



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Tesis presentada para optar al grado académico de
Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas**

**Desarrollo de una metodología no invasiva basada en
espectroscopía Infrarroja, para la detección del
potencial reproductivo de embriones previo a su
transferencia en tratamientos de fertilización asistida**

Cecilia Beatriz Figoli

Tesista

Maria Alejandra Nieves Bosch

Directora

2017



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Secretaría de Posgrado

Defensa de Tesis Doctoral para optar al grado académico de Doctor de la
Facultad de Ciencias Exactas

Área Ciencias Biológicas - Acreditada por CONEAU. Categoría A. Res. 521/01.

Tesis Doctoral

Desarrollo de una metodología no invasiva basada en espectroscopía Infrarroja, para la detección del potencial reproductivo de embriones previo a su transferencia en tratamientos de fertilización asistida

Cecilia Beatriz Fígoli
Tesisista

Maria Alejandra Nieves Bosch
Directora

Comité Evaluador:

Dr. Prof. Alberto Capparelli
Facultad de Ciencias Exactas-UNLP

Dra. Cecilia Cristina Furnus
Facultad de Ciencias Veterinarias- UNLP

Dr. Rafael Fernandez y Martin
Facultad de Ciencias Veterinarias -UBA

2017

Miembros del Jurado

Dra. Cecilia C. Furnus

*Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción. Instituto de Genética Veterinaria (IGEVET, CONICET- CCT La Plata- UNLP).
Facultad de Ciencias Veterinarias UNLP.*

Dr. Rafael Fernandez y Martin

Laboratorio de Biotecnología Animal, Instituto de Investigaciones en Producción Animal (INPA-CONICET).

Dr. Alberto Caparelli

Profesor Extraordinario, Cátedra Fisicoquímica básica.

EL PRESENTE TRABAJO DE TESIS, PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE “DOCTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS”, SE REALIZÓ EN EL CENTRO DE INVESTIGACION Y DESARROLLO DE FERMENTACIONES INDUSTRIALES (CINDEFI) Dr. J.J. ERTOLA, FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA; BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA. MARIA ALEJANDRA NIEVES BOSCH.



La Plata, Marzo de 2017.

Este trabajo de Tesis Doctoral fue realizado en el marco de una **Beca de Formación de postgrado interna con Empresas** y dos **Proyectos de Transferencia Tecnológica**:

Proyecto Internacional “**Grant for Fertility Innovation**”, **GFI-2012**. Otorgado por el Laboratorio Merck-Serono. Título: *"Fourier-Transform Infrared spectroscopy in metabolomics and its application to embryo assessment in IVF"*. Directores: Osvaldo Yantorno, Alejandra Bosch, Marcos Horton, Marcelo Garcea. Premio: Euros 190.000 (destinados a la adquisición y modernización del equipamiento en ambos laboratorios CINDEFI y para PREGNA). Período: 2012-2014

Proyecto ANR 800/2011 del Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva, Fondo Tecnológico Argentino (**FONTAR**), Convocatoria 2011. Proyecto aprobado NA 183/11: *"Diseño y Desarrollo de una Metodología no invasiva para la detección del potencial reproductivo de embriones humanos basada en Espectroscopía Infrarroja con transformada de Fourier combinada con Redes Neuronales Artificiales"*. Empresa contraparte: CENTRO DE FERTILIDAD BUENOS AIRES S.A. (PREGNA). Directores: Dr. Prof. Osvaldo Yantorno (CINDEFI) y Dr. Marcos Horton (PREGNA). Directores Técnicos: Dr. Marcelo Garcea (PREGNA) y Dra. Alejandra Bosch (CINDEFI). Monto aprobado por FONTAR: \$ 798.000. Fondos Laboratorio CINDEFI: \$ 395.000. Período: 2012-2015.

El trabajo fue llevado a cabo bajo la firma de un **acuerdo de confidencialidad** con Merck-Serono, Centro Medico de Fertilización PREGNA Medicina Reproductiva y CONICET.

Resultados obtenidos

Los resultados obtenidos en el marco de este trabajo de investigación no han podido hasta el presente ser volcados en publicaciones y/o patentes por el compromiso de confidencialidad que se exigió para a la ejecución del proyecto, tanto por parte de PREGNA como así también cuando el CONICET me otorgó una Beca Cofinanciada con empresa. Se acordó que después de presentar la tesis se buscaría publicar y/o patentar los resultados obtenidos.

Los resultados preliminares obtenidos durante el trabajo de tesis (mantenidos bajo estrictas normas de confidencialidad), recibieron diferentes premios y distinciones:

Distinción de la Honorable Cámara de Diputados de la Nación - Diputada de la Nación Dra. Olga E. Guzmán (Expte: 5662-D-2012) ante la Honorable Cámara de Diputados de la Nación como beneplácito por la tarea llevada a cabo por la DRa. Alejandra Bosch y el Dr. Osvaldo Yantorno en el CINDEFI con motivo de las investigaciones llevadas a cabo en el campo de la Fertilización Asistida. La Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP inició el Expte: 0700-013031/12-000, donde toma conocimiento de la nota de la Diputada Nacional y lo envía al Dpto. de Química, al CINDEFI y para conocimiento de los interesados.

Premio Ciencia y Comunidad 2013. Dr. Pedro J. Carriquiriborde”, en el Área Desarrollo Social, Trabajo y/o Salud- Otorgado por la Comisión de Investigaciones Científicas CIC PBA, Ministerio de Producción, Ciencia y Tecnología de la Provincia de Buenos Aires. Distinción a la Dra. Alejandra Bosch y el grupo de trabajo del CINDEFI por el impacto de su investigación en la mejora de calidad de vida de la población de la provincia de Buenos Aires. Premio \$ 50.000 (cincuenta mil pesos) y Diploma de Honor para el grupo de investigación. El premio fue otorgado el 20 de septiembre, 2013, en el Teatro Argentino de La Plata, en el marco del 1er Congreso Internacional Científico/tecnológico de la Provincia de Buenos Aires.

Premio INNOVAR 2015. Concurso Nacional de Innovaciones. Premio otorgado en el Concurso INNOVAR de la Secretaría de Planeamiento y Políticas de Ciencia e Investigación del Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva (MINCyT). **Proyecto 18645: Redes Neuronales artificiales para evaluar la probabilidad de implantación de embriones en tratamientos de fertilización asistida.** Autores: Alejandra Bosch, Osvaldo Yantorno, Cecilia Figoli, Marcos Horton, Marcelo Garcea, Mariana Gomez Peña, Claudio Bisioli, Fernando Althabe y Luz Gibbons. Octubre 2015.

Mención de Honor a la Innovación UNLP 2015: Premio otorgado por la Universidad Nacional de La Plata en el marco de la entrega de los Premios a la “Labor Científica, Tecnológica y Artística”, y a la “Innovación de la UNLP”.
Mención de Honor a la Innovación: Desarrollo de un sistema informático multivariante basado en espectroscopía infrarroja para evaluar el potencial de implantación de embriones en tratamientos de fertilización asistida. 14 de Diciembre de 2015.

Simultáneamente a la realización de trabajo de tesis doctoral, gracias a los conocimientos adquiridos espectroscopía FTIR y métodos de análisis quemométricos participé en proyectos de cooperación en otras temáticas lo que me permitió se parte de las siguientes publicaciones:

Autor: Claudia Prieto, María J. Palab, Pablo Martina, Carlos Achiary, Andrés Achiary, Marisa Bettiol, Patricia Montanaro, María L. Cazzola, Mariana Leguizamón, Cintia Massillo, **Cecilia Fígoli**, Brenda Valeiras, Silvia Perez, Fernando Rentería, Graciela Diez, Osvaldo M. Yantorno y Alejandra Bosch.

Año: 2016

Título del trabajo: Cystic Fibrosis Cloud database: Un sistema informático para el almacenamiento y manejo de datos clínicos y microbiológicos del paciente con fibrosisquística.

Nombre de la revista: Revista Argentina de Microbiología.

Volumen: 48

Páginas: 27-37

DOI: 10.1016/j.ram.2015.11.002

Autor: **Cecilia B. Fígoli**, Raúl R. Gamba, Gisele Kikot, Mariana Leguizamón, Rodrigo Rojo, Laura A. Gasoni, Alejandra Bosch, Teresa M. Alconada.

Año: 2016

Título del trabajo: Characterization of Fusarium graminearum isolates recovered from wheat samples of Argentina by Fourier Transform Infrared spectroscopy: Phenotypic diversity and detection of specific markers of aggressiveness

Nombre de la revista: International Journal of Food Microbiology

Factor de impacto 3.445

Volumen: 244

Páginas: 36-42

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.12.016>

Autor: Astoreca A, Ortega L, **Fígoli C**, Cardós M, Cavagliari L, Bosch A, Alconada T.

Título del trabajo: Analytical techniques for deoxynivalenol detection and quantification in wheat destined for the manufacture of commercial products.

Nombre de la revista: World Mycotoxin Journal.

Factor de impacto 2.091

Aceptado, En prensa

Ref. No.: wmj-2016-07-2121

DOI: <http://dx.doi.org/10.3920/WMJ2016.2121>

Agradecimientos

A mi directora la Dra. Alejandra Bosch que me han dado toda su confianza y apoyo a lo largo de este trabajo de investigación. Durante todo este ciclo me brindó sus conocimientos y experiencias. Por contribuir en mi crecimiento y formación académica. Su generosidad y apoyó me permitió vivir experiencias sorprendentes.

Dr. Osvaldo M. Yantorno por aceptarme en su laboratorio para realizar este trabajo de tesis, por compartir durante todo este tiempo su valiosa experiencia y conocimientos. Por los consejos transmitido.

Dr. Marcos Horton, Dr. Marcelo Garcea, Claudio Bisioli, Mariana Gomez Lopez, Fernando Althabe, Luz Gibbons por permitirme ser parte de este proyecto. Por brindar sus valiosos conocimientos y hacer que este proyecto de investigación se haga realidad.

Dr. Achim Kohler y Dr. Peter Lasch por haberme recibido en sus laboratorios, y a sus increíbles grupos de trabajo que hicieron que me sienta en casa. Por el conocimiento transmitido y la ayuda brindada. Por darme la oportunidad de crecer personal y profesionalmente.

Especialmente a Julio Figari por compartir su valiosa experiencia y compañía durante estos cuatro años que hemos compartido.

A mis compañeros del Laboratorio 2, por tantos momentos y experiencias compartidos. Extiendo mi agradecimiento a mis compañeros de trabajo y a los que han transitado por sus pasillos por brindarme su ayuda.

A mis amigos de La Plata que hacen que vivir en esta linda ciudad sea una experiencia llena de anécdotas y buenos momentos.

Mis amigas de siempre que a pesar de la distancia siempre están presentes dándome su apoyo y consejo.

A mi familia por darme todo el apoyo para nunca dejar de perseguir mis sueños.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	1
GLOSARIO.....	3
 INTRODUCCIÓN	
Conceptos generales.....	5
1 Infertilidad.....	6
1.1 Etiología de la infertilidad femenina.....	7
1.2 Etiología de la infertilidad masculina.....	7
1.3 Factores psicológicos.....	7
1.4 Datos demográficos de infertilidad.....	8
2 Globalización de las Tecnologías de Reproducción Asistida (TRA, <i>Assisted Reproductive Technology</i>).....	9
2.1 Tecnologías de Reproducción Asistida.....	10
2.1.1 Selección de embriones.....	14
2.2 Metabolismo del embrión en el período de pre-implantación.....	15
3. Espectroscopía Infrarroja.....	18
3.1 Interacción de la radiación electromagnética con la materia.....	18
3.1.2 Origen de las bandas de absorción. Interpretación teórica.....	20
3.1.3 Observación de las vibraciones moleculares.....	22
3.1.4 Intensidad y ancho de banda.....	25
4 Tecnología de la espectroscopia Infrarroja.....	27
4.1 Espectrómetro Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR).....	27
4.2 Tecnología de medición de espectros FTIR.....	28
4.3 Espectroscopía FTIR en materiales biológicos complejos.....	30
4.3.1 Procedimientos para el análisis de muestras biológicas.....	35
4.3.1.1 Muestreo y Adquisición de datos.....	36
4.3.2 Tratamiento de los datos y técnicas de evaluación.....	37
4.3.2.1 Análisis multivariantes.....	38
4.3.2.1.1 Métodos multivariantes no supervisados.....	41

4.3.2.1.2 Métodos multivariantes supervisados.....	41
4.4 Aplicaciones de la espectroscopía FTIR en la biología, la microbiología, la industria y el diagnóstico médico.....	42
HIPÓTESIS.....	46
OBJETIVOS	
1 Objetivo general.....	48
1.1 Objetivos específicos.....	48
MATERIALES Y METODOS	
Esquema general del trial clínico.....	52
MÓDULO A	
Obtención de embriones y sobrenadantes de cultivos de embriones <i>in vitro</i>	54
1 Pacientes y procedimiento para la obtención de óvulos.....	54
2 Laboratorio de embriología.....	55
2.1 Clasificación morfológica de embriones.....	57
2.3 Muestras adicionales empleadas como control.....	59
2.4 Identificación de las muestras.....	59
2.5 Obtención y preservación de los sobrenadantes de cultivo.....	59
MÓDULO B	
Construcción de una plataforma para almacenar, extraer y utilizar la información generada.....	62
MÓDULO C	
Análisis de sobrenadantes de cultivo de embriones por espectroscopía FTIR.....	65
1 Instalación y puesta en marcha del espectrómetro FTIR.....	66
2 Parámetros de adquisición de espectros.....	67
2.1 Cantidad óptima de sobrenadante de cultivo.....	67
2.2 Optimización y estandarización de los parámetros de registro de espectros FTIR.....	68

