

## Técnicas invasivas y no invasivas en el diagnóstico de embriones humanos

### Invasive and non-invasive techniques in human embryos diagnostic

Cristina Calomarde González<sup>1</sup>:Luis Carmona Saborido<sup>2</sup>, Irene Guerra Juan<sup>1</sup>, Dácil Gutiérrez Pascual<sup>2</sup>, Adelaida Santana Martín<sup>2</sup>, Javier Domingo del Pozo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Máster en Biotecnología de la Reproducción Humana Asistida. Universidad de Valencia. Facultad de Medicina, <sup>2</sup>IVI Las Palmas.

#### RESUMEN

Las técnicas de reproducción asistida se han desarrollado con el objetivo de aumentar las tasas de implantación y reducir el número de embriones transferidos. El conocimiento sobre la morfología embrionaria y el desarrollo de la tecnología molecular aplicada al diagnóstico preimplantacional, han supuesto un gran avance en el rendimiento de los ciclos, mejorando los resultados clínicos y disminuyendo la tasa de aborto. El objetivo de esta revisión es describir el estado actual de las técnicas de diagnóstico embrionario. Técnicas como el time-lapse aplicada a la morfocinética nos permiten estudiar de manera continua el desarrollo embrionario, aportando un enfoque más dinámico. Tecnología molecular como la metabolómica dirigida o la proteómica, muestran nuevos elementos de evaluación sobre las primeras etapas del desarrollo hasta blastocisto. Estudios sobre el secretoma embrionario en medios de cultivo *in-vitro* intentan predecir patrones de desarrollo en los embriones. La búsqueda de estrategias de diagnóstico y biomarcadores asociados a calidad embrionaria, aneuploidías y potencial implantatorio son nuevos retos a los que se enfrenta la tecnología en medicina reproductiva.

( Rev. Iberoam. Fert Rep Hum, 2016; **33**; 67-72 © Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana)

**Palabras clave:** *Secretoma embrionario, metabolómica, time-lapse, proteómica y diagnóstico genético preimplantacional.*

Aceptado: 2 Junio 2016

Correspondencia: Luis Carmona Saborido.

Avenida Juan Carlos I, número 17, bajo. CP: 35010. Las Palmas de Gran Canaria, Las Palmas, España. Mail: Luis.carmona@ivi.es

SOLICITUD REIMPRESIÓN: Email: editorialmedica@editorialmedica.com

---

## SUMMARY

The assisted reproduction techniques have been developed with the aim of increasing implantation rates and reducing the number of embryos transferred. Knowledge about embryonic morphology and the development of molecular technology applied to preimplantation diagnosis has resulted in great progress in terms of cycle performance, improving clinical outcomes and reducing the rate of abortion. The aim of this review is to describe embryonic diagnostic techniques. Currently, techniques like time-lapse applied to morphokinetics allow us to continuously study embryonic development providing a more dynamic approach. Molecular techniques such as directed metabolomics or proteomics show new elements of evaluation since the early stages of development to blastocyst. Studies on the metabolism of embryos cultured *in-vitro* are providing data that improve embryo selection. The development of diagnostic strategies and biomarkers associated with embryonic quality, aneuploidy and implantatory potential are new challenges for the future in reproductive medicine technology.

(Rev. Iberoam. Fert Rep Hum, 2016; 33; 67-72 © Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana)

**Key words:** *Embryonic secretome profile, metabolomics, time-lapse imaging, proteomics, preimplantation genetic diagnosis.*

