en VUMC y en medio de clivaje de Sage, (Pasadena, CA) a 37°C bajo 5% de CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub>, en KLC. La inseminación ovocitaria fue iniciada aproximadamente 40 hs después de la inyección de hCG usando procedimientos de FIV estándar o Inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI).

A las 16-18 horas después de la inseminación (día 1), cada ovocito fue examinado para valorar la fecundación y fue colocado en gotas individuales de 25 µL de medio HTF en VUMC, y 20 µL de medio de clivaje Sage en KLC, para cultivo durante el estadio de división. Los embriones fueron cultivados individualmente en los dos centros.

Se utilizó un sistema de puntuación estándar para embriones basado en las tasas de división y morfología para la evaluación de la calidad embrionaria en ambos centros (13, 21). Por ejemplo, un embrión en día 2 y día 3 grado A tenía 4 células y ≥7 células, respectivamente, con fragmentación entre 5% y 20%. Un único embrión con el más alto número de blastómeras y la menor fragmentación fue transferido. La transferencia se realizó en día 2 en KLC y en día 3 en VUMC.

Después de remover los embriones en la preparación para la transferencia, el medio utilizado fue colocado individualmente en tubos de congelación etiquetados, rápidamente congelado en nitrógeno líquido, y luego almacenado a -80°C. Una muestra control incubada bajo las mismas condiciones sin embriones fue también recolectada y usada para comparar. Los embarazos resultantes fueron grabados por cada paciente a las 12 semanas de edad gestacional. Un embarazo positivo fue definido como actividad cardíaca fetal (LCF) a tiempo.

Un total de 304 muestras de medio de cultivo embrionario utilizado recolectadas en VUMC después de SET en día 3 y 181 muestras de medio de cultivo embrionario utilizado recolectadas en KLC después de SET en día 2 fueron incluidas en el estudio. Un análisis alternativo de los datos obtenidos de las muestras recolectadas en VUMC se reportaron previamente (23).

### Adquisición de NIR espectral

Todas muestras de medio de cultivo de FIV fueron

descongeladas a temperatura ambiental por 30 minutos, después de ello se agitaron por 10 segundos y centrifugaron por 10 minutos a 13,000 rpm. Los espectros de transmisión NIR de las muestras de medio fueron medidos usando un espectrómetro NIR con una selección de arseniuro de galio indio –de base 512– elemento, con una longitud de onda operativa de 920-1,675 nm. Las muestras de células compatibles con los 3 mm de longitud de paso del espectrómetro fueron rellenas con 7 µL de muestras de medio de cultivo y colocadas en una cámara (mantenida a 21,0° ± 0,1°C) para medidas espectrales. El tiempo de análisis fue aproximadamente de 1 minuto. La medida fue repetida con el medio de control para contabilizar alguna variación en las condiciones de cultivo entre los embriones.

### Desarrollo del modelo espectral

Los perfiles metabolómicos NIR fueron computados dividiendo cada espectro de transmisión de cada muestra con el espectro del medio de control y fueron convertidos a una escala de absorción. Se obtuvo una media del espectro de absorción que fue usada para cálculos subsecuentes.

La discriminación entre embriones con LCF+ y LCF- consistió en determinar una combinación de las regiones espectrales desde los perfiles metabolómicos NIR que estimaron los embarazos resultantes invirtiendo la regresión de cuadrados mínimos y la optimización de algoritmos genéticos (GA). Este método está basado en el de Gri butts y Burns (24) y de Seli et al. (19). Brevemente, los modelos investigados fueron descriptos por la siguiente fórmula:

$$Y = b_0 + b_1X + b_2X_2 + \dots + b_nX_n$$

Donde  $Y$  es el resultado de embarazos de cada muestra (1= LCF +, 0= LCF- ),  $X_1, X_2 \dots X_n$  son regiones espectrales, y  $b_0, b_1 \dots b_n$  son sus coeficientes de carga asociados. Una GA determina la combinación de valores  $X$  que mejor estima  $Y$ , usando principios de la selección natural Darwiniana y operaciones biológicas-inspiradas: reproducción, entrecruzamiento y mutación.

El método, primero selecciona objetivamente las regiones espectrales por un método de procesamiento basado en ondículas. Una transformación de ondículas concentra la información espectral en un número pequeño de variables, similar a la compresión jpeg de imágenes. Las combinaciones de regiones espectrales combinadas definidas por las ondículas (valores  $X$ ) son usadas como una solución ensayo. Generalmente,

un GA produce una población inicial conteniendo un número de soluciones ensayos. Estas soluciones son evaluadas (hasta alcanzar una aptitud) y una nueva generación es creada desde la mejor de ellas. El proceso es continuado a través de un número de generaciones con el objetivo que la población debe evolucionar hasta contener una solución aceptable. Los coeficientes de carga ( $b_0, b_1, \dots, b_n$ ) de las ondículas óptimas elegidas por el GA fueron calculados por un cuadrado-mínimo de regresión inverso, usando resultados conocidos de embarazos con LCF (Y).