2.3 Optimización del tiempo y modo de secado de las muestras en las celdas de ZnSe.....	69
3 Pre-procesamiento de datos espectrales en muestras biológicas.....	69
3.1 Test de calidad.....	70
3.2 Normalización.....	78
3.3 Corrección Multiplicativa de la Señal Extendida (Extended Multiplicative Signal Correction- EMSC).....	78
3.3 Aumento de resolución espectral.....	79
3.4 Sustracción espectral.....	80
4 Generación de identificadores de espectros.....	81
5 Librería espectral.....	82
6 Análisis de los espectros para caracterización y construcción de modelos de discriminación.....	83
6.1 Estudio y análisis de los espectros.....	83
6.1.1 Análisis Univariante.....	84
6.1.1.1 Análisis de bandas espectrales.....	84
6.1.2 Análisis multivariantes por reconocimiento de <i>patterns</i>	84
6.1.2.1 Análisis de Cluster.....	84
6.1.2.1.1 Análisis de cluster no supervisado	86
6.1.2.1.2 Análisis de cluster supervisado.....	86
6.1.2.2 Redes Neuronales Artificiales (RNAs).....	88
6.1.2.3 Análisis de datos por métodos no supervisados.....	93
6.1.2.3.1 Análisis de un solo conjunto de datos.....	94
6.1.2.3.1.1 Análisis de Componente Principal (ACP).....	94
6.1.2.3.1.2 Análisis Factorial.....	96
6.1.2.3.2 Análisis de dos conjuntos de datos.....	97
6.1.2.3.2.1 Mínimos Cuadrados Parciales (Partial Least Squares - PLS).....	97

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

MÓDULO A

Obtención de embriones y sobrenadantes de cultivos de embriones <i>in vitro</i>	101
---	-----

1 Pacientes y procedimiento de fertilización <i>in vitro</i>	101
MÓDULO B	
Construcción de una plataforma para almacenar, extraer y utilizar la información generada.....	104
1 Construcción de la plataforma OpenClinica	104
2 Procedimientos del Ensayo Clínico.....	106
3 Análisis de factores que afectan la probabilidad de implantación.....	109
3.1 Edad materna.....	110
3.2 Índice de masa corporal materna.....	112
3.3 Tabaquismo.....	113
3.4 ¿Las Características morfológicas están asociadas a la implantación?.....	115
MÓDULO C	
Análisis de sobrenadantes de cultivo de embriones por FTIR.....	118
1 Preparación de muestras y parámetros de adquisición de espectros.....	118
1.1 Optimización de la cantidad de sobrenadante de cultivo, del tiempo y modo de secado de las muestras en las celdas de ZnSe.....	118
2 Pre-procesamiento de datos espectrales en muestras biológicas.....	121
2.1 Test de calidad.....	121
2.1.1 Evaluación de la cantidad de aceite (λ).....	122
2.2 Normalización.....	124
2.3 Aumento de resolución.....	124
2.4 Sustracción espectral.....	125
3 Construcción de la Librería o base de datos espectral.....	128
4 Estudios de reproducibilidad o variabilidad.....	131
4.1 Análisis de variabilidad en los espectros registrados en los pocillos del plato de ZnSe.....	131
4.2 Análisis de la variabilidad del medio de cultivo proveniente de diferentes muestras y lotes.....	133
4.2.1 Variabilidad espectral en un mismo lote de medio de cultivo G1 Plus.....	133
4.2.2 Variabilidad espectral entre diferentes lotes de medio de cultivo G1 Plus.....	134
4.3 Análisis de heterogeneidad de los espectros dentro de cada clase.....	137
5. Análisis espectral.....	138

5.2 Estudio de la asociación entre la morfología de los embriones de 3 días de incubación y la metabolómica	139
5.3. Desarrollo de métodos basados en FTIR para determinar el potencial de implantación de embriones.....	142
5.3.1 Desarrollo de métodos de discriminación basados en la presencia de marcadores espectrales asociados a la implantación.....	143
5.3.2 Desarrollo de un modelo basado en Redes Neuronales Artificiales (RNAs) para predecir el potencial de implantación de embriones.....	149
5.3.3 Desarrollo de un modelo matemático no supervisado para la estimación del potencial de implantación de embriones.....	155
5.3.4 Construcción de un modelo basado en análisis PLS que combine datos espectrales con otro tipo de datos.....	161

CONCLUSIONES

1 Conclusión general.....	168
1.1 Conclusiones particulares.....	168
Módulo A “Obtención de embriones y sobrenadantes de cultivos de embriones in vitro” y Módulo B “Construcción de una plataforma para almacenar, extraer y utilizar la información generada”.....	168
Módulo C Análisis de sobrenadantes de cultivo de embriones por FTIR.....	169

ANEXOS

ANEXO I

Aprobación del protocolo de referencia por el Comité de Ética en Investigación, Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas “Norberto Quirno” (CEMIC).....	174
--	-----

ANEXO II

Consentimiento para participar en un estudio de investigación clínica y autorizar la divulgar información.....	176
--	-----

ANEXO III

Formularios para la toma de datos.....	180
--	-----

ANEXO IV

Instructivo dirigido al personal involucrado..... 202

BIBLIOGRAFÍA 212

ABREVIATURAS

A/T	Absorbancia/Transmitancia
AC	Análisis de cluster
ACP	Análisis componente principal
ACS	Análisis de Cluster Supervisado
AF	Análisis Factorial
ATR	Reflectancia Total Atenuada
BMI	Índice de masa corporal (body mass index)
CP	Componente principal
CRF	Formularios de reporte
DET	Doble transferencia de embriones
EMSC	Extensión de la Corrección Multiplicativa de la Señal
eSET	Transferencia electiva de un solo embrión
ESHRE	Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología (European Society of Human Reproduction and Embryology)
FIR	Infrarrojo lejano
FIV	Fertilización <i>in vitro</i>
FSH	Hormona folículo estimulante
FTIR	Espectrómetro Infrarrojo con Transformada de Fourier
GnRH	Gonadotropina humana
ICSI	Inyección intra-citoplasmática de esperma
ID	Identificador
IECS	Instituto de Efectividad Clínica y Sanitaria
IFFS	Federación Internacional de la Sociedad de Fertilidad
IMC	Masa celular interna
IR	Absorción infrarroja

LH	Hormona luteinizante
MIR	Infrarrojo medio
NIR	Infrarrojo cercano
OMS	Organización mundial de la salud
PFK	Fosfofructoquinasa
PLS	Mínimos cuadrados parciales
PN	Pronúcleos
QT	Test de calidad
RAFA	Sociedad Argentina de Medicina Reproductiva
RNA	Redes neuronales artificiales
TE	Trofoblasto
TRA o ATR	Assisted Reproductive Technologies
λ	Cantidad de aceite

GLOSARIO

- **Adenomiosis**: presencia de tejido endometrial que se ha pasado hacia el miometrio causando un engrosamiento uterino.
- **Clase I**: Espectros de los sobrenadantes de cultivo de embriones que provienen de una transferencia en la que todos los embriones transferidos implantaron.
- **Clase II**: Espectros de los sobrenadantes de cultivo de embriones correspondientes a una transferencia en la que solo un embrión implantó.
- **Clase III**: Espectros de sobrenadantes de cultivo de embriones que provienen de una transferencia en la que ninguno de los embriones transferidos implantaron.
- **Criptorquidia**: trastorno del desarrollo en los mamíferos que consiste en el descenso incompleto de uno o ambos testículos a través del canal inguinal hacia el escroto.
- **Disfunción Ovárica**: alteración patológica de la función ovárica que se traduce en alteraciones del ciclo menstrual.
- **Fertilidad**: capacidad reproductiva de la pareja; en el hombre de procrear hijos y en la mujer de concebir, lograr embarazo y dar a luz.
- **Folículos**: estructura compuesta por el ovocito rodeado de diferentes tipos celulares.
- **FSH**: hormona folículo estimulante producida en la hipófisis. Regula la maduración de los ovocitos en la mujer y en el hombre regula la maduración de los espermatozoides.
- **GnRH**: hormona producida en el hipotálamo, encargada de estimular a la hipófisis para que secrete las hormonas gonadotropinas FSH y LH.
- **Hidrosálpinx**: Acumulación de líquido seroso en las trompas. Suele contener detritus, bacterias y elementos inflamatorios, que pueden pasar retrógradamente al útero y dificultar la implantación.
- **Infertilidad**: incapacidad de la pareja para concebir hijos. Se diagnostica después de un año de exposición a la probabilidad de que ocurra un embarazo.
- **LH**: hormona luteinizante producida en la hipófisis, regula la ovulación y el desarrollo del cuerpo lúteo en la mujer. En el hombre estimula la producción de testosterona.
- **Pacientes tipo I**: Pacientes en los cuales todos los embriones transferidos implantaron.
- **Pacientes tipo II**: Pacientes en los cuales solo uno de los embriones transferidos completó.
- **Pacientes tipo III**: Pacientes en los cuales ninguno de los embriones transferidos completó.
- **Síndrome de ovario poliquístico**: también llamado síndrome de Stein-Leventhal, es un trastorno endocrino que causa uno de los desequilibrios hormonales más frecuentes en mujeres de edad reproductiva.
- **Síndrome de hiperestimulación ovárica**: es una complicación ocasional en mujeres que se encuentran bajo un tratamiento de fertilidad para el estímulo de la ovulación. Consiste en una respuesta anormalmente elevada de los ovarios ante una estimulación hormonal que persiste y se prolonga.

Introducción

Conceptos generales

La infertilidad es un trastorno multifactorial que se estima afecta al 15% de las parejas en edad reproductiva y que constituye un problema de salud creciente debido a la tendencia a la postergación de la edad de la maternidad ya sea por motivos profesionales y/o sociales. En la Argentina, se realizan unos 9.000 ciclos de Reproducción Asistida al año, y se estima que esa cifra se triplicaría en los próximos años. De todos los tratamientos disponibles, las tecnologías de reproducción asistida (TRA o ATR por **Assisted Reproductive Technologies**) ofrecen los más altos índices de éxito a las parejas infértiles. Entre éstas tecnologías se incluye la **fertilización *in vitro* (FIV)**, este procedimiento puede realizarse por un proceso por el cual los óvulos son fertilizados por el espermia fuera del cuerpo o una técnica en la que un solo espermatozoide se inyecta bajo microscopio directamente en un óvulo maduro (inyección intra-citoplasmática de espermia-ICSI). Se ha estimado que más de 3 millones de niños en todo el mundo han sido concebidos a través de las TRA desde el nacimiento de Louise Brown en 1978. A pesar de la amplia aplicación y de los avances en estas tecnologías en las últimas décadas, sólo el 25,2% de los embriones formados implantan y dan como resultado un nacido vivo. Uno de los desafíos más apremiantes de estos tratamientos es entonces encontrar un método que permita aumentar el potencial de implantación de los embriones, mejorando la probabilidad de un nacimiento vivo para una pareja infértil. La opción preferida ha sido transferir un mayor número de embriones, y de esta manera aumentar las posibilidades de la pareja infértil de lograr el embarazo. Si bien este procedimiento mejora las probabilidades de implantación, aumenta significativamente los embarazos múltiples, la exposición a los riesgos de sufrir hipertensión arterial, diabetes, partos por cesárea y mortalidad materna. Para superar este problema, muchos centros de fertilización han disminuido el número de embriones a transferir a dos, conocida como la doble transferencia de embriones o incluso a sólo uno, denominada transferencia electiva de un solo embrión. Estas prácticas han disminuido notablemente los embarazos múltiples pero han reducido significativamente también, la tasa de embarazo. **El objetivo contemporáneo más importante de la investigación de la infertilidad es disminuir la prevalencia de las gestaciones múltiples, manteniendo o mejorando las tasas generales de embarazo.** El gran desafío consiste en desarrollar un método de selección de embriones con gran potencial de implantación en el útero, reduciendo el número de embriones a transferir sin comprometer el pronóstico de nacimiento exitoso.

1 Infertilidad

La reproducción humana es crítica para la perpetuación de su especie, sin embargo el proceso es relativamente ineficiente (Norwitz y col., 2001). El establecimiento de un embarazo requiere una interacción física íntima y un diálogo molecular entre el embrión y el tracto reproductivo materno que comienza en la implantación y continúa hasta que la placenta se forma y es completamente funcional. El fracaso de los procesos regulatorios que aseguran la fidelidad de esta relación puede precipitar la pérdida del embarazo (Jessmon y col 2009). La **probabilidad de concebir durante un ciclo menstrual es aproximadamente del 30%** y solo entre el 50% y 60% de las concepciones prosiguen luego de las 20 semanas de gestación. De los embarazos que se pierden, el 75% se debe a una falla en la implantación y por ello no son reconocidos clínicamente (Norwitz y col., 2001).

La concepción de un hijo es un evento muy importante en la vida del ser humano, y está fuertemente ligado con el objetivo último de la felicidad, la integridad y la consolidación de la familia (Kelly-Weeder y Cox, 2006). Una reproducción exitosa es la prueba fehaciente de la fertilidad de los individuos. La fertilidad se define como la capacidad de un individuo para inducir el embarazo o concebir en el plazo de un año de relaciones sexuales sin protección (Benagiano y col., 2006). Mientras, la **infertilidad es la incapacidad de los individuos para establecer el embarazo**, a pesar de relaciones sexuales regulares (Gnoth y col., 2005). Hay principalmente dos tipos de infertilidad, la infertilidad primaria, la cual denota una situación en la que las parejas nunca han dado a luz niños; mientras que la infertilidad secundaria se define como la condición en la que las parejas son incapaces de dar a luz niños después de doce meses de relaciones sexuales (sin medicamentos anticonceptivos) después de una concepción anterior (Sami y col., 2006).

La incapacidad de tener hijos afecta a hombres y mujeres de todo el mundo. La incidencia de la infertilidad varía ampliamente en función del país, la región, las zonas rurales o urbanas, e incluso las costumbres. En los países desarrollados se observa un incremento de la infertilidad, principalmente debido a la incorporación de la mujer al mundo del trabajo lo cual ha retrasado la edad de la primera gestación, con lo que aumenta el riesgo de esterilidad.

La **infertilidad afecta al 15% de la población en edad reproductiva** de todo el mundo, y puede estar provocada por un factor único o varios factores concomitantes.

1.1 Etiología de la infertilidad femenina

Un gran número de mujeres se ven afectadas por problemas de fertilidad. En los EE.UU. se ha estimado que 6.1 millones de mujeres con edades entre 15 y 44 tienen dificultades para concebir o mantener un embarazo (Bold, 2016). Algunas de las principales causas incluyen el síndrome de ovario poliquístico, miomas uterinos (fibroides), insuficiencia ovárica prematura, enfermedad inflamatoria pélvica, factor cervical, endometriosis, otros problemas en las trompas y cuestiones genéticas, así como el tratamiento del cáncer (Bold, 2016). La falla en la ovulación es la causa más frecuente de infertilidad femenina, afectando aproximadamente al 20-25%, mientras que otro 20% tiene patología tubárica y un 10% una barrera cervical (Gori y col., 2005).