## INTRODUCCIÓN

Más de 3 millones de bebés han nacido hasta la fecha con la ayuda de las técnicas de reproducción asistida (1). La mejora en las condiciones de cultivo y la reducción en el número de embriones a transferir en el mismo ciclo han dado como resultado un aumento de la tasa de implantación, reduciendo significativamente la incidencia de los embarazos múltiples, 22-29 % tras DET (*double embryo transfer*) y 1% tras eSET (*elective single embryo transfer*) (2,3). La evaluación morfológica clásica ha sido la variable con mayor peso en la elección de embriones a transferir, considerando al embrión como un elemento estático (4). Sin embargo, se desconoce estrictamente el grado de relevancia de algunos aspectos morfológicos del embrión como el grado de fragmentación, asimetría celular y multinucleación en la evolución posterior, aunque se ha descrito que la presencia de estas características es indicativa de mal pronóstico en su viabilidad futura. El cultivo hasta estadios de blastocisto ha despejado algunas dudas sobre la importancia de estos elementos morfológicos mejorando sensiblemente los procesos de selección embrionaria (5-8). Por otro lado, el avance en las técnicas de criopreservación revolucionó la manera de afrontar los tratamientos, mejorando así, el aprovechamiento tanto de gametos como de embriones para ciclos futuros. La tasa de embarazo acumulada se incrementó notablemente a raíz del desarrollo de las técnicas de vitrificación, permitiendo acumular ovocitos y embriones en pacientes diagnosticadas por baja respuesta, aumentando las tasas de supervivencia. En los últimos años se han desarrollado nuevos métodos de selección embrionaria basados en la caracterización de ritmos de división celular, conocimiento del genoma y biomarcadores, aportando una batería

de datos que han mejorado sustancialmente los resultados clínicos. Por tanto, el objetivo de esta revisión es hacer un recorrido por las técnicas actuales de selección embrionaria y profundizar en la relevancia del secretoma embrionario y su repercusión clínica.

## TÉCNICAS INVASIVAS

### Diagnóstico genético preimplantacional

Las técnicas de diagnóstico invasivas, relacionadas fundamentalmente con el diagnóstico genético preimplantacional, conllevan la biopsia bien del ovocito (corpúsculo polar) o bien del embrión (blastómeras en D3 y trofoectodermo en día 5 o día 6). El análisis de ADN embrionario, para detectar anomalías cromosómicas y mutaciones genéticas, ha aumentado la tasa de implantación y reducido tanto la tasa de aborto espontáneo como de recién nacido vivo afecto por cromosomopatías o enfermedades monogénicas (9).

Las limitaciones técnicas del FISH (*fluorescence in-situ hybridization*) y del CGH (*comparative genomic hybridization*) se asocian con la incapacidad para analizar todos los cromosomas. Por esta razón, se desarrollaron los arrays de CGH, un método robusto y capaz de analizar los 24 cromosomas, así como desequilibrios cromosómicos menores de 5Mb, permitiendo la transferencia de los embriones en el mismo ciclo del análisis.

La PCR cuantitativa, además de aneuploidías, es capaz de caracterizar mutaciones en un gen, pequeñas duplicaciones, deleciones y translocaciones desequilibradas, así como mutaciones de ADN mitocondrial (10).

La secuenciación masiva (NGS) (*next generation sequencing*) aplicada a la genética embrionaria, ha abierto la posi-

---

bilidad de detectar alteraciones del ADN mitocondrial, enfermedades monogénicas, aneuploidías totales o parciales y síndromes asociados a microdeleciones en un sola ronda de análisis, con menor coste y mayor precisión que las plataformas de estudio anteriores (11-14). Esta técnica mejora incesantemente, aunque todavía no permite detectar reordenamientos cromosómicos equilibrados.

## TÉCNICAS NO INVASIVAS

### Tecnología time-lapse y morfocinética

La tecnología time-lapse asociada a la morfocinética permite realizar un análisis continuo del desarrollo embrionario bajo unas condiciones de cultivo muy estables (15).

Se han establecido algoritmos predictivos basados en la combinación de parámetros cinéticos y morfológicos que identifican los embriones con mayor poder implantatorio (16-19). Estos algoritmos se han construido en base a datos relacionados con el tiempo de división celular del embrión en sus primeros días de desarrollo. Además, se han descrito asociaciones entre parámetros morfocinéticos y la presencia de aneuploidías en el embrión (20, 21). La información obtenida tras la implantación de esta tecnología y las condiciones de cultivo estables han suscitado la importancia de estudiar el embrión de una manera dinámica. Fenómenos como la desaparición temprana de pronúcleos, absorción celular o la morulación temprana, que antes se desconocían o estaban muy poco estudiados, han sido descritos gracias a esta técnica.