Los índices finales de viabilidad embrionaria fueron determinados por el método de validación cruzada-dejar uno afuera, usando el modelo desarrollado (ecuación 1) con regiones espectrales conocidas y coeficientes de carga calculados. Modelos independientes fueron computados por grupos de medios de cultivo de FIV de VUMC y KLC. Todos los análisis fueron escritos y evaluados utilizando Matlab (The MathWorks Inc., Natick, MA). Interesantemente, en relación a lo predicable entre los algoritmos de día 2 y día 3, notamos que hubo superposiciones significativas entre los dos algoritmos de embarazos. Ambos algoritmos examinaron áreas de de espectro en gran parte en el rango espectral de 1,200 a 1,500 nm.

#### **Análisis estadístico**

Subsecuentemente a la estimación del índice de viabilidad, usamos el t-test de estudiante para determinar separadamente las tendencias dentro de los grupos de resultados de embarazo. El test exacto de Fisher fue también utilizado para determinar las diferencias de tasas de implantación entre los subgrupos de índice de viabilidad. El error alfa o menos de 0,05 fue considerado significativo para todas las comparaciones. Los valores de positivos verdaderos (TP), negativos verdaderos (TN), falsos positivos (FP), y falsos negativos (FN) fueron calculados primero determinando un valor óptimo de corte de la curva característica receptor operador, un gráfico de trazado de la sensibilidad versus 1-especificidad. El corte óptimo fue determinado como aquel con la eficiencia más elevada calculada por la sensibilidad + especificidad por cada valor. El porcentaje de certeza del examen fue computado usando la ecuación  $\frac{(TP+TN)}{(TP+TN+FP+FN)} \times 100$  en el corte óptimo. El coeficiente de correlación de Pearson fue también calculado para establecer la asociación entre el índice de viabilidad y la tasa de implantación, así como la asociación entre el índice de viabilidad y la morfología de un embrión. Todos los análisis estadísticos fueron hechos usando el paquete programado Matlab (The Mathworks Inc.)

## **RESULTADOS**

### **Perfil metabolómico generado por espectrometría NIR El análisis de los medios de cultivos utilizados se correlaciona con los embarazos resultantes de embriones día 3**

Un total de 304 muestras de medio de cultivo embrionario utilizado fueron recolectadas en VUMC después de SET en día 3 y evaluadas usando espectrometría NIR. De los 304 embriones transferidos, 89 implantaron y resultaron en actividad cardíaca fetal detectada por ultrasonido en la semana 12 de gestación (LCF+), mientras que 215 no (LCF-). Todas las muestras fueron analizadas exitosamente y fueron incluidas en los análisis de datos.

El espectro NIR de medio de cultivo utilizado fue medido y preprocesado como se describió previamente (19). El espectro medio para LCF+ y LCF- fueron entonces computados después de convertir el espectro a la escala de absorción y el centrado-medio de cada longitud de onda. Luego, usando el GA como se describió en la sección de Materiales y Métodos, se identificaron cuatro áreas en el rango de la espectrometría de NIR como las más discriminatorias entre los dos grupos. Las cargas óptimas de estas regiones fueron también calculadas. Usando el modelo matemático (ecuación 1) que toma en cuenta estas regiones y sus cargas, un índice de viabilidad se calculó entonces para cada muestra. El índice de viabilidad media de los embriones en día 3 con potencial reproductivo probado (LCF+) fue significativamente mayor ( $0,31 \pm 0,10$ ) comparado con los embriones que fallaron la implantación (LCF-) ( $0,28 \pm 0,11$ ) ( $P < .05$ ) (Tabla 1). El perfil metabolómico de las 304 muestras de día 3 de VUMC fueron previamente reportadas como parte de un estudio por Vergouw et al. (23). Estas muestras y sus análisis fueron incluidos en este estudio como si fueran posteriormente analizadas para aseverar si el perfil metabolómico puede ser un complemento a la morfología para el estudio no invasivo de embriones en mujeres que realizan SET.

### **Perfil metabolómico generado por espectrometría NIR El análisis de los medios de cultivos utilizados se correlaciona con los embarazos resultantes de embriones día 2**

Las muestras de medio de cultivo embrionario utilizado ( $n = 121$ , 32 LCF+, 89 LCF-) de mujeres realizando SET en día 2 fue también recolectada y evaluada usando espectrometría NIR. Todas las muestras fueron analizadas exitosamente y fueron incluidas en los datos de análisis.

**TABLA 1**

The near infrared spectroscopic analysis of spent culture media of embryos with positive and negative fetal cardiac activity (FCA) in relation to viability index scores (mean ± SD).