1.2 Etiología de la infertilidad masculina

Las causas de infertilidad masculinas son múltiples y llegan a ser tan frecuentes como las femeninas. El factor masculino contribuye de manera importante a la infertilidad y es responsable aproximadamente del 50% de los casos (Stephen y col., 2006). Ésta es causada principalmente por la concentración de espermatozoides deficientes, disminución de la viabilidad de los espermatozoides, volumen total reducido de semen y la anomalía en la morfología de los espermatozoides (Feng, 2003). Por otra parte, existen otros factores de riesgo responsables de la espermatogénesis defectuosa y la infertilidad masculina, incluyendo la criptorquidia, lesiones obstructivas, varicocele, problemas eyaculatorios, infecciones del tracto genitourinario (bacterianas, así como protozoos), accidente, fibrosis quística, complicaciones genéticas, factores ambientales, factores inmunológicos, estrés oxidativo, deficiencias nutricionales de los oligoelementos, el nivel de fructosa y vitaminas etc. (Agarwal y col., 2008; Wong y col., 2000). Además, la etiología de la infertilidad incluye anomalías en cualquier parte del sistema reproductivo (Jungwirth y col., 2012).

1.3 Factores psicológicos

Existen factores psicológicos como causa única de infertilidad, inclusive cuando muchos especialistas sobreestiman la influencia de la psiquis sobre esta afección. Varios estudios relacionan la infertilidad femenina con conflictos tempranos de la relación

madre-hija, donde existen sentimientos hostiles hacia la idea de maternidad, dificultades de identificación con el rol materno y, por lo tanto, un rechazo inconsciente al embarazo (Pagotto, 2010).

Hay una serie de alteraciones en las que probablemente, los estados emocionales influyan negativamente sobre la infertilidad. Pero esto debe ser evaluado en particular, ya que las reacciones psiconeuroendocrinas ante las circunstancias de la vida son diferentes y varían de persona a persona. Esto se refiere a la influencia del estrés, del sufrimiento psíquico prolongado y de las experiencias emocionales inusuales e intensas, o a ciertos tipos de personalidades que tienden a reaccionar exageradamente ante el estrés común de la vida cotidiana (Pagotto, 2010). Existen numerosos estudios que han explorado diversos aspectos del estrés y el ajuste emocional en pacientes en tratamiento de infertilidad. Mientras que algunas variables psicosociales parecen estar asociadas consistentemente con la angustia en las pacientes de FIV, otras parecen no estar asociadas (Rockliff y col., 2014).

1.4 Datos demográficos de infertilidad

En la segunda década del nuevo milenio, la infertilidad sigue siendo una condición global altamente prevalente. Se calcula que afecta entre el 8 y 12% de las parejas en edad reproductiva en todo el mundo (Ombelet y col., 2008 a, b). Sin embargo, en algunas regiones del mundo, las tasas de infertilidad son mucho más altas, alcanzando el 30% (Nachtigall, 2006; Ombelet y col., 2008 a, b). Estas regiones de alta prevalencia, incluyen el sur de Asia, África sub-sahariana, Oriente Medio y el Norte de África, América Central, Europa del Este y Asia Central (Mascarenhas y col., 2012).

El más reciente estudio realizado con el apoyo de la OMS y la fundación de Melinda Gates, como parte del proyecto Global Burden of Disease Study 2010, involucró un examen global de las tendencias de infertilidad basándose en el análisis de 277 encuestas de salud reproductiva obtenidas en 190 países y territorios durante el periodo 1990-2010 (Mascarenhas y col., 2012). En lugar de utilizar las definiciones clínicas o epidemiológicas de infertilidad de la OMS (descriptas anteriormente), este estudio define infertilidad primaria como la “incapacidad de tener algún nacimiento vivo” e infertilidad secundaria como “incapacidad para tener un nacimiento vivo adicional”. Utilizó nacido vivo como criterio de valoración en un período de 5 años, teniendo en cuenta además el estado de la unión, la ausencia de uso de métodos anticonceptivos y el deseo de un niño.

Usando esta definición de infertilidad, el estudio estimó que **48,5 millones de parejas se vieron afectadas por infertilidad en 2010**, una cifra que es considerablemente más baja que en los informes anteriores. A pesar de las diferentes estimaciones de prevalencia global de la infertilidad -y de la completa ausencia de información sobre el número total de hombres infértiles, que contribuyen a más de la mitad de todos los casos de la incapacidad de concepción (World Health Organization, 2014)- las tasas de infertilidad no parecen haber aumentado significativamente en las últimas dos décadas (Mascarenhas y col., 2012). Esto es en parte porque las tasas globales de fecundidad se han reducido de manera significativa, debido a que menos personas están tratando de tener hijos (Mascarenhas y col., 2012).

2 Globalización de las Tecnologías de Reproducción Asistida (TRA, *Assisted Reproductive Technology*)

Durante la última década, ha habido un **aumento significativo en el número de clínicas donde realizan fecundación *in vitro***, y por lo tanto en el número de ciclos de TRA realizados en todo el mundo. Este proceso lo ha seguido y documentado la Federación Internacional de la Sociedad de Fertilidad (IFFS). Desde 1998 esta organización ha emprendido un proyecto de vigilancia internacional en un intento de evaluar el número de clínicas (si las hay) de cada país, los servicios de TRA ofrecidos, y la naturaleza del entorno legal y regulatorio de cada país (Jones y col., 2010; Ory y col., 2014). Las evaluaciones realizadas por la IFFS, que se repiten cada 3 años, han proporcionado información muy valiosa sobre el inexorable crecimiento global de las técnicas de FIV.

Para el año 2000, los servicios de fecundación *in vitro* sólo estaban disponibles en aproximadamente una cuarta parte de las naciones del mundo, en 45 de los 191 estados miembros de la OMS (24%). Estos eran en su mayoría países ricos del occidente (Collins, 2002). A mediados de la década (2005), ese número se expandió a casi un tercio de las naciones del mundo (31%) (Jones y col., 2007). Sin embargo, para el año 2010, cuando la encuesta de la IFFS se repitió por quinta vez, los resultados informados fueron altamente superadores. Según el equipo de investigación, "Ha habido una explosión en las clínicas de fertilización en países en vías de desarrollo" (International Federation of Fertility Societies, 2010). En el año 2015, se estimó que existen entre 4.000 y 4.500

clínicas encontrándose la mayoría en países como Japón, India, EE.UU., Italia, España, Corea, Alemania y China.

Asimismo, entre los 48 países que realizan la mayoría de los ciclos de TRA por millón de habitantes, nueve países de América Latina están en el cuartil inferior (Argentina, Uruguay, Brasil, Chile, Perú, México, Ecuador, República Dominicana y Guatemala) (Adamson, 2009). La **Figura 1** muestra el número de clínicas de fecundación *in vitro* por habitante del mundo. (Mascarenhas y col., 2012).

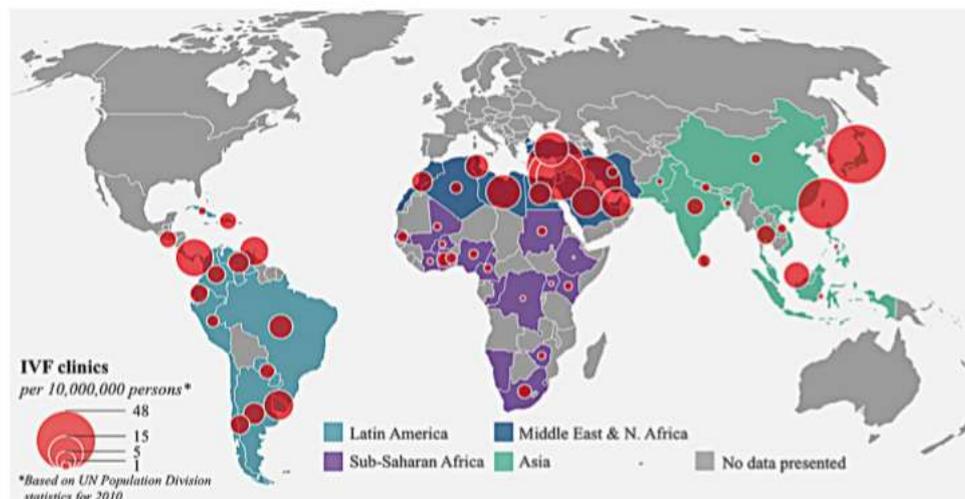


Figura 1. Distribución regional comparativa del número de clínicas de fecundación *in vitro* por habitante.

Al comienzo del nuevo milenio, la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología (European Society of Human Reproduction and Embryology, ESHRE) estimó que 1500 parejas por millón de habitantes requieren tratamientos de TRA anualmente (ESHRE Capri Workshop Group, 2001). Pero en realidad, en general se puede estimar que sólo alrededor de **una cuarta parte de las parejas infértiles (22%) obtienen asistencia** (Boivin y col., 2007).

2.1 Tecnologías de Reproducción Asistida

De todos los tratamientos disponibles para las parejas infértiles, las tecnologías de reproducción asistida ofrecen los más altos índices de éxito. Entre éstas la fertilización *in vitro* es la más aplicada. La FIV es el proceso por el cual los óvulos son fertilizados por el esperma fuera del cuerpo “*in vitro*”, y posteriormente son transferidos al útero materno.

Esta técnica también es aplicable a la reproducción de terceros, tales como la donación de óvulos y portadores gestacionales. La FIV implica **tratamientos costosos e invasivos** y pueden ser muy estresantes y exigentes para el paciente debido a las ecografías diarias y las inyecciones. Este tipo de intervenciones se recomiendan cuando tratamientos como la inseminación intrauterina no han tenido éxito, y cuando hay infertilidad por factor masculino o en casos de trastornos de trompas. La incertidumbre durante el tratamiento puede producir confusión emocional, diversos estudios han demostrado que las mujeres infértiles son más propensas a exhibir mayores niveles de angustia que las mujeres fértiles (Tracy y col., 2013).

Los tratamientos de fertilidad son complejos, y cada ciclo de reproducción asistida consiste de varios pasos (**Figura 2**). Si alguno de los éstos se aplica incorrectamente, las posibilidades de concepción son prácticamente nulas. La técnica consiste en procedimientos que implican la manipulación *in vitro* de ovocitos, espermatozoides y embriones, con el objetivo de establecer un embarazo (Zegers-Hochschild y col., 2009).



Figura 2. Esquema de los procedimientos involucrados en tratamientos de fertilización asistida.

Una vez que las parejas han realizado los análisis pertinentes para poder iniciar el tratamiento, los pasos que componen un ciclo de TRA son los siguientes:

1- Tratamientos con hormonas que estimulan el crecimiento de múltiples folículos ováricos. Simultáneamente se suministran otros medicamentos para suprimir el ciclo menstrual natural y disminuir la actividad de la glándula pituitaria.

2- Una vez iniciada la estimulación ovárica, se lleva a cabo la supervisión del crecimiento de los folículos. Cuando los folículos han alcanzado un tamaño adecuado, el siguiente paso consiste en provocar la maduración final (conocido como *ovulation triggering*).

3- Recolección de óvulos (generalmente realizada con una sonda de ultrasonido transvaginal para guiar el procedimiento) y, recuperación de espermatozoides.

4- Proceso de fertilización, por lo general se completa con la fertilización *in vitro* (**Figura 3**) o inyección intra-citoplasmática de espermatozoides (ICSI, **Figura 4**).

5- Los embriones se transfieren a un medio de cultivo apropiado (incubación asistida).

6- Transferencia de embriones al útero. Es de vital importancia en este paso: preparar el endometrio, establecer el mejor momento para la transferencia de embriones, determinar el número de embriones a transferir, seleccionar los embriones a transferir, el tipo de catéter a utilizar, el uso de guía ecográfica, necesidad de reposo, etc.

Una vez transferidos el/los embriones debe mantenerse la fase lútea, para lo cual se dispone de varias opciones que incluyen administración de progesterona, estrógenos (E2), y la gonadotropina coriónica humana (hCG).

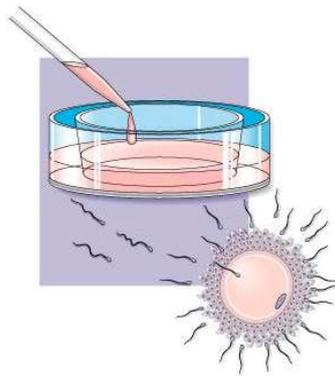


Figura 3. Procedimiento de fertilización *in vitro*.

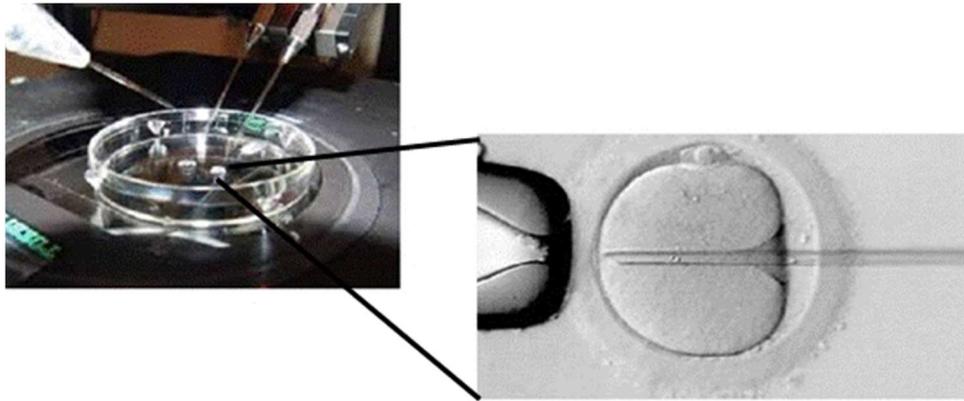


Figura 4. Procedimiento de inyección intra-citoplasmática de espermatozoides.