## METABOLÓMICA

La metabolómica es el estudio y comparación de los metabolomas, es decir, la colección de todos los metabolitos (moléculas de bajo peso molecular) presentes en una célula, tejido u organismo en el momento de estudio.

Desde hace dos décadas se estudia el metabolismo embrionario con el fin de correlacionar la actividad metabólica con la viabilidad embrionaria y la capacidad de implantación.

La metabolómica dirigida es la técnica que analiza metabolitos previamente identificados y de estructura conocida, así como su cuantificación, siendo la técnica más utilizada para el análisis del metabolismo embrionario.

Sobre el metabolismo de carbohidratos, Gardner y colaboradores en 1996, observaron que la conversión de glucosa a lactato fue menor en blastocistos viables que en no viables, lo que indicaba que los embriones viables tenían un metabolismo oxidativo mucho más alto y una producción de energía más eficiente (23). Cinco años después vieron que la morfología embrionaria no estaba relacionada con la

actividad metabólica (23). También se describe que existe una disminución en los niveles de piruvato en el medio de cultivo hasta la etapa de mórula, sin embargo, es el consumo de glucosa en etapas posteriores el que descende (24). Como curiosidad, en 2010, se determina que los embriones femeninos parecen tener una tasa mayor de utilización de glucosa que lo masculinos (25).

En el metabolismo embrionario también intervienen otras moléculas biológicas. Relacionado con la calidad y el potencial desarrollo del embrión está lo que se denomina como el *turnover* de aminoácidos. Se observó que los embriones que se desarrollaban hasta blastocisto mostraban un mayor consumo de leucina en el medio de cultivo, así como un patrón de utilización de aminoácidos diferente entre los que lograban y no lograban desarrollarse por completo hasta éste estadio (26). Aminoácidos como la asparagina, la glicina, la leucina y el glutamato han sido asociados con la tasa de embarazo y de recién nacido vivo (27, 28). En 2010, Picton y colaboradores detallaron diferencias en el *turnover* de aminoácidos en función del estado cromosómico del embrión (29).

La respiración embrionaria también es un parámetro metabólico conocido, ya que se ha descrito una correlación entre el consumo de oxígeno, la calidad morfológica del embrión y la tasa de embarazo. En 2012, Tejera y colaboradores determinaron que la viabilidad embrionaria estaba asociada a una mayor tasa de consumo de oxígeno por parte del embrión (30).

Existe la hipótesis del embrión “tranquilo”, que correlaciona el metabolismo embrionario y su viabilidad, afirmando que los embriones con mayor potencial de desarrollo mantienen un nivel metabólico bajo con el fin de minimizar el consumo de energía y la producción de especies reactivas de oxígeno (31). No obstante, varios estudios aportan datos sugiriendo que la viabilidad embrionaria está asociada con un aumento de la actividad metabólica (32, 33).

La asociación de ciertos perfiles metabólicos con un determinado grado de desarrollo evidenció la posibilidad de definir la huella metabólica que permitiría asociar el metaboloma a un grado de morfología embrionaria, así como al potencial de implantación.

En 2013, Vergouw y colaboradores presentaron un nuevo algoritmo predictivo basado en el perfil metabólico a partir de los medios de cultivo de embriones transferidos individualmente. En este estudio, los autores observaron que embriones con una morfología similar podían mostrar perfiles metabólicos diferentes y por tanto diferentes catalogaciones. Cabe destacar que en la mayoría de estos estudios los metabolitos individuales no fueron identificados, sino que el índice de viabilidad fue creado en base al perfil

metabolómico general. Hasta la fecha, la validez de estos algoritmos frente a la evaluación morfológica convencional no ha demostrado una mejora de la tasa de embarazo (34, 35).

## PROTEÓMICA

La proteómica es el estudio y comparación de los proteomas, es decir, el conjunto de todas las proteínas y sus propiedades (niveles de expresión, modificaciones post-transcripcionales, interacciones, etc) expresadas en una célula, tejido u organismo en el momento concreto de estudio. A su vez, el secretoma embrionario se define como aquellas proteínas producidas y secretadas por el embrión al medio de cultivo, siendo una herramienta útil para obtener información sobre los procesos de embriogénesis temprana y la viabilidad del desarrollo posterior.