Center	Study design	No.	Day of transfer	Viability index FCAD (mean ± SD)	Viability index FCAL (mean ± SD)	P value
VUMC <sup>a</sup>	Model development	304	Day 3	0.31 ± 0.10	0.28 ± 0.11	< .05
KLC	Model development	121	Day 2	0.34 ± 0.17	0.24 ± 0.16	< .01
KLC	Blinded analysis	60	Day 2	0.33 ± 0.18	0.26 ± 0.15	< .05

Note: Data shown is for all day 2 embryos and for the initial 121 day 2 embryo samples and an additional 60 blinded day 2 embryo samples. VUMC = VU University Medical Center, Amsterdam, the Netherlands; KLC = Kate Ladies Clinic, Tokyo, Japan.

<sup>a</sup>Metabolomic profiling of the 304 day 3 samples from VUMC have previously been reported as part of a study by Vergoux et al. (23). These samples and their analysis were included in the current study as they were also analyzed to assess whether metabolomic profiling may provide an adjunct to morphology for noninvasive embryo assessment in women undergoing single embryo transfer.

Sci. Metabolomic profiling of human embryos. Fertil Steril 2010.

En forma similar a lo descrito previamente para los embriones en día 3, se midió y pre procesó el espectro del medio de cultivo utilizado. El espectro medio para LCF+ y LCF- fue computarizado después de que el espectro fuera convertido a la escala de absorción y centrado-medio de cada longitud de onda. Luego, la optimización GA fue realizada y se identificaron cinco áreas de ondículas en el rango de espectrometría NIR como más discriminarios entre los grupos de LCF+ y LCF-, y les fue dado un valor relativo. Usando el modelo matemático (ecuación 1) que toma en cuenta estas regiones y sus cargas, un índice de viabilidad fue calculado para cada muestra. El modelo usado para estudiar las muestras de embriones en día 2 fue diferente del modelo descrito previamente para muestras de embriones en día 3. El análisis de espectrometría NIR de medio de cultivo utilizado de embriones con potencial reproductivo probado demostró mayor índice de viabilidad (0,34 ± 0,17) que aquellos que fallan la implantación (0,24 ± 0,16) ( $P < .01$ ) Tabla 1).

**Perfil metabolómico generado por espectrometría NIR El análisis de los medios de cultivo utilizados predice embarazos resultantes de embriones después de la transferencia de un único embrión en día 2 en análisis cegados**

A continuación, el medio de cultivo utilizado de 60 embriones (16 LCF+, 44 LCF-) recolectado en KLC, después de SET en día 2, fue evaluado con espectrometría NIR por un observador cegado a los resultados de embarazos, usando el modelo establecido por las muestras de día 2, como se describió previa-

mente. Estas 60 muestras no fueron parte de una cohorte inicial (n= 121) que fue usada para el desarrollo del modelo metabolómico. El espectro NIR fue generado, centrado-medio, y se determinaron los índices de viabilidad. Los índices de viabilidad de los embriones con potencial reproductivo probado (LCF+) fueron mayores (0,33 ± 0,18) comparado con los embriones que fallaron a la implantación (LCF-) (0,26 ± 0,15) ( $P < .05$ ) (Tabla 1). Además, el método identificó un potencial de implantación con una precisión de 71,7%.

**Índices de viabilidad determinados en el análisis cegado de los medios de cultivos utilizados en embriones día 2 muestra una correlación positiva con la capacidad de los embriones de resultar en un embarazo**

Después de demostrar la capacidad del modelo metabolómico de predecir el potencial reproductivo en un análisis cegado, examinamos si los valores crecientes de los índices de viabilidad representan una mayor posibilidad de que los embriones resulten en embarazo. Los índices de viabilidad de los 60 embriones transferidos en día 2 determinados por análisis cegado, como se describió previamente (Tabla 1), fueron separados en cuartiles. Observamos una correlación positiva (coeficiente de correlación Pearson = 0.5241,  $P < .001$ ) entre los valores de los índices de viabilidad crecientes y el potencial reproductivo individual de los embriones (Fig. 1).

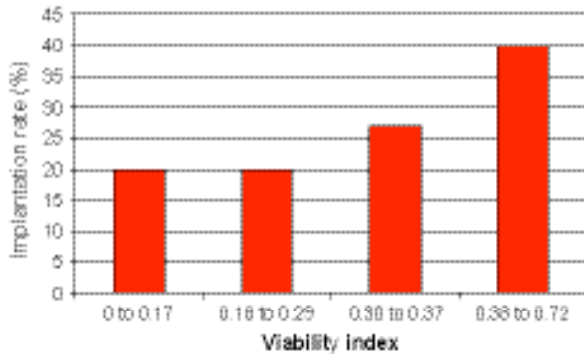
**El índice de viabilidad es independiente de la morfología tanto para embriones de día 2 como de día 3**

A continuación, investigamos si el índice de viabi-



**FIGURA 1**

Viability indices determined in the blinded analysis of day 2 embryo culture media shows a positive correlation with pregnancy. Viability indices determined by blinded analysis of the spent culture media of 60 embryos transferred on day 2 were analyzed in quartiles (15 patients in each group). A positive correlation between increasing viability index value and the reproductive potential of individual embryos was observed (Pearson correlation coefficient = 0.5241,  $P < .001$ ).