A pesar de su amplia aplicación y del continuo avance en la técnica de FIV, **la eficiencia de la tecnología es en general entre el 25 y 30%** (Andersen y col., 2008; Botros y col., 2008). Resulta un gran desafío entonces incrementar el potencial de implantación de los embriones, en otras palabras, **mejorar la probabilidad de un nacimiento vivo para una pareja infértil**. Muchas clínicas transfieren un mayor número de embriones, y de esta manera aumentan las posibilidades de lograr el embarazo. Sin embargo, esto ha llevado a una desventaja inadmisibles, ya que como resultado se produce un alto nivel de **embarazos múltiples** (Botros y col., 2008, Dawson y col., 1995). En EE.UU., se observó un incremento del 77% en el número de nacimiento de mellizos y del 45% en el número de nacimientos múltiples entre 1980 y 2001 (Martin y col., 2002). Los embarazos múltiples incrementan la posibilidad de sufrir diferentes afecciones médicas tales como nacimientos prematuros (antes de las 37 semanas, 1 de cada 8), muy bajo peso al nacer (menor a 2000 g, 1 de 4), parálisis cerebral (8 veces más probable en gemelos y 47 veces más probable en trillizos), mortalidad infantil en el primer año de vida (6 veces mayor probabilidad en gemelos y 17 en trillizos y embarazos de mayor número), hipertensión y hemorragia postparto inducida por el embarazo (Luke y col., 2004). Para superar este problema, muchos países restringen legalmente el número de embriones transferibles. Muchos centros han disminuido el número de embriones transferidos a **dos**, conocido como doble transferencia de embriones (DET), e incluso a **uno** que se llama transferencia electiva de un solo embrión (eSET), como ya se mencionó. En la práctica si bien los resultados de eSET son beneficiosos en relación a los riesgos de embarazos múltiples, estos procedimientos reducen significativamente la tasa de embarazo. El

desafío contemporáneo en las investigaciones en FIV es disminuir la prevalencia de gestaciones múltiples, manteniendo o mejorando las tasas generales de embarazo. Un enfoque es identificar métodos fiables que permitan seleccionar el embrión con el mayor potencial de desarrollo para la transferencia en el útero, lo que reduciría el número de embriones necesarios sin comprometer el éxito del embarazo.

2.1.1 Selección de embriones

Un paso clave en FIV es la **evaluación de la calidad de los embriones**, lo que ayuda a determinar cuál es el embrión con mayores posibilidades de implantación y el de mayor potencial de embarazo. Muchos métodos han sido propuestos para evaluar la calidad embrionaria. Tradicionalmente, la selección de embriones a ser transferidos se realiza de acuerdo a **criterios morfológicos y tasa de desarrollo** en cultivos por medio de evaluación microscópica (Nel-temmat and Nagy., 2011; Bolton y col., 1989). Numerosos sistemas han sido utilizados para valorar los embriones. Con la finalidad de unificar los criterios de evaluación y establecer los parámetros morfológicos que mejor definen la calidad embrionaria, en el año 2011 se realizó una reunión internacional para establecer un consenso sobre la evaluación morfológica de ovocitos y embriones (Balaban y col., 2011). El grupo de expertos elaboró un conjunto de normas consensuadas para definir los criterios mínimos para la evaluación de ovocitos y embrio-morfológicos. Este consenso tuvo como objetivo aunar la terminología y estandarizar las prácticas de laboratorio relacionadas a la evaluación de la morfología del embrión, para lograr una comparación más efectiva de los resultados de tratamientos entre laboratorios. Asimismo, se pretendía que el documento fuera de consenso mundial para permitir la notificación estandarizada de un conjunto mínimo de datos necesarios para la descripción precisa del desarrollo embrionario.

Entre los métodos de evaluación de la calidad de ovocitos y embriones, la evaluación por **microscopía óptica** es técnicamente la más práctica y sencilla. Si bien la evaluación morfológica es no invasiva y ha sido parte integral de las prácticas de FIV, su precisión es baja. Esto se debe a que por ejemplo dos embriones de 8 células que morfológicamente son iguales no necesariamente tienen el mismo potencial de implantación. Asimismo, los embriones que morfológicamente parecen buenos (células enteras, bien formadas, etc.) no garantizan un embarazo exitoso (Milki y col., 2000). Esto demuestra que hay numerosos factores que contribuyen a la calidad del embrión que no

son necesariamente reflejadas en su morfología. Estos hechos sugieren que la obtención de embriones con una buena morfología aparente no es suficiente para predecir un embarazo y se requieren indicadores que describan su viabilidad de manera más confiable.

A nivel internacional, en la última década han surgido una serie de **tecnologías alternativas no invasivas para estimar el potencial reproductivo de embriones** previo a su transferencia en tratamientos de FIV, muchas de las cuales son aún objeto de investigación.

2.2 Metabolismo del embrión en el período de pre-implantación

A lo largo de 30 años de investigaciones se ha podido demostrar que existe una relación entre ciertos parámetros metabólicos como por ejemplo el consumo de glucosa, y la viabilidad de los embriones. Diferentes experiencias han proporcionado pruebas claras de que la función metabólica embrionaria está vinculada a la viabilidad del embrión y es independiente de la información proporcionada por la morfología.

La regulación de la producción de energía es fundamental para que una célula se desarrolle y multiplique. El embrión en el período pre-implantacional experimenta numerosos cambios en su fisiología y en el perfil de su expresión génica, lo que implica un incremento de los procesos de división y biosíntesis acrecentando los requerimiento energéticos (Gardner y col., 2013).

Los cambios en el metabolismo del embrión comienzan en el estadio pronuclear, en el cual el ovocito relativamente inactivo está bajo el control genético de los genes derivados de la madre. El ovocito evoluciona a un grupo de celular metabólicamente y biosintéticamente activas que crece predominantemente bajo su propio control genético. La fertilización es un proceso complejo de interacción célula-célula que comienza con el reconocimiento y unión del espermatozoide y el óvulo. Después de su fusión, el esperma genera ondas de calcio que inicia la activación del ovocito. La célula derivada, el cigoto, comienza su división por mitosis generando células más pequeñas. Este proceso de división, conocido como clivaje, comienza 21 horas después. Subsecuentemente, las divisiones se dan cada 12-15 horas, mientras hay una activación gradual del genoma embrionario. Alrededor del tercer ciclo de división, el embrión sufre un proceso de compactación para formar la mórula. En la etapa de 32 células, ocurre un segundo cambio morfológico que da origen al blastocisto, esta transición se encuentra acompañada por

diferenciación celular donde las células de la superficie forman el trofoectodermo (trophectoderm - TE) y la masa celular interna (inner cell mass - IMC) da lugar al embrión (**Figura 5**). Posteriormente se produce el desprendimiento de la zona pelúcida y el embrión expone la cubierta externa del trofoectodermo sincitial lo que permitirá la implantación del blastocisto en el útero materno (Norwitz, 2001; Ferrer-Vaquer and Hadjantonakis, 2013).

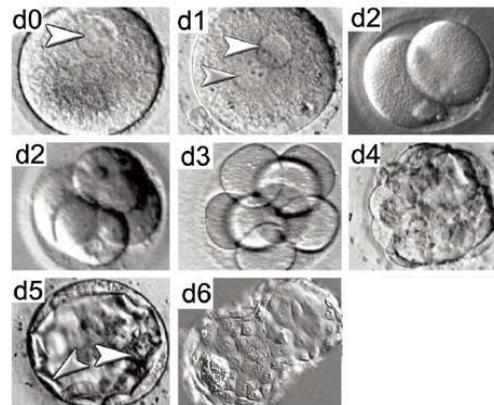


Figura 5. Etapas del crecimiento del embrión humano desde el día 0 al día 6 de desarrollo. d0 a d6: corresponden a la secuencia de día 1 a día 6. Tomado de (Niakan y col., 2012).

En el período que comprende desde la fertilización hasta la compactación del embrión, el metabolismo se basa en la oxidación de piruvato y lactato (Gardner y col., 2001; Moreno y col., 2006). El ovocito se encuentra rodeado por las células del cumulus que producen piruvato y lactato a partir de glucosa, lo que genera altas concentraciones de éstos ácidos alrededor del ovocito fertilizado. Por otro lado, los niveles de ATP:ADP son elevados, produciendo una inhibición alostérica de la fosfofructoquinasa (PFK), y así limitando el flujo de glucosa a través de la glucólisis (Gardner y col., 2013). Posteriormente, el embrión incrementa su consumo de oxígeno y su capacidad de utilizar glucosa como fuente de energía (Gardner y col., 2001; Moreno y col., 2006). El incremento en el consumo de oxígeno posiblemente refleja el requerimiento de energía para la formación y mantenimiento del blastocelo, y el aumento de la utilización de glucosa la demanda de precursores para la biosíntesis. En consecuencia, hay una reducción en la relación ATP:ADP, y un aumento de AMP, que tiene un efecto alostérico

positivo sobre la PFK, facilitando de este modo un mayor flujo de glucosa a través de la glucólisis (Gardner y col, 2013).

Antes de la compactación, el crecimiento se ve favorecido en presencia de aminoácidos no esenciales, mientras que posteriormente también requiere aminoácidos esenciales. Houghton y col. (2002) determinaron que la leucina es el aminoácido más requerido desde la fertilización hasta la formación del blastocisto, mientras que los aminoácidos arginina, metionina y asparagina cobran importancia luego de la compactación. Con posterioridad Brison y col. (2004) encontraron que la disminución de glicina y leucina y el aumento de los niveles de asparagina en el medio de cultivo de embriones están asociados a un aumento de la tasa de embarazo clínico y nacimiento. Sturmey y col. (2009) publicaron hallazgos similares en embriones crio-preservados. Los aminoácidos requeridos por el embrión tienen una gran variedad de funciones, se ha descrito que la glicina se usa como buffer de pH intracelular, la glutamina en la síntesis de moléculas esenciales, protector del estrés oxidativo y como fuentes de energía (Gardner y col., 2013; Nel-themaat y Nagy 2011).

En cuanto a las necesidades nutricionales de ácidos grasos, Haggarty y col. (2006) detectaron una mayor concentración de ácido oleico y linoléico en embriones de 4 células, mientras que en etapas posteriores hay un incremento de ácido araquidónico y docohexaneonico.

Lograr comprender el metabolismo del embrión durante su desarrollo temprano se ha convertido en el tema de interés de muchos grupos de investigación, debido a la necesidad no sólo de mejorar los medios de cultivo empleados en los procedimientos de reproducción asistida, sino también para buscar nuevas estrategias para la determinación de la viabilidad de los embriones antes de ser transferidos a la madre (Hardarson, 2012).

Se pueden adoptar dos diferentes enfoques para analizar la metabolómica embrionaria (**Figura 6**): i) análisis del **perfil metabólico dirigido**: estudia metabolitos específicos, por ejemplo el análisis del consumo de la producción de metabolitos particulares como glucosa, piruvato, lactato o, aminoácidos específicos. Este enfoque proporciona información específica sobre los metabolitos candidatos relacionados con la actividad de vías metabólicas específicas (Hollywood y col., 2006; Sakkas, 2014). ii) análisis del **perfil metabólico global** analiza el metaboloma como un todo. Proporciona un análisis del fenotipo no se identifican los metabolitos específicos. Dependiendo de las técnicas analíticas o tecnología empleadas se obtendrán resultados de analitos particulares o del metaboloma global (Botros y col., 2008).



Figura 6. Esquema del metaboloma embrionario y su análisis.

Independientemente de la técnica empleada tanto sea para la detección de analitos particulares o del fenotipo global se requiere del registro de un gran número de muestras con el objetivo de asegurar la reproducibilidad de las medidas. Las técnicas más frecuentemente empleadas en el estudio del metaboloma mediante perfiles dirigidos son las cromatográficas (CG, CL, HPLC), mientras que las técnicas empleadas para el estudio del metaboloma por perfiles globales son las espectroscópicas y espectrométricas de última generación (NIR, FTIR, MNR, etc.) (**Figura 7**).

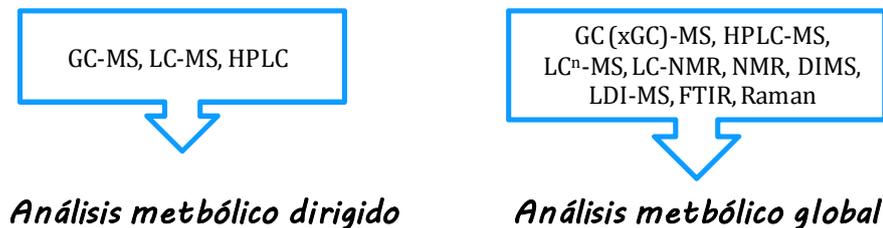


Figura 7. Tecnologías de última generación empleadas para el análisis del metaboloma de una suspensión celular o tejido sistema vivo.

3 Espectroscopía Infrarroja

3.1 Interacción de la radiación electromagnética con la materia

Cuando la materia es expuesta a la radiación electromagnética, ésta puede ser absorbida, transmitida, reflejada, dispersada, o bien puede producirse fotoluminiscencia. Este último término es utilizado para designar diferentes efectos como fluorescencia, fosforescencia y dispersión Raman (**Figura 8**).

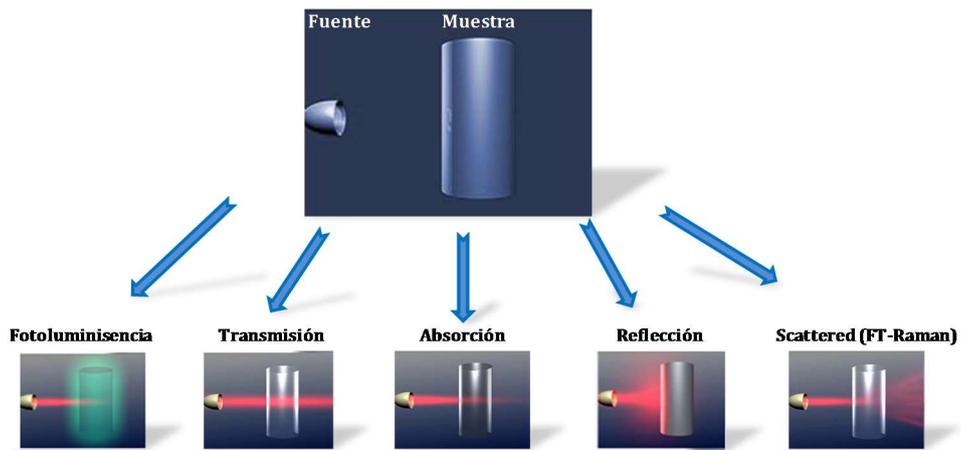


Figura 8. Interacción de la radiación electromagnética con la materia.

Cuando la luz incidente es **absorbida** surge lo que se conoce como espectroscopía de absorción, que puede ser ultravioleta (UV), visible (V), o espectroscopía de absorción infrarroja (IR), según la energía de la luz incidente (Figura 9).