Actualmente, han sido identificadas moléculas del secretoma embrionario asociadas con diferentes funciones, siendo la característica común la modulación del proceso de implantación. (Tabla 1).

El factor activador de plaquetas, particularmente, no está asociado con la viabilidad embrionaria (36). En cambio la leptina, si está relacionada con el desarrollo hasta estadio de blastocisto, observándose una menor secreción de leptina en los embriones evolutivos (37, 38).

Además, se han descrito un grupo de moléculas como la proteína soluble que regula la expresión de HOXA10, el hCG y el antígeno leucocitario humano G soluble (sHLA-G), que se relacionan con la viabilidad embrionaria y el potencial de implantación del embrión (39-42). Aunque existen estudios que reportan embarazos por embriones sHLA-G indetectables o negativos (43, 44).

**TABLA 1**

### Descripción de proteínas del secretoma embrionario

MOLÉCULAS	PUBLICACIONES	DESCRIPCIÓN
Factor activador de plaquetas	O'Neill, 2005	Regulador del sistema inmunitario materno. No se ha asociado con la viabilidad embrionaria. Está implicado en la vasodilatación uterina promoviendo la implantación del blastocisto.
Leptina	González et al., 2000. Cervero et al., 2005.	Existe una relación inversa entre el aumento de la secreción de ésta molécula y la mejora en el desarrollo embrionario hasta blastocisto. Implicado en el proceso de implantación. Se expresa en el endometrio promoviendo la adhesión del embrión.
Molécula moduladora de la expresión HOXA10	Sakkas et al., 2003.	Favorece el proceso de implantación, particularmente del entorno endometrial.
Isoformas hCG	Butler et al., 2013.	Regulador de los procesos de implantación.
sHLA-G	Fuzzi et al., 2002. Noci et al., 2005 Tabiasco et al., 2009. Sargent et al., 2006.	Se relaciona con el éxito de la implantación y evita que el sistema inmunitario de la madre detecte al embrión como extraño, siendo un buen marcador de la viabilidad embrionaria. La concentración de sHLA-G depende del medio de cultivo utilizado. Se han descrito embarazos con embriones sHLA-G negativos. Existen estudios que muestran niveles indetectables de sHLA-G en el medio de cultivo.
Ubiquitina	Katz-Jaffe et al., 2006.	Proteínas más abundantes en el secretoma embrionario. La elevada expresión de esta proteína en embriones se relaciona con un aumento de la llegada a blastocisto.
Lipocalina-1	McReynolds et al., 2011.	Su expresión aumenta en blastocistos humanos aneuploides, inhibiendo el proceso de hatching e implantación.
CXCL13 y factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos	Dominguez et al., 2008	Son moléculas Implicadas en el proceso de implantación. Se ha descrito en blastocisto que habían implantado un descenso de estas proteínas en el medio de cultivo

El grupo de Gardner y colaboradores en 2006, observó y determinó que la ubiquitina aparecía poco expresada en embriones bloqueados (45). Dos años más tarde, este mismo grupo, determinó que existía una disminución de las proteínas CXCL13 y el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos en los medios de blastocistos que habían implantado previamente (46). En 2011, McReynolds y colaboradores describieron que la lipocalina-1 aumenta su expresión en blastocistos humano aneuploides, caracterizando esta proteína como el primer biomarcador para la detección no invasiva de aneuploidias (47). Este conjunto de biomoléculas aporta una información detallada de los procesos que ocurren en el metabolismo proteico durante el cultivo *in-vitro*. No obstante, en algunos ejemplos la información que aportan no es totalmente precisa y se requiere de más estudios para valorar estos indicadores y su relación con el potencial de implantación.