Sex Metabolomic profiling of human embryos. Fertil Steril 2010

idad representa un parámetro independiente de la morfología embrionaria. La Figura 2 muestra la relación entre el índice de viabilidad relativo y el grado de morfología para embriones de día 2 y 3. El coeficiente de correlación Pearson para embriones de día 3 y día 2 fue de 0.0002 y -0.1223, respectivamente. La hipótesis nula de no asociación es aceptada por ambas muestras, día 3 ( $P = .9975$ ) y día 2 ( $P = .1009$ ).

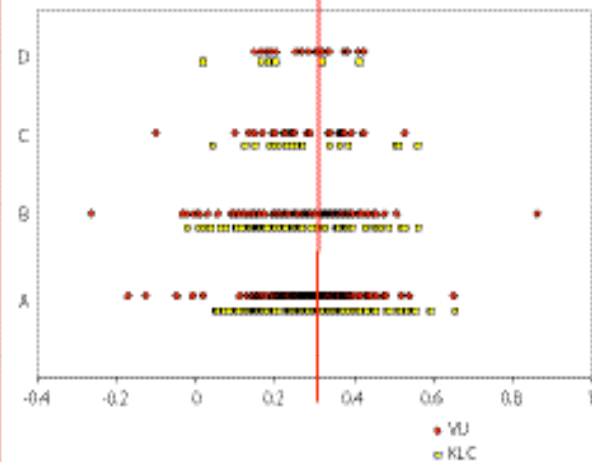
### El perfil metabolómico puede ser un complemento a la morfología para estudio no invasivo embrionario en mujeres bajo transferencia de un único embrión.

Después de establecer el valor predictivo del perfil metabolómico (Tabla 1) y demostrar que este constituye un parámetro independiente de la morfología (Fig. 2), investigamos si combinando el perfil metabolómico con el estudio morfológico puede aumentar nuestra capacidad en determinar el potencial reproductivo de un embrión.

Primero determinamos si los embriones que tienen un índice de viabilidad por encima del valor de corte óptimo determinado por el análisis de la curva característica receptor operador ( $\geq 0.3$ ) mostraron un mayor

**FIGURA 2**

The relationship between the relative viability index and morphological grade for day 3 and day 2 embryos. Viability indices of day 3 ( $n = 304$ , diamonds) and day 2 ( $n = 181$ , squares) embryos is shown for each morphological grade. The Pearson correlation coefficients for day 3 and day 2 embryos were 0.0002 and -0.1223, respectively. The null hypothesis of no association is accepted for both day 3 ( $P = .9975$ ) and day 2 ( $P = .1009$ ) samples. The red line indicates the cutoff predicted by receiver operating characteristic analysis.



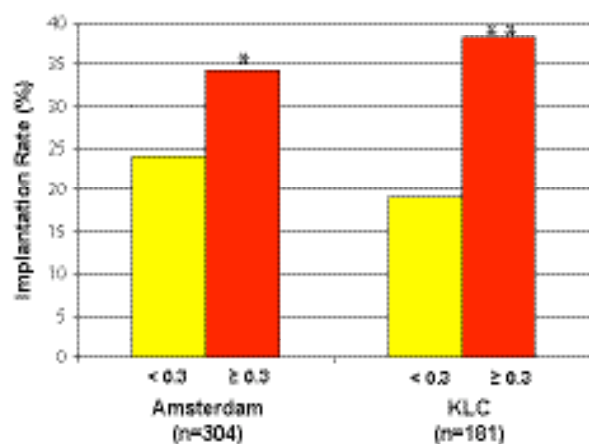
Sex Metabolomic profiling of human embryos. Fertil Steril 2010

PR comparado con aquellos que tienen un índice de viabilidad menor ( $< 0.3$ ). Entre los embriones que se les realizó SET en día 3 (VUMC), aquellos con un índice de viabilidad  $\geq 0.3$  demostraron un 10% más de embarazos comparado con los embriones con un índice de viabilidad  $< 0.3$  ( $P < .05$ ) (Fig. 3). En forma similar, de los embriones transferidos en día 2 (KLC), se observó un 19% más de tasas de embarazo en los embriones con un índice de viabilidad de  $\geq 0.3$  comparado con aquellos con un índice de viabilidad  $< 0.3$  ( $P < .001$ ) (Fig. 3).