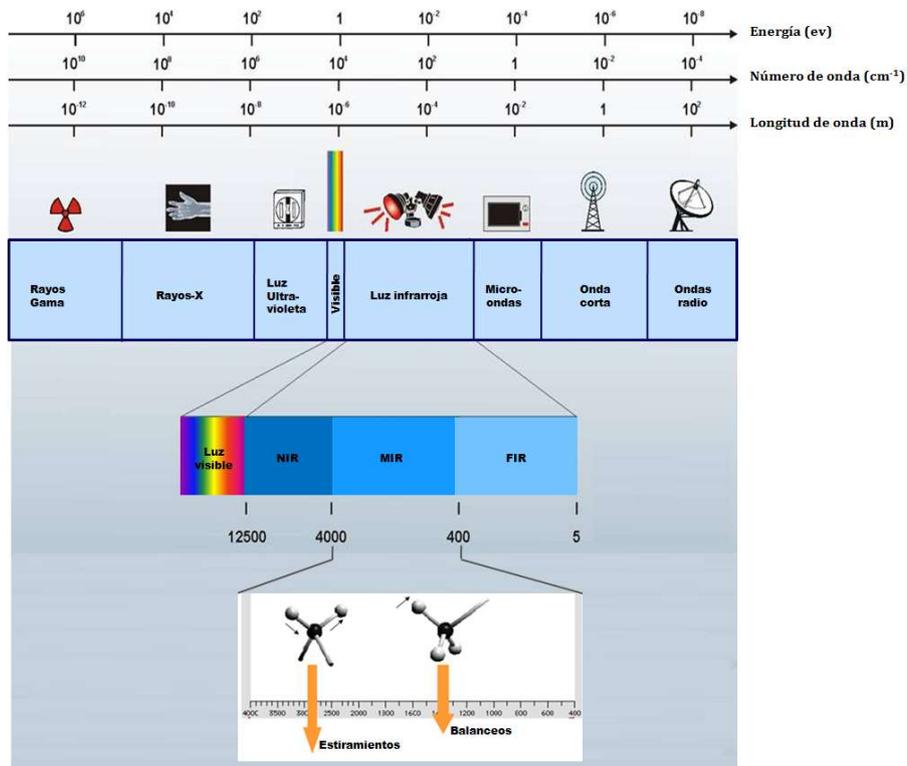


Figura 9. Espectro electromagnético. División de la región infrarroja Tomada de Charles B. Abranms. Perkin Elmer, Argentina (Abrams, 1993).

Tanto por razones instrumentales como por las características de la interacción de la radiación con la materia, la región IR se divide en 3 zonas: infrarrojo cercano (**NIR**, Near infrared) entre aproximadamente 13000-4000 cm^{-1} , la región del infrarrojo medio (**MIR**, Middle infrared) entre 4000 – 600 cm^{-1} y la zona del infrarrojo lejano (**FIR**, Far infrared) entre 600 y 5 cm^{-1} .

La región del infrarrojo lejano es especialmente útil en los estudios de compuestos inorgánicos ya que la absorción causada por las vibraciones de extensión y flexión de los enlaces entre átomos metálicos y ligandos inorgánicos u orgánicos, se produce por lo general a frecuencias menores de 600 cm^{-1} . Las moléculas que solo contienen átomos livianos, absorben en la región del infrarrojo lejano. Por su parte, MIR y NIR tienen aplicaciones similares permitiendo analizar los estados vibracionales fundamentales en muestras de origen biológico. Ambos proveen información sobre los estados vibracionales, estiramientos, balanceos y estados rotacionales de las moléculas. Debido a que el material biológico se estudia por lo general en suspensión, en fase líquida, o en polvos (liofilizados), el mismo se encuentra siempre en fase condensada, por lo que sólo los estados vibracionales serán los excitados por la radiación IR (Naumann, 2000). La principal desventaja de la espectroscopía NIR en contraste a la MIR es la información limitada que proveen los espectros NIR debido al registro de bandas anchas de las cuales es más difícil extraer información química o estructural. Los espectros NIR están representados por bandas muy anchas que se producen por la absorción de enlaces tales como O-H, C-H, y N-H, mientras que los espectros MIR contienen bandas de absorción producidas por casi todos los enlaces que presentan momento dipolar (C-H, C=O, C-O, O-H, N-H, C-N, etc.). Por otra parte, debido a muchos factores difíciles de manejar que afectan a los espectros NIR, como el contenido de humedad, cuando se construyen base de datos NIR extensivamente el análisis espectral requiere gran cuidado.

3.1.2 Origen de las bandas de absorción. Interpretación teórica

Las moléculas consisten en átomos, conectados por enlaces elásticos. Debido a la naturaleza elástica de estos enlaces entre los átomos ocurren movimientos periódicos. En una molécula, cada átomo puede moverse independientemente a lo largo de cada uno de los ejes de un sistema de coordenadas Cartesiano, de modo que cada átomo tendrá *tres grados de libertad* de movimiento (x, y, z). Si la molécula está constituida por N átomos, tendrá 3N grados de libertad de movimiento. Los grados de libertad traslacionales (3),

involucran el movimiento simultáneo en la misma dirección paralela a los ejes de un sistema Cartesiano y no involucra un cambio en las distancias relativas entre los átomos. Existen otros tres, que tampoco involucran un cambio en la distancia relativa de los átomos y constituyen los grados de libertad rotacionales. Los otros movimientos restantes ($3N-6$) constituyen los movimientos en los cuales se modifica la distancia relativa entre los átomos: la longitud del enlace químico y el ángulo entre ellos. Todas las vibraciones de una molécula ideal resultan de la superposición de $3N-6$ modos de vibración no interactivos entre sí para moléculas no lineales y $3N-5$ para moléculas lineales.

La interpretación más sencilla de una molécula vibrando consiste en considerarla como dos átomos unidos por un resorte. La fuerza necesaria para separarlos una distancia x de la posición de equilibrio es proporcional a la constante de fuerza del resorte, que constituye una medida de la fuerza del enlace, regida por la ley de Hook, a las masas m y su aceleración.

La mecánica clásica aproxima este modelo de movimiento de los átomos al de un simple oscilador armónico, donde los átomos son partículas de determinada masa que pueden vibrar con cualquier amplitud, es decir que el oscilador podría poseer un dado contenido energético. De este modo la vibración de una molécula biatómica puede ser descrita como dos masas m_1 y m_2 conectadas por un resorte de constante k . La frecuencia de vibración ν es proporcional a la constante del resorte e inversamente proporcional a las masas:

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{m}} \quad ; \quad m = m_1 \cdot m_2 / (m_1 + m_2)$$

Cuando el resorte es estirado y luego liberado vibrará con una energía (E) igual a:

$$E = \frac{1}{2} k x_{\max}^2$$

El modelo permite entonces a los átomos vibrar a cualquier energía total, lo cual no es cierto para las moléculas.

La mecánica cuántica predice la misma relación que la mecánica clásica, entre la frecuencia de vibración entre dos átomos, sus masas y su constante k , sin embargo, la mecánica cuántica predice que la molécula solo puede existir en determinados niveles energéticos (n). En el caso del potencial armónico, estos estados energéticos son equidistantes y cumplen con la siguiente ecuación:

$$E_n = (n + \frac{1}{2}) h \cdot \nu \quad n = 0, 1, 2, 3, \dots$$

En el modelo de un oscilador armónico cuántico las transiciones sólo pueden ocurrir desde un nivel energético dado hasta el inmediato superior o inferior ($\Delta n = \pm 1$). Sin embargo, un espectro es un poco más complejo que esta descripción. Una de las razones es que en realidad las moléculas no constituyen osciladores armónicos sino anarmónicos, ya que si se apartan lo suficiente el enlace se rompe. En el potencial anarmónico la distancia entre los niveles energéticos decrece a medida que aumenta la energía. Los niveles de energía están igualmente espaciados sólo en la región donde el potencial anarmónico se asemeja al potencial armónico (los primeros niveles). En este modelo, más real que los descriptos previamente, también se permiten transiciones vibracionales a dos niveles superiores de energía a los que se les llama sobretonos y poseen una energía cercana a $2h\nu$. La última limitación que completa el modelo es que la molécula debe tener un dipolo que debe cambiar cuando ocurre la transición.

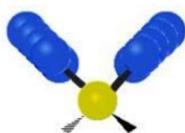
En resumen, las interacciones de la radiación con la materia pueden ser estudiadas en términos de cambios en los dipolos de las moléculas asociados a vibraciones y rotaciones. Las frecuencias de vibración dependerán de la constante de fuerza de los enlaces entre los átomos y las masas de los mismos. Las vibraciones pueden ser debidas a cambios en la longitud del enlace (estiramiento) o cambios en el ángulo de enlace (balanceo):

Cambios en la longitud del enlace:

Estiramiento

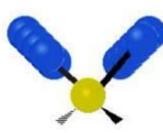
Simétrico

Se alargan y se contraen al mismo tiempo



Antisimétrico

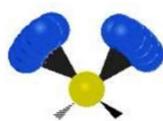
Se alargan y se contraen en tiempos diferentes



Balanceo

Deformación

Flexión simétrica en el plano



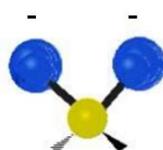
Rocking

Flexión antisimétrica en el plano



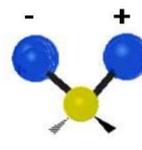
Wagging

Flexión simétrica fuera del plano



Twisting

Flexión antisimétrica fuera del plano



3.1.3 Observación de las vibraciones moleculares

De acuerdo a la mecánica cuántica las moléculas pueden tomar una cantidad determinada de energía ($h\nu_s$) para alcanzar el primer estado vibracional excitado. Una molécula irradiada con un espectro continuo de radiación IR puede absorber la luz de esta energía. El espectro de la radiación remanente mostrará una banda de absorción a $h\nu_s$. De modo que el espectro IR de una muestra se obtiene escaneando la intensidad de la radiación infrarroja antes y después del pasaje del rayo IR a través de la muestra. Esto se representa mediante un gráfico de $T= I/I_0$ en función del número de onda, donde **T** es la **transmitancia**, e **I** y **I₀** las intensidades del rayo después y antes de atravesar la muestra (**Figura 10**). En muchos casos la **absorbancia (A)** es usada en lugar de la transmitancia ($A=-\log T$), ya que para un número de onda dado, de acuerdo a la ley de Lambert Beer, resulta directamente proporcional a la concentración de la muestra. **El espectro IR de la mayoría de los materiales consiste entonces, en un gran número de picos o bandas de absorción. Estas bandas se originan por la interacción (intercambio energético) entre cuantos discretos de energía y movimientos mecánicos (modos vibracionales y rotacionales) de moléculas, los cuales son excitados por la absorción de radiación IR.**

La luz infrarroja es una luz de relativamente baja energía, de modo que al producirse una absorción IR en las moléculas los niveles cuánticos vibracionales o rotacionales se excitan a un nivel cuántico vibracional o rotacional mayor pero no a un nivel cuántico electrónico mayor. La **Figura 10** muestra este proceso (Tu, 1982).

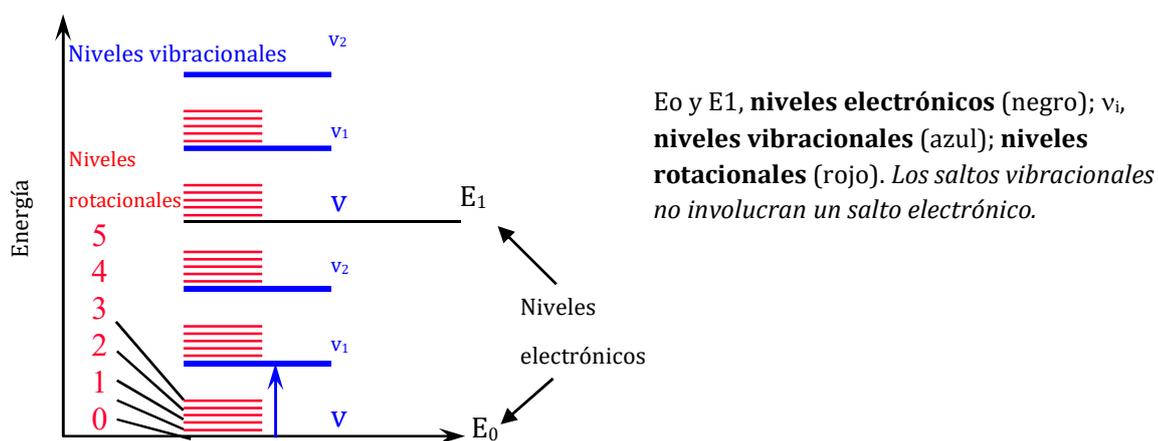


Figura 10. Niveles energéticos en una molécula.

Como se mencionó previamente, una molécula poli-atómica puede tener distintos modos vibracionales activos, de modo que es posible a través de radiación IR excitar dos o más vibraciones al mismo tiempo (Smith, 1999). Para una molécula poli- atómica

observaremos un total de $3N-6$ modos normales de vibración. Si tomamos como ejemplo al pentano (C_5H_{12}), deberíamos considerar para el análisis 45 modos de vibración normales lo cual, aunque ya ha sido realizado en trabajos químicos, resulta muy complicado. Sin embargo, podríamos simplificar este análisis asumiendo que **cada grupo funcional en la molécula puede ser tratado independientemente**.

En el ejemplo del n-pentano, podríamos asumir que estamos en la presencia de dos grupos funcionales: metilos (CH_3) y metilenos (CH_2) (**Figura 11**). Cada grupo funcional tiene un conjunto propio de frecuencias de vibración que corresponden a sus modos normales de vibración. Bajo esta consideración el espectro del pentano sería la suma de los picos debido a ambos grupos funcionales tomados independientemente sin considerar dónde se encuentre el grupo dentro de la molécula (**Figura 12**).

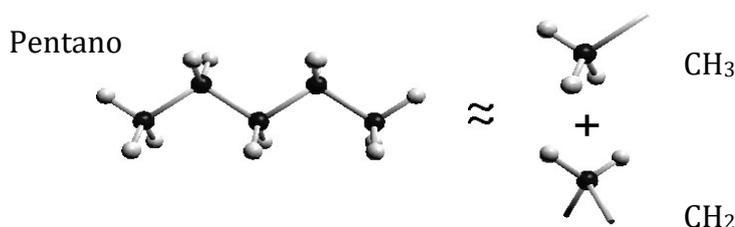


Figura 11. Esquema simplificado de la molécula del pentano que permite la interpretación de las bandas espectrales obtenidas. El modelo simplificado para el pentano asume que esta molécula puede ser tratada como constituida por dos grupos funcionales: metilo (CH_3) y metileno (CH_2). Cada grupo funcional en la molécula puede considerarse independientemente. Tomado de Abrams, 1993.