## CONCLUSIONES

Los avances técnicos en medicina reproductiva durante los últimos veinte años han dado como resultado un aumento destacable en las tasas de implantación. En esta revisión, se han descrito nuevos elementos de evaluación embrionaria que podrían hacer reflexionar sobre los criterios clásicos de estudio. La evaluación morfológica es la característica de estudio de mayor relevancia, sin embargo, solo con este método no se garantiza el embarazo. La incorporación de técnicas de análisis cromosómico junto con la morfocinética ha permitido una mejora en las tasas de implantación. La búsqueda de biomarcadores predictivos podría ayudar a seleccionar el mejor embrión a transferir. Profundizar en el conocimiento del proteoma y el metaboloma embrionario está dando pistas sobre la capacidad y la viabilidad de los embriones a largo plazo, mostrando resultados prometedores. Describir la huella metabólica de los embriones potencialmente viables es uno de los retos que en este campo quedan por definir. Existen todavía dudas sobre la relevancia clínica de estas moléculas biológicas y si de forma rutinaria podrían incorporarse al diagnóstico clínico a tiempo real, así como la relación de coste-efectividad que presentan.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Steptoe PC and Edwards RG. Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet* 1978;2:366.
2. Gerris JM. Single embryo transfer and IVF/ICSI outcome: a balanced appraisal. *Hum Reprod Update* 2005;11:105-121.
3. McLernon DJ, Harrild K, Bergh C, Davies MJ, de Neubourg D, Dumoulin JC, Gerris J, Kremer JA, Martikainen H and Mol BW. Clinical effectiveness of elective single versus double embryo transfer: meta-analysis of individual patient data from randomised trials. *BMJ* 2010;341:c6945.
4. Montag M, Liebenthron J and Koster M. Which morphological scoring system is relevant in human embryo development?. *Placenta* 2011;32 Suppl 3:S252-6.
5. Fragouli E, Alfarawati S, Spath K and Wells D. Morphological and cytogenetic assessment of cleavage and blastocyst stage embryos. *Mol Hum Reprod* 2014;20:117-126.
6. Alfarawati S, Fragouli E, Colls P, Stevens J, Gutierrez-Mateo C, Schoolcraft WB, Katz-Jaffe MG and Wells D. The relationship between blastocyst morphology, chromosomal abnormality, and embryo gender. *Fertil Steril* 2011;95:520-524.
7. Capalbo A, Rienzi L, Cimadomo D, Maggiulli R, Elliot T, Wright G, Nagy ZP and Ubaldi FM. Correlation between standard blastocyst morphology, euploidy and implantation: an observational study in two centers involving 956 screened blastocyst. *Hum Reprod* 2014;29:1173-1181.
8. Rubio C, Rodrigo L, Mercader A, Mateu E, Buendia P, Pehlivan T, Vilorio T, De los Santos MJ, Simón C, Remohí J et al. Impact of chromosomal abnormalities on preimplantation embryo development. *Prenat Diagn* 2007;27:748-756.
9. Werlin L, Rodi I, DeCherney A, Marelllo E, Hill D and Munne S. Preimplantation genetic diagnosis as both a therapeutic and diagnostic tool in assisted reproductive technology. *Fertil Steril* 2003;80:467-468.
10. Gardner DK, Meseguer M, Rubio C and Treff NR. Diagnosis of human preimplantation embryo viability. *Hum Reprod Update* 2015.
11. Fiorentino F, Biricik A, Bono S, Spizzichino L, Cotroneo E, Cottone G, Kokocinski F and Michel CE. Development and validation of next-generation sequencing-based protocol for 24-chromosome aneuploidy screening of embryos. *Fertil Steril* 2014;101:1375-1382.
12. Fiorentino F, Bono S, Biricik A, Nuccitelli A, Cotroneo E, Cottone G, Kokocinski F, Michel CE, Minasi MG and Greco E. Application of next-generation sequencing technology for comprehensive aneuploidy screening of blastocysts in clinical preimplantation genetic screening cycles. *Hum Reprod* 2014;29:2802-2813.
13. Treff NR, Fedick A, Tao X, Devkota B, Taylor D and Scott RT, Jr. Evaluation of targeted next-generation sequencing-based preimplantation genetic diagnosis of monogenic disease. *Fertil Steril* 2013;99:1377-1384.e6.
14. Yin X, Tan K, Vajta G, Jiang H, Tan Y, Zhang C, Chen F, Chen S, Zhang C, Pan X et al. Massively parallel sequencing for chromosomal abnormality testing in trophectoderm cells of human blastocysts. *Biol Reprod* 2013;88:69.
15. Kirkegaard K, Ahlstrom A, Ingerslev HJ and Hardarson T. Choosing the best embryo by time lapse versus standard morphology. *Fertil Steril* 2015;103:323-332.
16. Lemmen JG, Agerholm I and Ziebe S. Kinetic markers of human embryo quality using time-lapse recordings of IVF/ICSI-fertilized oocytes. *Reprod Biomed Online* 2008;17:385-391.
17. Meseguer M, Herrero J, Tejera A, Hilligsoe KM, Ramsing NB and Remohí J. The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Hum Reprod* 2011;26:2658-2671.
18. Wong CC, Loewe KE, Bossert NL, Behr B, De Jonge CJ, Baer TM and Reijo Pera RA. Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage. *Nat Biotechnol* 2010;28:1115-1121.
19. Kaser DJ and Racowsky C. Clinical outcomes following selection of human preimplantation embryos with time-lapse monitoring: a systematic review. *Hum Reprod Update* 2014;20:617-631.
20. Campbell A, Fishel S, Bowman N, Duffy S, Sedler M and Hickman CF. Modelling a risk classification of aneuploidy in human embryos using non-invasive morphokinetics. *Reprod Biomed Online* 2013;26:477-485.
21. Rienzi L, Capalbo A, Stoppa M, Romano S, Maggiulli R, Albricci L, Scarica C, Farcomeni A, Vajta G and Ubaldi FM. No evidence