Luego, evaluamos los resultados de los embriones con diferentes grados morfológicos separadamente para embriones de día 3 (Fig. 4A) y día 2 (Fig. 4B), y observamos una tendencia similar. Entre los embriones que se les realizó SET en día 3 (VUMC), la diferencia en PR entre los embriones con índice de viabilidad  $\geq 0.3$  comparado con embriones con un índice de viabilidad  $< 0.3$  fue de 13%, 7%, 10% y 14%, para

**FIGURA 3**

Implantation rates of day 2 and day 3 embryos with viability indices below (yellow) and above (red) the cutoff value (0.3) determined by receiver operating characteristic analysis. Both day 3 and day 2 embryos with a high viability index ( $\geq 0.3$ ) demonstrated a higher implantation rate compared with those with a lower viability index ( $< 0.3$ ) ( $*P < .05$ ;  $**P < .001$ ).



*Self Metabolic profiling of human embryos. Fertil Steril 2010.*

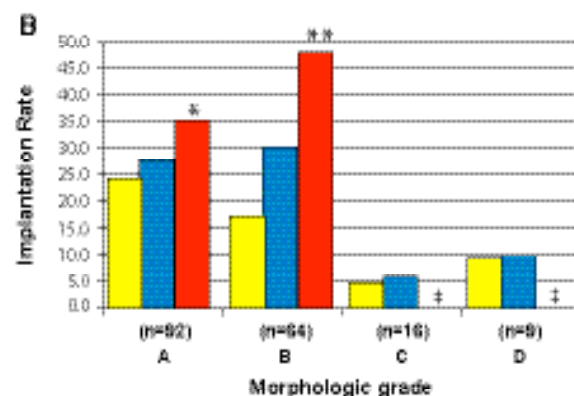
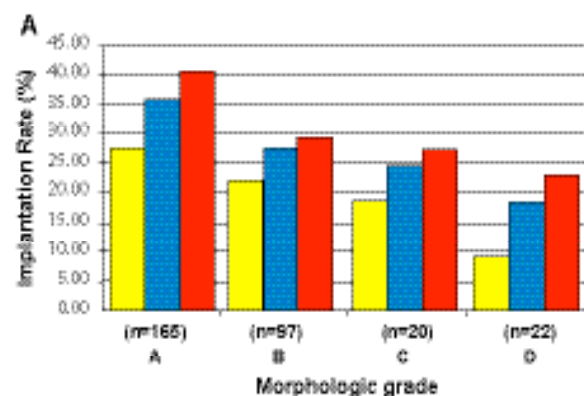
embriones de grados A, B, C, y D, respectivamente ( $P =$  no significativo [NS]). En embriones transferidos en día 2 (KLC) la diferencia en PR entre los embriones con un índice de viabilidad  $\geq 0,3$  comparado con embriones con un índice de viabilidad  $< 0,3$  fue de 12% y 30% para embriones grado A, y grado B, respectivamente ( $P = 0.06$  y  $P < .01$ , respectivamente). En este grupo, el número de embriones grado C y D fue muy bajo y excluyó la comparación estadística.

### DISCUSIÓN

En este estudio analizamos el medio de cultivo utilizado de embriones con resultado conocido después de SET en día 2 y día 3. Primero, usamos la espectrometría NIR para establecer los modelos metabólicos que se correlacionan con los resultados de los ciclos (Tabla 1). Luego validamos nuestro enfoque a través de un análisis ciego de un subgrupo de embriones (Tabla 1). Nuestros descubrimientos son consistentes con reportes previos usando NIR (19) y Raman (19, 20) y sugieren firmemente que los embriones cultivados in vitro con un alto potencial reproductivo alteran su ambiente en forma diferente comparado con los em-

**FIGURA 4**

Implantation rates of day 3 and day 2 embryos with different morphological grades and with viability indices below or above the optimal cutoff value (0.3) determined by receiver operating characteristic analysis. (A) Implantation rates of day 3 embryos comparing morphological grades and a viability index of less than or greater than 0.3. (B) Implantation rates of day 2 embryos comparing morphological grades and a viability index of less than or greater than 0.3. Blue columns show implantation rates for different morphological grades. Yellow and red columns show implantation rates for embryos of the same morphological grade and a viability index  $< 0.3$  or  $\geq 0.3$ , respectively. n % number of samples analyzed for each morphological grade; ‡ = low number of samples.  $*P = .06$ ,  $**P < .01$ .



*Self Metabolic profiling of human embryos. Fertil Steril 2010.*

briones que no resultaron en embarazo, y que la diferencia es detectable usando espectrometría.

También observamos una correlación positiva en los índices de viabilidad reflejado en el perfil metabo-

lómico y la capacidad de los embriones de lograr el embarazo (Fig. 1). Esta asociación ha sido un área de investigación muy estudiada, en particular en relación al metabolismo de los substratos de energía (25, 26). Nuestros descubrimientos refuerzan la idea y demuestran la implicación clínica estableciendo que los determinantes de los metabolitos de los medios de cultivo muestran una asociación cuantitativa con el potencial reproductivo de los embriones y que un índice de viabilidad más alto puede reflejar una mayor probabilidad de embarazo.