Los picos que se encuentran a número de onda mayor a 1400 cm^{-1} (**Figura 12 a y c**) corresponden a los estiramientos simétricos y antisimétricos y a los balanceos de los enlaces C-H correspondientes al $-CH_3$ y $>CH_2$. Las bandas a número de onda menor a 1400 cm^{-1} son parte de la denominada *región de huella dactilar (fingerprint)* (**Figura 12 b y c**). Las bandas observadas en esta región dependen de la estructura global de la molécula, más que a estiramientos o balanceos de un enlace químico. El dibujo (*pattern*) en esta región es ESPECÍFICO para cada molécula, por lo que permite la comparación con espectros de referencia para identificar o discriminar entre moléculas muy similares. La **Figura 12 c** muestra el espectro total IR de la molécula de pentano.

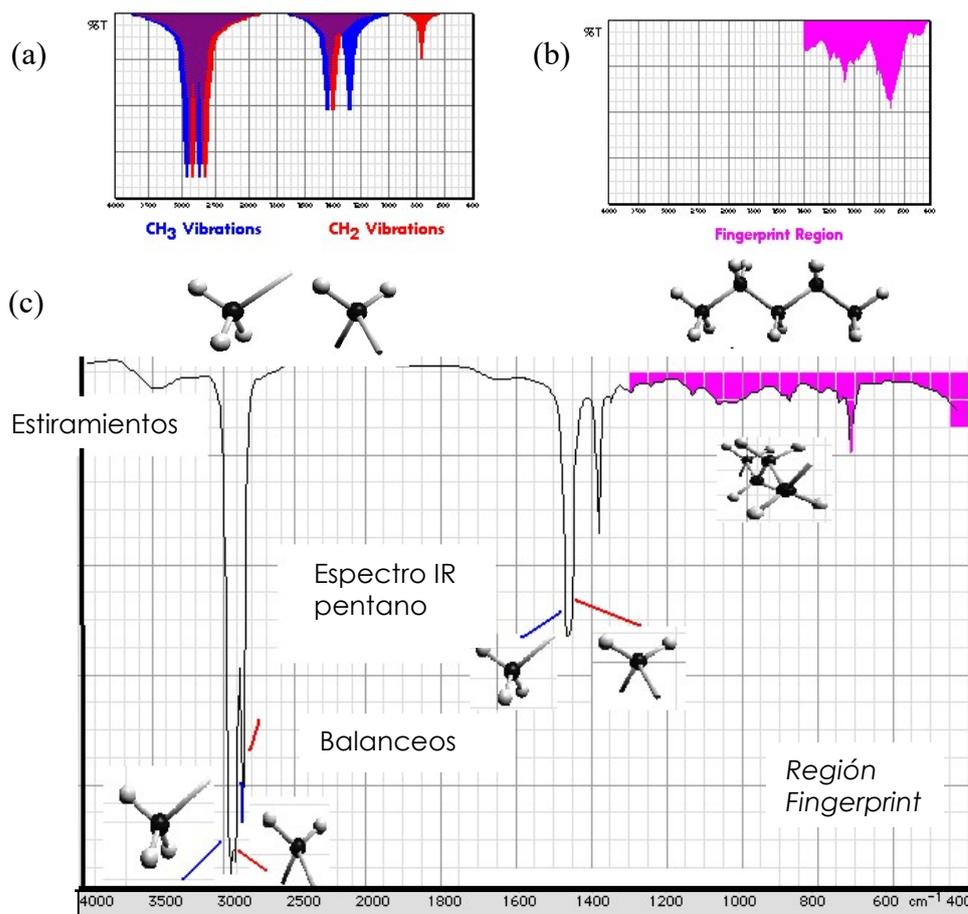


Figura 12. Interpretación del espectro IR de la molécula de pentano. Tomado de Charles B. Abrams, 1993.

3.1.4 Intensidad y ancho de banda

Hasta aquí hemos analizado el origen de algunas bandas de absorción IR encontradas en diferentes moléculas, sin tener en cuenta la intensidad o el ancho de las mismas. Existen dos causas principales que dan origen a la diferente **intensidad** de bandas. Una es la **concentración del componente en la muestra** y la otra es la **magnitud del cambio en el momento dipolar del grupo funcional** que dio origen a dicha banda en la muestra (Smith, 1999). La relación que tiene en cuenta ambas causas es la **ley de Lambert Beer**

$$A = \epsilon l c$$

donde **A** representa la absorbancia, la cual es medida por el alto o por el área de la banda, **l** constituye el paso óptico que por lo general tiene un valor del orden de los

micrones para muestras sólidas y líquidas. La concentración (c) puede ser medida en moles. l^{-1} , ppm, % (p/p), o cualquier otro tipo de unidad de concentración. Finalmente, la absorptividad molar (ϵ) es un parámetro proporcional al cambio en el momento dipolar y representa, para una muestra dada a un determinado número de onda, una constante invariante, como lo es el punto de fusión, de ebullición o el peso molecular (**Figura 13**).

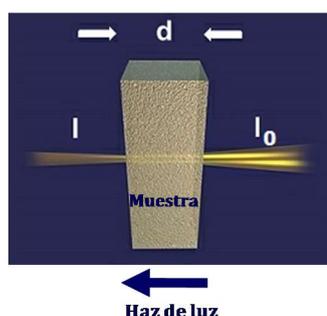


Figura 13. Camino óptico de la luz infrarroja a través de la muestra. I y I_0 las intensidades del rayo después y antes de atravesar la muestra. d : longitud de trayectoria

Además de la posición y la intensidad, otro importante parámetro a tener cuenta en la caracterización de una banda o pico es su ancho de banda. En el estudio de muestras condensadas (sólidas o líquidas), que serán las analizadas en este trabajo, los diferentes grupos funcionales en las moléculas dan origen a diferentes anchos de banda. El ancho de una banda en un espectro infrarrojo está determinado por el número de **entornos químicos** presentes en la molécula. Éstos están relacionados con **la fuerza de las interacciones intermoleculares**. Un ejemplo de un fuerte enlace intermolecular es el enlace o puente de H. Cuando un puente de H está presente, la banda de absorción correspondiente a los grupos funcionales involucrados es ancha. Este tipo de interacción afecta la estructura electrónica, y por lo tanto la constante de fuerza de los enlaces de una molécula. Esta constante de fuerza es la que determina a qué frecuencia se producirá la absorción de luz IR.

Una de las principales razones por la cual es posible observar un aumento en el ancho de bandas es el caso de que exista superposición de picos (Smith, 1999). Podría suceder que dos o más grupos funcionales provenientes de una o más moléculas tengan su banda de absorción a un número de onda similar o muy cercano, esto producirá un aumento en el ancho de banda debido a la superposición de picos. Esta superposición de bandas es observada en los espectros IR de material de origen biológico.

4 Tecnología de la espectroscopia Infrarroja

4.1 Espectrómetro Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR)

El fundamento principal que da origen a la espectroscopia contemporánea, se basa en la construcción de un **interferograma**. El mismo se origina por la interferencia de la radiación entre dos rayos y constituye una señal producida en función del cambio de paso óptico entre dos rayos, ocasionado por el desplazamiento de un espejo móvil. Los parámetros obtenidos son luego inter-convertidos por el algoritmo matemático de la *Transformada de Fourier* (Stuart y Ando, 1997).

En el espectrómetro FTIR la radiación IR emerge de una fuente de luz blanca que pasa a través del interferómetro y luego por la muestra para posteriormente alcanzar al detector. Una vez amplificada dicha señal, los datos son digitalizados por un convertor analógico-digital y luego transferido a una computadora para llevar a cabo la transformada de Fourier (**Figura 14**). El interferómetro más ampliamente utilizado es el llamado interferómetro de *Michaelson*.

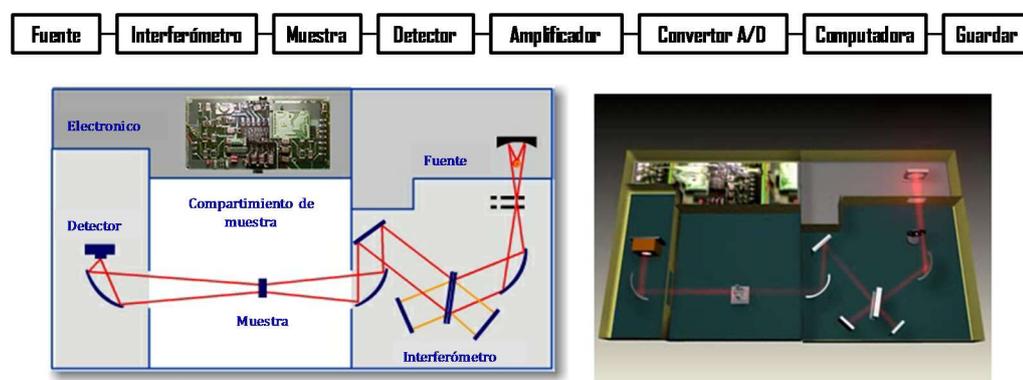


Figura 14. Esquema de las partes que componen a un espectrómetro FTIR. La luz IR emitida desde una fuente (SiC Globar) es direccionada hacia el interferómetro. Luego pasa a través del compartimiento de la muestra y es enfocada hacia el detector. La señal medida por el detector se denomina interferograma que luego es decodificado y transformado en un espectro FTIR. (Tomado de Bruker Optics)

El auxilio informático, en el caso de FTIR es indispensable. Sin entrar en un estudio exhaustivo sobre la conversión de un “*pattern*” de interferencia en un espectro, la transformada de Fourier consiste en un modo matemático de clasificar las frecuencias

individuales para lograr la representación final de un espectro (número de onda vs. absorbancia).

El rango operativo efectivo y real de un espectrómetro FTIR es función del tipo de material de la Fuente, del Beamsplitter y del Detector (**Tabla 1**).

Tabla 1. Partes que componen a un espectrómetro.

El tipo de fuente IR	Cerámico para IR Medio y Lejano –SiC- Tungsteno Halógeno para NIR y Visible
El material del Beamsplitter	KBr, CsI, CaF ₂ , etc.
El material de la ventana del Detector	KBr, CsI, CaF ₂ , etc.
Tipo de detector	DTGS/KBr, (baja velocidad, temperatura ambiente) MCT- High, A o B criogénico para alta velocidad
El material de la celda	que se elija para realizar las medidas, ZnSe, CaF ₂ , CsI

4.2 Tecnología de medición de espectros FTIR

Las tecnologías de medición de los espectros FTIR más empleadas son Transmisión o Absorbancia/Transmitancia (A/T), Reflectancia Total Atenuada (ATR), y Reflectancia Difusa (DRIFT) y microespectroscopía FTIR (**Figura 15**).

En la técnica de **Transmisión** o A/T la muestra se ubica en el camino óptico de la luz infraroja. En relación a **ATR**, la luz IR es direccionada a través de un cristal con alto índice de reflexión. La luz es totalmente reflejada internamente en la superficie del cristal, que se encuentra en contacto con la muestra. Sobre la reflexión en la interfaz cristal/muestra la luz IR penetra en un pequeño grado a la muestra. En la técnica de **Reflexión difusa** el espectro es el resultado de la combinación de reflexiones internas y externas. La luz que incide y penetra directamente en una o más partículas es reflejada en todas las direcciones, la óptica colecta luego la radiación dispersada y la dirige al detector. Las mediciones de **microespectroscopía FTIR** pueden ser clasificadas en dos categorías: “Point and shoot”, donde el análisis se aplica a muestras homogéneas, pequeñas, donde un solo espectro es necesario para la identificación de la muestra; “Análisis de múltiples puntos”, en ésta se exploran muestras heterogéneas, permite investigar la composición química espacial, obtener la imagen química de una muestra y conocer la distribución de algún componente en una muestra orgánica, inorgánica o biológica.

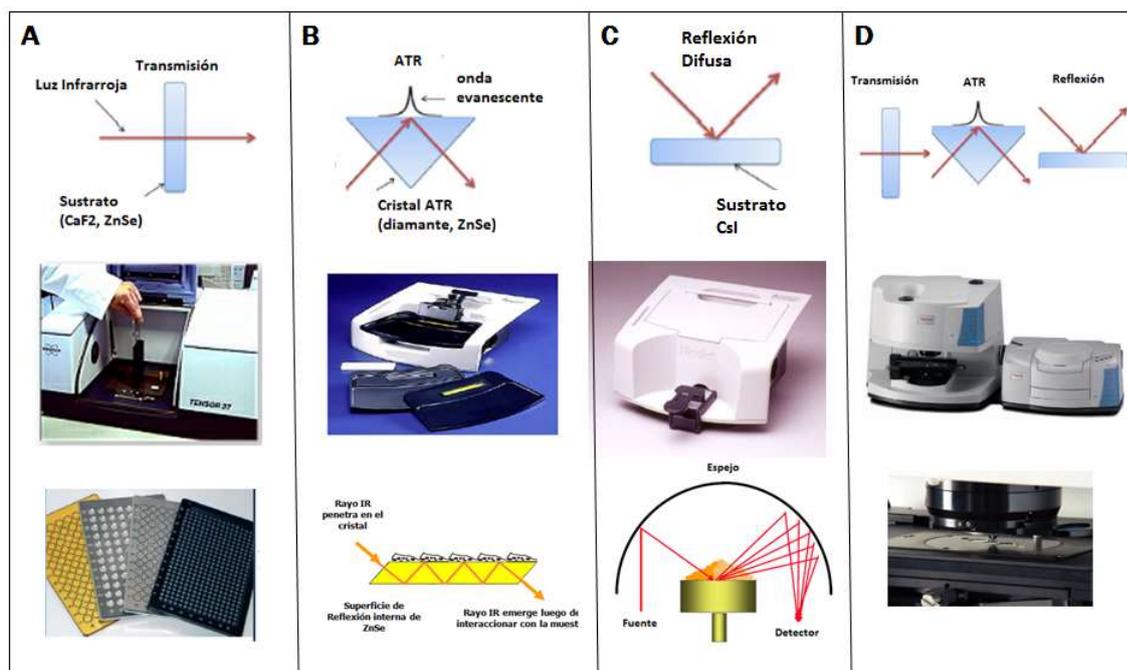


Figura 15. Técnicas de medición FTIR. A. Medidas por Absorbancia/Transmitancia, B. ATR, C. Reflexión difusa, D. Microespectroscopía FTIR.