- of association between blastocyst aneuploidy and morphokinetic assessment in a selected population of poor-prognosis patients: a longitudinal cohort study. *Reprod Biomed Online* 2015;20:57-66.
22. **Lane M and Gardner DK.** Selection of viable mouse blastocyst prior to transfer using a metabolic criterion. *Hum Reprod* 1996;11:1975-1978.
  23. **Gardner DK, Wale PL, Collins R and Lane M.** Glucose consumption of single post-compaction human embryos is predictive of embryo sex and live birth outcome. *Hum Reprod* 2011;26:1981-1986.
  24. **Gardner DK, Lane M, Stevens J and Schoolcraft WB.** Noninvasive assessment of human embryo nutrient consumption as a measure of developmental potential. *Fertil Steril* 2001;76:1175-1180.
  25. **Gardner DK, Larmen MG and Thouas GA.** Sex-related physiology of the preimplantation embryo. *Mol Hum Reprod* 2010;16:539-547.
  26. **Houghton FD, Hawkhead JA, Humpherson PG, Hogg JE, Balen AH, Rutherford AJ and Leese HJ.** Non-invasive amino acid turnover predicts human embryo developmental capacity. *Hum Reprod* 2002;17:999-1005.
  27. **Brisson DR, Houghton FD, Falconer D, Roberts SA, Hawkhead J, Humpherson PG, Lieberman BA and Leese HJ.** Identification of viable embryos in IVF by non-invasive measurement of amino acid turnover. *Hum Reprod* 2004;19:2319-2324.
  28. **Seli E, Botros L, Sakkas D and Burns DH.** Noninvasive metabolomics profiling of embryo culture media using proton nuclear magnetic resonance correlates with reproductive potential of embryos in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2008;90:2183-2189.
  29. **Picton HM, Elder K, Houghton FD, Hawkhead JA, Rutherford AJ, Hogg JE, Leese HJ and Harris SE.** Association between amino acid turnover and chromosome aneuploidy during human preimplantation embryo development in vitro. *Mol Hum Reprod* 2010;16:557-569.
  30. **Tejera A, Herrero J, Vioria T, Romero JL, Gamiz P and Meseguer M.** Time-dependent O<sub>2</sub> consumption patterns determined optimal time ranges for selecting viable human embryos. *Fertil Steril* 2012;98:849-57.e1-3.
  31. **Baumann CG, Morris DG, Sreenan JM and Leese HJ.** The quiet embryo hypothesis: molecular characteristics favoring viability. *Mol Reprod Dev* 2007;74:1345-1353.
  32. **Hardy K, Hooper MA, Handyside AH, Rutherford AJ, Winston RM and Leese HJ.** Non-invasive measurement of glucose and pyruvate uptake by individual human oocytes and preimplantation embryos. *Hum Reprod* 1989;4:188-191.
  33. **Gott AL, Hardy K, Winston RM and Leese HJ.** Non-invasive measurement of pyruvate and glucose uptake and lactate production by single human preimplantation embryos. *Hum Reprod* 1990;5:104-108.
  34. **Vergouw CG, Botros LL, Roos P, Lens JW, Schats R, Hompes PG, Burns DH and Lambalk CB.** Metabolomic profiling by near-infrared spectroscopy as a tool to assess embryo viability: a novel, non-invasive method for embryo selection. *Hum Reprod* 2008;23:1499-1504.