Luego, evaluamos si el perfil metabólico provee un nivel adicional de información acerca de la viabilidad embrionaria independiente de la morfología. Encontramos que los índices de viabilidad calculados por el perfil metabólico de los medios de cultivo embrionario no correlaciona con los grados morfológicos de embriones de día 2 y día 3 (Fig. 2). Este descubrimiento es concordante con el reporte de Vergouw et al. (23), usando los mismos grupos de datos de los medios embrionarios, que no encontró una correlación entre el índice de viabilidad y el número de blastómeras o el porcentaje de fragmentación, y un estudio previo en ratas por Gardner y Lane (27), el cual establece que la morfología sola no discrimina entre embriones hermanos. Interesantemente, Gardner y Lane (27) mostraron previamente que los blastocitos de ratas morfológicamente idénticos pueden ser identificados mejor usando el criterio metabólico como "viable" antes de la transferencia.

El beneficio derivado del sistema de graduación embrionaria en determinar el embrión(es) a transferir está bien establecido (28, 29). Sin embargo, aunque es una herramienta valiosa, la evaluación de la morfología embrionaria tiene muchos riesgos reconocidos. Esto ha sido bien documentado en estudios mostrando que la evaluación en día 3 falla en más del 50% de las veces para identificar embriones que van a formar blastocitos (30, 31). En el presente estudio, nos preguntamos si el perfil metabólico usado como un complemento de la morfología, puede aumentar nuestra capacidad para identificar el embrión(es) que es más probablemente resulte en embarazo. En nuestro estudio, donde la transferencia de embriones fue seleccionada solamente en la morfología, encontramos que los embriones con un índice de viabilidad  $\geq 0,3$  tuvieron más posibilidades de lograr embarazo comparado con los embriones con un índice de viabilidad  $< 0,3$  (Figs. 3 y 4 AB). Estos descubrimientos sugieren que la disponibilidad de una forma de análisis secundaria, más objetiva que la morfología puede permitir mayor discriminación entre embriones de similar morfología, y potencialmente lleva a un incre-

mento en las tasas de implantación. Aunque nuestras observaciones son alentadoras, se necesita un ensayo prospectivo randomizado para establecer el verdadero valor de la evaluación metabólica como un complemento a la morfología para aumentar las tasas de implantación.

Infrarrojo cercano y Raman son espectrometrías vibracionales. Una ventaja del enfoque de la espectrometría vibracional es que toda la muestra puede ser monitoreada no invasivamente. De esta manera, una firma espectral provee información detallada y múltiple acerca de la muestra de una medida, disminuyendo el tiempo y la cantidad de muestra necesaria para el análisis. Esto ha permitido a numerosos investigadores examinar el uso, tanto de Raman, como NIR para estudios metabólicos de constituyentes sanguíneos y composiciones tisulares (17). En el presente estudio, fuimos capaces de analizar muestras individuales en aproximadamente 1 minuto, usando 7  $\mu\text{L}$  de medio. Esto fue un volumen menor comparado con nuestros reportes previos donde usábamos aproximadamente 15  $\mu\text{L}$  para análisis (19).

Previamente examinamos tanto espectrometría NIR como Raman para el perfil metabólico del medio de cultivo embrionario con éxitos comparables (19, 20). Ambos modos de análisis de espectrometría vibracional están asociados con ventajas únicas. Por ejemplo, aunque los modos vibracionales de moléculas son altamente específicos en espectrometría Raman permitiendo mejor identificación constitutiva de fondo, la intensidad de la señales es mayor con espectrometría NIR. En este estudio, usamos espectrometría porque nuestro objetivo es desarrollar una tecnología que sea clínicamente aplicable, y la tecnología NIR es más costo-eficiente comparado con Raman. Sin embargo, es imaginable que en el futuro una combinación de estas dos espectrometrías vibracionales o tecnología adicional puede proveer mejor resultado en los análisis de la composición de las muestras de medio de cultivo embrionario.

En mujeres realizando FIV, las transferencias embrionarias se realizan más frecuentemente en días 2, 3, o 5 después de la aspiración. En este estudio analizamos muestras de cultivo embrionario utilizadas recolectadas después de SET en día 2 (KLC) o día 3 (VUMC). Aunque la actividad metabólica muestra similitudes significativas entre embriones día 2 y día 3 (estadio de división), el cultivo adicional de 24 hs en las muestras de día 3 pueden potencialmente afectar el perfil metabólico del ambiente del cultivo. Por ello, modelos específicos e independientes (diferente de algunos publicados previamente) fueron desarrollados para cada estadio de desarrollo para lograr la

mayor separación posible. Además, los puntos de datos determinados por GA para generar un modelo predictivo de espectro NIR para día 2 y día 3 difirió uno de otro y reflejó la actividad metabólica específica de los estadios de desarrollo y la longitud del cultivo de los embriones. Cuando cruzamos los datos del modelo de desarrollo para los medios de cultivo de embriones día 2 para evaluar el potencial reproductivo de embriones de día 3, esto no fue predictivo (datos no mostrados). Por ello, modelos metabólicos específicos para estadio de desarrollo de los embriones más que un algo ritmo global puede ser necesario para el estudio óptimo del potencial reproductivo.