Entre las tecnologías mencionadas, la técnica A/T poseen la ventaja que para una misma muestra los espectros obtenidos poseen las mayores relaciones señal/ruido. Esto, como se analizará más adelante, constituye una gran ventaja a la hora de realizar análisis espectrales. Las medidas por A/T pueden realizarse sobre muestras líquidas, soluciones y films dispuestos sobre ventanas o celdas transparentes a la radiación IR (Naumann y col., 1991; Bruker Optik, 2011). Existen diferentes técnicas para realizar medidas por A/T, entre ellas: i) muestras sólidas disueltas en solventes, ii) suspensiones mezcladas con polvo secas, iii) pastillas formuladas con polvos o líquidos, vi) films delgados entre o sobre soportes transparentes denominada **técnica del film seco**, siendo la última nombrada la utilizada durante este trabajo (**Figura 16**).

Debido a que el agua está presente en prácticamente la totalidad de las muestras biológicas los materiales ópticos que constituyen estas ventanas deben ser además de transparentes a la radiación IR, insolubles en agua. Los más comúnmente utilizados son CaF_2 , BaF_2 , ZnSe , ZnS , KRS-5, Ge o Si, entre ellos difieren en el índice de refracción, la zona del espectro IR donde son transparentes y la solubilidad en agua. Las celdas

construidas con ZnSe son insolubles y poseen un rango de transparencia a la luz IR entre 7000 y 650 cm^{-1} .



Figura 16. Técnica del film seco. A. Films preparados sobre celdas de CaF_2 . B. Films preparados en una celda de ZnSe con 15 pocillos. C. Films preparados sobre una celda multipocillo de Si con 96 pocillos para determinaciones automáticas.

4.3 Espectroscopía FTIR en materiales biológicos complejos

Es posible obtener espectros IR de cualquier tipo de materiales biológicos tales como: células procariotas y eucariotas, tejidos y fluidos biológicos. Cualquiera sea el sistema en estudio, para su interpretación debemos tener una idea sobre su tamaño, composición y estructura química. En modelos de interpretación más sencilla la mayoría de los sistemas biológicos están compuestos por agua, ácidos nucleicos, lípidos, proteínas y carbohidratos (Naumann, 2000).

Como se mencionó previamente, debido a que las muestras de los sistemas biológicos se encuentran en fase condensada (sólido, líquido o suspensiones), los modos rotacionales no son observados, solo los vibracionales son los que darán origen a las bandas de absorción en la región del infrarrojo medio (entre 700 y 4000 cm^{-1}). La **Figura 17** muestra espectros IR de diferentes materiales biológicos: células animales (cerebro de ratón), bacterias (*Staphylococcus aureus*) y fluido biológico (líquido sinovial). Tal como puede observarse en dicha figura los tres espectros si bien son diferentes, por estar constituidos por las mismas macromoléculas, poseen una forma similar. Del mismo modo que se analizó el espectro IR del pentano, podríamos hacer una primera aproximación a una interpretación de los espectros de la **Figura 17**. Las bandas de absorción observadas entre 4000 y 1400 cm^{-1} provienen principalmente de estados vibracionales fundamentales y pueden ser generalmente asignados a estiramientos y balanceos de grupos funcionales

en particular. A números de onda menores de 1400 cm^{-1} se pueden encontrar bandas debidas principalmente al balanceo de enlaces, bandas que no resultan de modos vibracionales localizados, sino más bien de acoplamiento de bandas vibracionales o de movimientos del “esqueleto” de las moléculas, los cuales son muy difíciles de interpretar o describir.

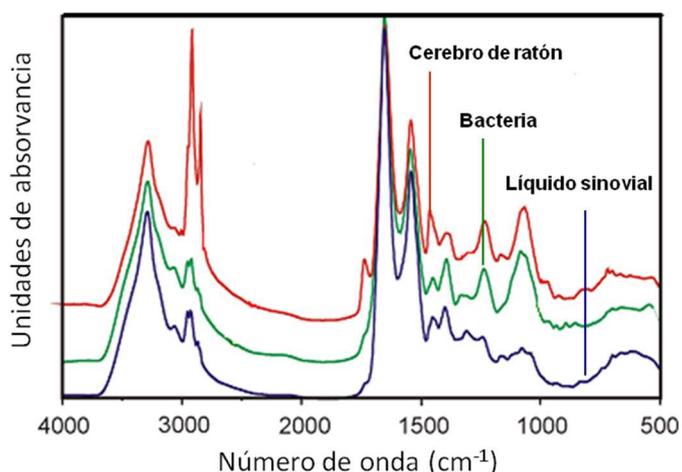


Figura 17. Espectros IR obtenidos de diferente material biológico: Muestra de tejido: células obtenidas de cerebro de ratón (rojo). Muestra microbiana: suspensión de *Staphylococcus aureus* (verde). Fluido biológico: líquido sinovial aspirado de un paciente con artritis reumatoidea (violeta). Todos los espectros fueron medidos en forma de film seco sobre una celda de ZnSe. (Tomado de Naumann, 2001).

A fin de simplificar la interpretación de los espectros de materiales biológicos, diversos grupos de trabajo han realizado estudios que permiten llevar a cabo la asignación de bandas a diferentes grupos funcionales. Los primeros estudios para realizar una correlación espectro-estructura se hicieron comparando los espectros producidos por las macromoléculas que constituyen los componentes principales de todo material biológico: lípidos, ADN, proteínas y carbohidratos (Li-Vien y col., 1991). En una primera aproximación, se superpusieron espectros de cuatro macromoléculas purificadas (fosfatidilcolina, ADN, hemoglobina y glucógenos), tomándolas como representantes de dichos constituyentes. Así, se le pudo asignar a cada banda ancha de un espectro IR, su correspondiente componente macromolecular presente en los materiales biológicos (**Figura 18**). Estos fueron los primeros estudios que indicaron que el espectro FTIR, en particular de una bacteria, representaba un fenotipo que contenía información sobre las

biomoléculas de la pared celular, membranas plasmáticas, citoplasma, polímeros intracelulares. Así se pudo establecer que un espectro constituye una representación del fenotipo, que resulta altamente específico y reproducible bajo las mismas condiciones de operación.

Posteriormente se vio que la asignación de picos o frecuencias de absorción a una determinada estructura o grupo funcional, se trataba ciertamente de una tarea muy compleja debido a que el ancho de las bandas hacía dicha asignación muy difícil y ambigua. Sin embargo, se aplicaron sobre los espectros técnicas de aumento de resolución como son la derivada segunda o la deconvolución (se discutirán más adelante) que permitieron distinguir mejor los picos que componen las bandas anchas de los espectros de materiales biológicos complejos. Aplicando estas técnicas es posible diferenciar de un espectro con aproximadamente 10-15 bandas anchas un total de 50-70 componentes. La utilización de la derivada segunda ha permitido llevar a cabo no sólo la asignación de bandas a grupos funcionales, sino también saber la composición química de los materiales en estudio, en muchos casos conocer los estados conformacionales de algunas macromoléculas y diversos tipos de interacciones y materiales intra e intermoleculares presentes en los mismos (Naumann, 2000).

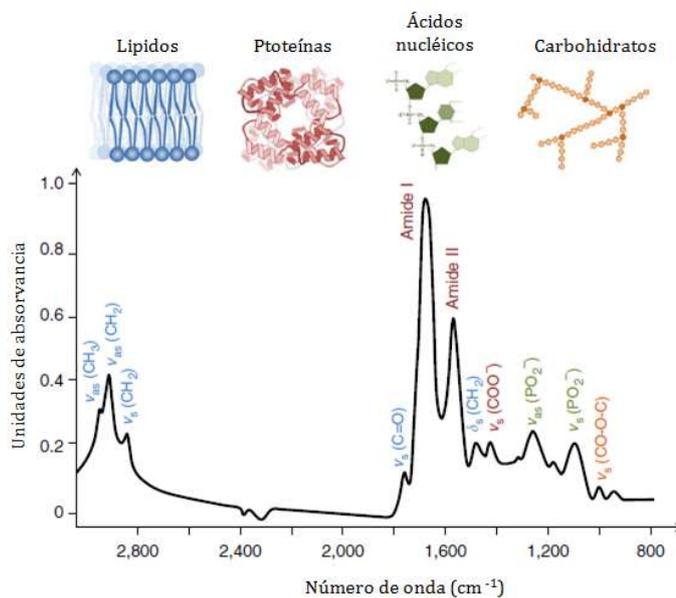


Figura 18. Espectro FTIR de un sistema biológico típico que muestra las asignaciones de los picos a biomoléculas de 3000-800 cm^{-1} , donde ν =vibraciones de estiramiento, δ =vibraciones de balanceos, s =vibraciones simétricas y as =vibraciones asimétricas. (Baker et al., 2014).

Para facilitar la interpretación de los espectros de materiales biológicos se puede hacer una división de los mismos en lo que se denominan ventanas espectrales (W_i): La **Figura 19** muestra un espectro FTIR de una suspensión de bacterias deshidratada en forma de film transparente sobre una celda de ZnSe. En la figura se indican dichas ventanas espectrales con las correspondientes asignaciones a macromoléculas y grupos funcionales más importantes.

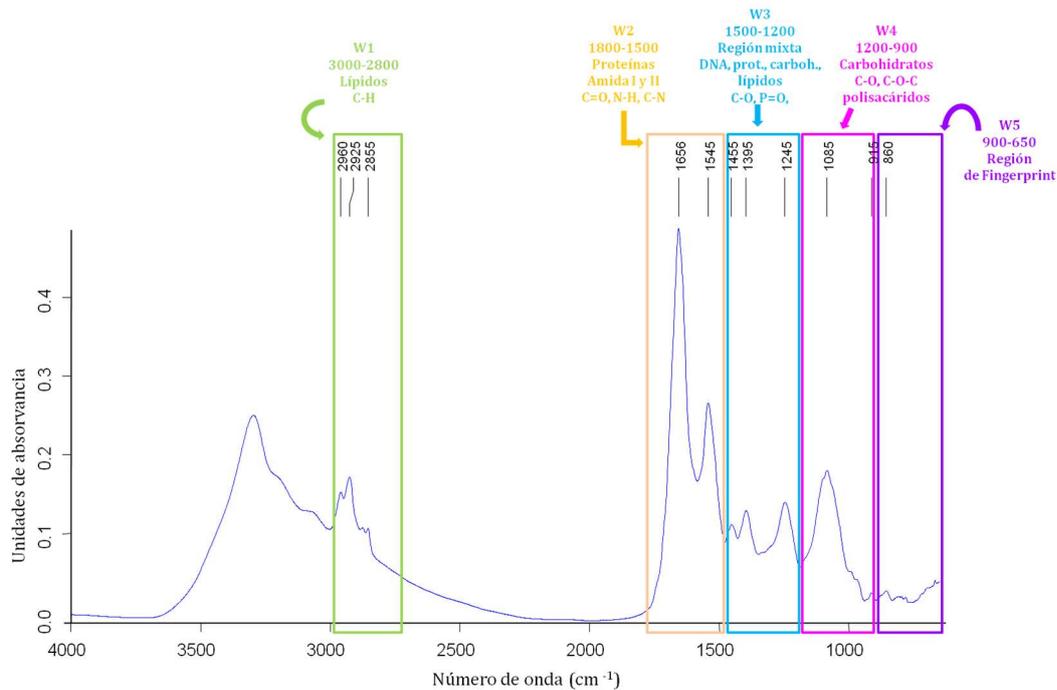


Figura 19. Espectro FTIR de suspensión bacteriana deshidratada. Asignación de los principales grupos funcionales y macromoléculas encontrados. Se tomó como ejemplo un espectro de una suspensión de bacterias gram negativas (*Burkholderia contaminans*) sobre una celda de ZnSe. Se indican las cinco ventanas espectrales (W_1 a W_5) en las que es posible dividir un espectro IR para su análisis.

La región entre 4000 y 3100 cm^{-1} , está dominada principalmente por una banda muy ancha debida al grupo O-H (3400 cm^{-1}) y a la absorción de dos modos vibracionales del estiramiento de N-H, denominados Amida A y B, 3300 y 3030 cm^{-1} , respectivamente.

1- La región 3100 a 2800 cm^{-1} , W_1 , exhibe las vibraciones correspondientes a los estiramientos y balanceos de C-H en los grupos funcionales CH_3 y CH_2 . Aunque dicha región es atribuida por lo general a la absorción de las cadenas de ácidos grasos de membranas y a fosfolípidos, también se le puede atribuir a vibraciones de algunas cadenas

laterales de aminoácidos y carbohidratos (Maquelin, 2003; Naumann, 2001). Es posible extraer alguna información complementaria de estos grupos funcionales observando las vibraciones correspondientes al balanceo del enlace C-H que se encuentra entre 1470 y 1350 cm^{-1}

2- La región **W₂**, entre 1800 y 1500 cm^{-1} , es la región denominada Amida I y II. En particular la región **Amida I** (1700-1600 cm^{-1}) es la banda más intensa en los espectros de microorganismos y es sensible a estados conformacionales. Dicha banda es indicativa de la estructura secundaria del *pool* de proteínas, es decir de la composición porcentual en estructura alfa hélice o hoja beta del total de las proteínas. En esta ventana se observa la banda correspondiente al estiramiento del grupo $>\text{C}=\text{O}$ de ésteres ($\sim 1740 \text{ cm}^{-1}$) presente en lípidos y otras moléculas, también, aunque de mucha menor intensidad, las bandas debidas los estiramientos de los enlaces $>\text{C}=\text{O}$, $>\text{C}=\text{N}$, $>\text{C}=\text{C}<$ presentes en las bases heterocíclicas de los ácidos nucleicos, ADN y ARN (Li-Vien y col., 1991). Es asimismo, muy característica la presencia en esta región de las vibraciones correspondientes a las cadenas laterales de los aminoácidos fenilalanina (1498 cm^{-1}) y tirosina (1516 cm^{-1}), así como también las del aspartato y del glutamato (1585 y 1570 cm^{-1} , respectivamente).