  35. **Vergouw CG, Kieslinger DC, Kosteljik Eh, Botros LL, Schats R, Hompes PG, Sakkas D and Lambalk CB.** Day 3 embryo selection by metabolomics profiling of culture medium with near-infrared spectroscopy as an adjunct to morphology: a randomized controlled trial. *Hum Reprod* 2012;27:2304-2311.
  36. **O'Neill C.** The role of paf in embryo physiology. *Hum Reprod Update* 2005;11:215-228.
  37. **Gonzalez RR, Caballero-Campos P, Jasper M, Mercader A, Devoto L, Pellicer A and Simon C.** Leptin and leptin receptor are expressed in the human endometrium and endometrial leptin secretion is regulated by the human blastocyst. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:488-4888.
  38. **Cervero A, Horcajadas JA, Dominguez F, Pellicer A and Simon C.** Leptin system in embryo development and implantation: a protein in search of a function. *Reprod Biomed Online* 2005;10:217-223.
  39. **Sakkas D, Lu C, Zulfikaroglu E, Neuber E and Taylor HS.** A soluble molecule secreted by human blastocysts modulates regulation of HOAX10 expression in an epithelial endometrial cell line. *Fertil Steril* 2003;80:1169-1174.
  40. **Butler SA, Luttoo J, Freire MO, Abban TK, Borrelli PT and Iles RK.** Human chorionic gonadotropin (hCG) in the secretoma of cultured embryos: hyperglycosylated hCG and hCG-free beta subunit are potential markers for infertility management and treatment. *Reprod Sci* 2013;20:1038-1045.
  41. **Fuzzi B, Rizzo R, Criscuoli L, Noci I, Melchiorri L, Scarselli B, Bencini E, Menicucci A and Baricordi OR.** HLA-G expression in early embryos is fundamental prerequisite for the obtainment of pregnancy. *Eur J Immunol* 2002;32:311-315.
  42. **Noci I, Fuzzi B, Rizzo R, Melchiorri L, Criscuoli L, Dabizzi S, Biagiotti R, Pellegrini S, Menicucci A and Baricordi OR.** Embryonic soluble SLA-G as a marker of developmental potential in embryos. *Hum Reprod* 2005;20:138-146.
  43. **Tabiasco J, Perrier d'Hauterive S, Thonon F, Parinaud J, Leandri R, Foidart JM, Chaouat G, Munaut C, Lombroso R, Selva J et al.,** Soluble HLA-G in IVF/ICSI embryo culture supernatants does not always predict implantation success: a multicenter study. *Reprod Biomed Online* 2009;18:374-381.
  44. **Sargent I, Swales A, Ledee N, Kozma N, Tabiasco J and Le Bouteiller P.** sHLA-G production by human IVF embryos: can it be measured reliably? *J Reprod Immunol* 2007;75:128-132.
  45. **Katz-Jaffe Mg, Schoolcraft WB and Gardner DK.** Analysis of protein expression (secretoma) by human and mouse preimplantation embryos. *Fertil Steril* 2006;86:678-685.
  46. **Dominguez F, Gadea B, Esteban FJ, Horcajadas JA, Pellicer A and Simon C.** Comparative protein-profile analysis of implanted versus non-implanted human blastocysts. *Hum Reprod* 2008;23:1993-2000.
  47. **McReynolds S, Vanderlinden L, Stevens J, Hansen K, Schoolcraft WB and Katz-Jaffe MG.** Lipocalin-1: a potential marker for non-invasive aneuploidy screening. *Fertil Steril* 2011;95:2631-2633.