Existen múltiples tipos de medios de comerciales para el cultivo de embriones humanos en los laboratorios FIV. Estos medios están todos desarrollados basados en las necesidades metabólicas de los embriones humanos (32) y aunque se confía que son similares, sus fórmulas completas son protegidas bajo leyes de patentamiento y no están disponibles para el público. Una válida y ampliamente aplicable metodología para la evaluación de los medios de cultivo embrionarios deben estar disponibles para detectar los cambios asociados con la viabilidad embrionaria en diferentes tipos de medio de cultivo. Hemos mostrado previamente que el modelo desarrollado en un tipo de medio puede efectivamente estudiar el potencial reproductivo de cultivos embrionarios en un diferente tipo de medio (19, 20). En el presente estudio, normalizamos el espectro de cada muestra con el de una muestra de cultivo de control bajo las mismas condiciones sin un embrión para eliminar el efecto de diferencias de fórmulas entre distintos tipos de medio de cultivo en parámetros metabólicos. Sin embargo, el perfil metabólico en relación a diferentes tipos de medios de cultivo comerciales todavía necesita ser validado en el futuro.

Este estudio amplía nuestros descubrimientos publicados previamente, estableciendo modelos robustos metabólicos que son independientes del grado morfológico, y pueden proveer un complemento a la morfología para estudios no invasivos de la viabilidad de los embriones. Nuestros descubrimientos validan el concepto de que un metabolismo diferente es evidente en embriones viables y no viables y que los embriones con la misma morfología pueden diferir en su actividad metabólica. Por ello, este estudio introduce al perfil metabólico como una rápida y no invasiva tecnología que puede proveer una evaluación objetiva ayudando en la decisión de que embrión(es) transferir. La capacidad de usar esta tecnología como complemento para la morfología para el estudio de los embriones puede proveer un segundo escalón de evaluación antes de la transferencia embrionaria.

Lo más importante, un aumentado entendimiento del potencial reproductivo de los embriones ayudará a identificar los embriones que tienen más posibilidades de lograr el embarazo, y permite tomar más decisiones acertadas acerca del número de embriones a transferir. Esto, puede reducir la posibilidad de estacaciones múltiples mientras se mantengan o incluso se aumenten las PR. Aunque el número de SET aportados en este artículo es substancial, estudios futuros serán necesarios para determinar el verdadero valor y limitaciones en el uso de la metabólica en FIV.

## BIBLIOGRAFÍA

1. **SART.** Assisted reproductive technology success rates. National summary and fertility clinic reports. Atlanta, GA: Centers for Disease Control, 2005.
2. **Wright VC, Chang J, Jeng G, Macaluso M.:** Assisted reproductive technology surveillance—United States, 2003. *MMWR Surveil Summ* 2006; 55: 1–22.
3. **Reddy UM, Wapner RJ, Rebar RW, Tasca RJ.:** Infertility, assisted reproductive technology, and adverse pregnancy outcomes. *Obstet Gynecol* 2007; 109: 967–77.
4. **Bromer JG, Seli E.:** Assessment of embryo viability in assisted reproductive technologies: shortcomings of current approaches and the emerging role of metabolomics. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2008; 20: 234–41.
5. **Luke B, Brown MB.:** Contemporary risks of maternal morbidity and adverse outcomes with increasing maternal age and plurality. *Fertil Steril* 2007; 88: 283–93.
6. **Keith LG, Oleszczuk JJ, Keith DM.:** Multiple gestation: reflections on epidemiology, causes, and consequences. *Int J Fertil Womens Med* 2000; 45: 206–14.
7. **US Department of Health and Human Services PHS.** US vital statistics, 1998 and from US public health Service. *Healthy People 2000: National Health Promotion and Disease Prevention Objectives*, DHHS Pub No. (PHS) 90–50212.
8. **Practice Committee of SART and Practice Committee of ASRM.** Guidelines on the number of embryos transferred. *Fertil Steril* 2008; 90: S163–4.
9. **SART.** Assisted reproductive technology success rates. National summary and fertility clinic reports. Atlanta GA: Centers for Disease Control, 2004.
10. **Kovalevsky G, Patrizio P.:** High rates of embryo wastage with the use of assisted reproductive technology: a look at the trends between 1995 and 2001 in the United States. *Fertil Steril* 2005; 84: 325–30.
11. **Toner JP, Veeck L, Acosta AA, Muasher SJ.:** Predictive value of pregnancy during original in vitro fertilization cycle on implantation and pregnancy in subsequent cryothaw cycles. *Fertil Steril* 1991; 56: 505–8.

12. **El-Thouky T, Khalaf Y, Al-Darazi K, O'Mahony F, Wharf E, Taylor A, et al.:** Cryo-thawed mebrvos obtained from conception cycles have double the implantation and pregnancy potential of those from successful cycles. *Hum Reprod* 2003; 6: 1313–8.
13. **Sakkas D, Gardner DK.:** Noninvasive methods to assess embryo quality. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2005; 17: 283–8.
14. **Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schoolcraft WB.:** Noninvasive assessment of human embryo nutrient consumption as a measure of developmental potential. *Fertil Steril* 2001; 76: 1175–80.
15. **Brison DR, Houghton FD, Falconer D, Roberts SA, Hawkhead J, Humpherson PG, et al.:** Identification of viable embryos in IVF by non-invasive measurement of amino acid turnover. *Hum Reprod* 2004; 19: 2319–24.
16. **Oliver SG, Winson MK, Kell DB, Baganz F.:** Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends Biotechnol* 1998; 16: 373–8.
17. **Ellis DI, Goodacre R.:** Metabolic fingerprinting in disease diagnosis: biomedical applications of infrared and Raman spectroscopy. *Analyst* 2006; 131: 875–85.
18. **Posillico JT.:** Selection of viable embryos and gametes by rapid, non-invasive metabolomic profiling of oxidative stress biomarkers. In: Elder K, Cohen J, eds. *Human preimplantation embryo selection*. Informa UK Ltd., London 2007: 245–61.
19. **Seli E, Sakkas D, Scott R, Kwok JS, Rosendahl S, Burns DH.:** Non-invasive metabolomic profiling of human embryo culture media using Raman and near infrared spectroscopy correlates with reproductive potential of embryos in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2007; 88: 1350–7.
20. **Scott RT, Seli E, Miller K, Sakkas D, Scott K, Burns DH.:** Non-invasive metabolomic profiling of human embryo culture media using Raman spectroscopy predicts embryonic reproductive potential: a prospective blinded pilot study. *Fertil Steril* 2008; 90: 77–83.
21. **Roseboom TJ, Vermeiden JP, Schoute E, Lens JW, Schats R.:** The probability of pregnancy after embryo transfer is affected by the age of the patient, cause of infertility, number of embryos transferred and the average morphology score, as revealed by multiple logistic regression analysis. *Hum Reprod* 1995; 10: 3035–41.
22. **Goverde AJ, McDonnell J, Vermeiden JP, Schats R, Rutten FF, Schoemaker J.:** Intrauterine insemination or in-vitro fertilisation in idiopathic subfertility and male subfertility: a randomised trial and cost-effectiveness analysis. *Lancet* 2000; 355: 13–8.
23. **Vergouw CG, Botros LL, Roos P, Lens JW, Schats R, Hompes PGA, et al.:** Metabolomic profiling by nearinfrared spectroscopy as a tool to assess embryo viability: a novel, non-invasive method for embryo selection. *Hum Reprod* 2008; 23: 1499–504.
24. **Gributs CFEW, Burns DH.:** Parsimonious calibration models for near-infrared spectroscopy using wavelets and scaling functions. *Chemometr Intell Lab Syst* 2005; 83: 44–53.
25. **Gardner DK, Leese HJ.:** The role of glucose and pyruvate transport in regulating nutrient utilization by preimplantation mouse embryos. *Development* 1988; 104: 423–9.
26. **Houghton FD, Leese HJ.:** Metabolism and developmental competence of the preimplantation embryo. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004; 115(Suppl 1): S92–6.
27. **Gardner DK, Lane M.:** Selection of viable mouse blastocysts prior to transfer using a metabolic criterion. *Hum Reprod* 1996; 11: 1975–8.
28. **VanRoyan E, Mangelschots K, De Neubourg D, Valkenburg M, Van de Meerssche M, Ryckaert G, et al.:** Characterization of a top quality embryo, a step towards single-embryo transfer. *Hum Reprod* 1999; 14: 2345–9.
29. **Gardner DK, Schoolcraft WB.:** In vitro culture of human blastocysts. In: Jansen R, ed. *Towards reproductive certainty: fertility and genetics beyond*. Carnforth: Parthenon, 1999; 378–88.
30. **Milki A, Hinckley MD, Gebhardt J, Dasig D, Westphal LM, Behr B.:** Accuracy of day 3 criteria for selecting the best embryos. *Fertil Steril* 2002; 77: 1191–5.
31. **Neuber E, Mahutte NG, Arici A, Sakkas D.:** Sequential embryo assessment outperforms investigator-driven morphological assessment at selecting a good quality blastocyst. *Fertil Steril* 2006; 85: 794–6.
32. **Lane M, Gardner DK.:** Embryo culture medium: which is the best? *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2007; 21: 83–100.