3- La región correspondiente a la **W₃**, entre 1300 y 1500 cm^{-1} es la que se denomina región mixta, ya que involucra grupos funcionales presentes en lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos. En la región de mayor energía de esta ventana, cercana a 1450-1460 cm^{-1} se encuentran, como se mencionó previamente, los estados vibracionales de balanceo del C-H correspondientes al CH_2 y CH_3 . En 1400 cm^{-1} es posible observar una banda típica correspondiente al estiramiento simétrico del $-\text{COO}^-$. Este grupo funcional puede ser indicativo de la presencia de carbohidratos ácidos, así como también a ácidos grasos libres, o cadenas laterales de aminoácidos. Por último, en la zona de menor energía de esta ventana, cercana a 1240 cm^{-1} , se encuentra una banda ancha debido al estiramiento asimétrico del enlace $>\text{P}=\text{O}$, que constituye una superposición de bandas típicas que podrían provenir de fosfodiésteres, monoésteres, y fosfatos libres. Dependiendo del material biológico considerado, aplicando técnicas de aumento de resolución en esta región pueden discriminarse entre dos y cuatro bandas débiles: 1) las provenientes del grupo funcional fosfodiéster del AND y ARN -presente en prácticamente todos los espectros de células-, 2) las frecuencias de estiramientos $>\text{P}=\text{O}$ debidas a la presencia de estos grupos en fosfolípidos, 3) las debidas a carbohidratos que contienen P, 4) en bacterias Gram-positivas las debidas a ácidos teicoicos y lipoteicoicos.

4- La región espectral **W₄**, entre 1200 y 900 cm^{-1} , es generalmente dominada por el estiramiento simétrico del grupo PO_2^- correspondiente a ácidos nucleicos (1080 cm^{-1}) y por una secuencia compleja de picos debidos principalmente a un fuerte acoplamiento de los estiramientos C-C y C-O y de las deformaciones C-O-C y C-O-H de diversos oligo y polisacáridos (Naumann, 2001).

5- El intervalo de frecuencias entre 900 y 650 cm^{-1} , **W₅**, región de *fingerprint*, exhibe una gran variedad de picos de muy baja intensidad, pero extremadamente característicos. Esta región puede contener también bandas muy débiles de vibraciones de anillos aromáticos de fenilalanina, tirosina, triptofano y de varios nucleótidos. En esta región resulta muy poco probable poder efectuar una asignación de determinados grupos funcionales a frecuencias de vibración, aquí se encuentran las bandas correspondientes a movimientos de las macromoléculas. Solo se puede asignar con certeza el pico correspondiente a 720 cm^{-1} por tratarse de una frecuencia de vibración característica de los modos vibracionales de torsión del $>\text{CH}_2$ de ácidos grasos.

La mayoría de los **estudios de composición química** realizados por métodos vibracionales de muestras “multicomponentes” como son las provenientes de material biológico complejo, se basan en asignarle a los picos observados (u obtenidos por derivada segunda) los grupos funcionales correspondientes. Este tipo de estudio tiene en cuenta la información disponible en bibliografía. Sin embargo, es posible realizar otro tipo de estudios, no de composición química, sino **estudios de tipo estructural**. A través de la espectroscopía FTIR es posible analizar la estructura secundaria o terciaria de macromoléculas (proteínas, carbohidratos), a través de las características de ciertas bandas espectrales. Estas bandas específicas tienen la propiedad de ser sensibles a cambios estructurales, a diferentes interacciones intra e intermoleculares, incluyendo el puente de H, interacción lípido-lípido y diferentes estados conformacionales tales como los de la estructura secundaria de proteínas dentro de la banda Amida I o estado de orden en las membranas (Naumann, 2001; Fabian, 2002).

4.3.1 Procedimientos para el análisis de muestras biológicas

La principal ventaja de la espectroscopia IR es que es aplicable a prácticamente a cualquier tipo de material biológico y en cualquier estado físico (soluciones, líquidos viscosos, suspensiones, sólidos no homogéneos, polvos, etc.). También es posible medir espectros IR de una muestra sometida a diferentes condiciones fisicoquímicas como

variaciones de temperatura, presión, estado de dispersión y pH. Otra característica destacable de la espectroscopía IR es que permite realizar mediciones sobre muestras intactas, hidratadas o deshidratadas. Se suman a estas ventajas la posibilidad de realizar estudios de caracterización, clasificación e identificación de organismos a muy bajo costo (debido a que la técnica no requiere reactivos) y en muy breve lapso de tiempo, debido a que la preparación es rápida y sencilla de llevar a cabo.

En general las muestras biológicas no se comportan idealmente como los compuestos puros. Los principales aspectos que deben tenerse en cuenta cuando se estudian muestras biológicas son:

- 1) Las bandas espectrales obtenidas no deben ser ni muy débiles ni muy intensas para evitar falta de linealidad en el detector.
- 2) Las muestras deben tener una concentración tal que se cumpla la ley de Lambert Beer.
- 3) En caso de que dos o más espectros estén siendo comparados, sus absorbancias IR no deben ser muy diferentes
- 4) La relación señal/ruido debe ser suficientemente alta.
- 5) Las muestras una vez preparadas y secas deben tener un aspecto de film transparente y homogéneo (se detallará más adelante la forma de obtener un film de estas características). La heterogeneidad (irregularidades, formación de grumos) de las mismas produce una dispersión difusa (*scattering*) en la superficie de la muestra que provoca desplazamientos de la línea de base.

4.3.1.1 Muestreo y Adquisición de datos

El empleo de espectroscopia vibracional para la identificación y caracterización de muestras biológicas requiere de procedimientos de estandarización muy rigurosas en la preparación de las muestras, así como también un estricto control en los parámetros de adquisición de los espectros. La espectroscopia FTIR es una técnica sumamente sensible a cambios en la composición química de la muestra, por lo que aún pequeñas modificaciones en la constitución de las muestras se traduce en importantes efectos en el espectro resultante. Cumplimentar todos los requisitos de estandarización permite obtener reproducibilidad y robustez en los resultados. (Helm y col., 1991; Naumann, 2000; Oust y col., 2004; van der Mei y col., 1993). Los estudios químicos, estructurales, de

identificación y discriminación de muestras de origen biológico *sólo son absolutamente confiable* si la preparación y condiciones de medida se realizan bajo condiciones rigurosamente controladas a lo largo de todo el proceso desde la toma de muestra hasta la adquisición de los espectros. En este sentido, el procedimiento empleado en la toma de muestra (modo y momento de la de toma de muestra), el tratamiento de dicha muestra (disposición y forma de secado), la técnica de medida y los parámetros de adquisición de los espectros son algunos de los puntos más críticos a tener en cuenta (Bruker Optik, 2011; Maquelin y col., 2003; Naumann, 2000).

A pesar de no existir un procedimiento único para responder a todos los requerimientos de estandarización, la necesidad de compartir, intercambiar resultados entre diferentes laboratorios y construir bases de datos de referencia ha hecho que se publicaran protocolos de estandarización en muchas áreas de estudio tales como la identificación de microorganismos, el análisis de células eucariotas, de fluidos biológicos, etc. En estos casos, la tendencia general es tratar de seguir las pautas de dicha metodología de manera de poder compartir los espectros entre laboratorios o construir base de datos validadas que puedan ser compartidas por los diferentes laboratorios.

4.3.2 Tratamiento de los datos y técnicas de evaluación

Los espectros IR proporcionan una gran cantidad de información sobre las propiedades físicas y químicas de las moléculas o las muestras estudiadas. Sin embargo, no siempre resulta sencillo extraer y analizar dicha información. La **quemometría** es la aplicación de métodos estadísticos y/o matemáticos a los espectros para poder obtener de manera eficiente la información contenida en los mismos.

Desde hace más de 50 años que se realizan análisis cualitativos y cuantitativos sobre espectros IR. No obstante, dichos análisis han consistido en emplear CALIBRACIONES UNIVARIADAS. Estos procedimientos, que aún son utilizados en química orgánica e inorgánica, consisten en asignar a una variable una característica espectral (ej. altura/área de un pico determinado a una concentración de glucosa). Con el empleo de los métodos univariantes resulta difícil para los espectroscopistas obtener resultados en muestras complejas, donde la variable que se desea estudiar está representada por más de una señal, o presenta bandas anchas y/o superpuestas con otras, y más aún cuando se desean analizar varias variables simultáneamente. Recién a fines de los años '80, con el desarrollo de los primeros espectrómetros con transformada de

Fourier, que permitieron obtener espectros con alta relación señal:ruido, y con mayor sensibilidad, el análisis quemométrico MULTIVARIANTE comienza a ser factible. Estos métodos permiten analizar simultáneamente varias características espectrales para describir una o varias variables simultáneamente, **o asignar una propiedad a un “pattern” espectral** lo que los hace de gran utilidad para realizar estudios de caracterización, identificación y cuantificación de muestras biológicas.

4.3.2.1 Análisis multivariantes

Los métodos multivariantes emplean más de una señal espectral o un conjunto de señales, para caracterizar una o más variables. Se utilizan cuando la banda de absorción de un componente presenta superposición con otras bandas o cuando se desea cuantificar múltiples propiedades o variables simultáneamente. Los métodos multivariantes también pueden ser aplicados cuando no se puede determinar puntualmente una o más señales espectrales que representen una variable, sino que ésta está representada por un conjunto de señales, que se conoce como el *pattern*, el patrón, la forma, el aspecto, el dibujo, de los espectros en una región, en varias regiones, o más aún, en todo el rango espectral. De modo que para llevar a cabo una cuantificación, caracterización o identificación basada en un análisis multivariante, muchas veces no es necesario identificar bandas, intensidades, o frecuencias de las propiedades que se desean estudiar (Bruker Optik, 2011; Salvador Figueras 2000; Naumann, 2000). Estos métodos asumen que es posible observar modificaciones sistemáticas en el *pattern* de los espectros, que son consecuencia de las variaciones de las variables que se desean estudiar. Los análisis basados en el reconocimiento de *patterns* se llevan a cabo sobre los espectros o sus derivadas normalizadas, consideradas como verdaderas huellas dactilares o *fingerprint* de las muestras a analizar.

Debido a su complejidad espectral, las muestras biológicas requieren de métodos matemáticos y estadísticos complejos para su caracterización, diferenciación, clasificación y/o cuantificación. El hecho que la espectroscopía FTIR está siendo utilizada actualmente en estudios analíticos de rutina, en análisis microbiológico y en medicina, hace que se le exija a los métodos de estudio confiabilidad, reproducibilidad y robustez. Esto sumado al hecho que para llegar a un resultado de estas características es necesario analizar simultáneamente cientos de espectros, hace que el uso de técnicas multivariantes

sea cada vez más necesario (Naumann, 2001; Schmitt y Udelhoven, 2001). Los métodos multivariantes pueden ser aplicados para diferentes propósitos:

1- Calibración: Desarrollar un modelo para predecir una propiedad de interés basada en otras determinaciones: determinación de la concentración de uno o más componentes en muestras biológicas por análisis componente principal (ACP) o Mínimos Cuadrados Parciales (Partial Least Squares - PLS).

2- Clasificación: Encontrar una distribución de los datos. Se aplica particularmente en clasificación e identificación de microorganismos, pudiendo diferenciar en muchos casos hasta nivel de cepa.

3- Predicción: Predecir, a través de la aplicación de ACP y PLS propiedades físicas o químicas del material biológico.

Actualmente existe una gran cantidad de técnicas multivariantes, que involucran una amplia gama de metodologías para el pre-tratamiento, evaluación y representación de los datos. Estas técnicas permiten el análisis directo y la interpretación de la estructura e interrelación de una nube de datos. Los métodos multivariantes pueden clasificarse teniendo en cuenta el fundamento de su aplicación en aquellos basados en **la estadística** y los que se fundamentan en **la inteligencia artificial** (Naumann, 2001; Schmitt y Udelhoven, 2001) (**Figura 20**).

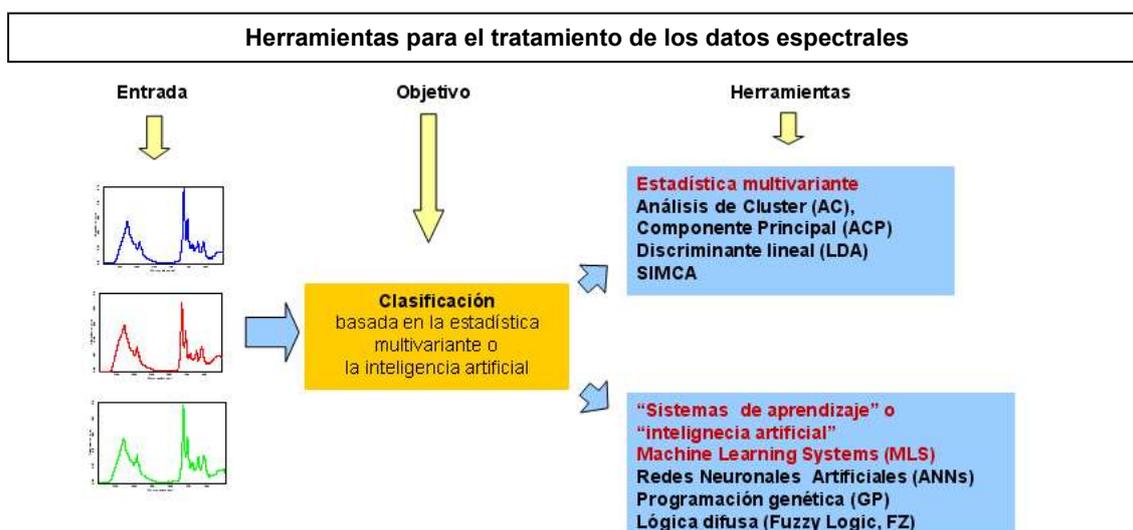


Figura 20. Herramientas para el tratamiento de los datos espectrales.

Las áreas de **estadística multivariante** e **inteligencia artificial** a pesar de superponerse en cierto modo, ya que los dos campos se fundamentan en el análisis de

patterns y estudian un importante número de datos, se diferencian en que la inteligencia artificial se basa en la implementación de algoritmos computacionales más complejos. Los métodos conocidos como “sistemas de aprendizaje” (Machine Learning Systems, MLS) consisten en el desarrollo de técnicas que permiten a las computadoras “aprender”. Más específicamente, son métodos que *crean programas computacionales basados en el análisis del set de datos*. En los últimos años han tenido una amplia gama de aplicaciones en distintos campos como biología, medicina, bioquímica (Ellis y col. 2002; Ellis y col. 2004; Goodacre y col. 2000; Lim y col., 2011; Lux y col., 2013; Panagou y col., 2011; Rabiner, 1989). Los tres métodos mencionados en el esquema de la **Figura 20** basados en el “aprendizaje”, se diferencian entre sí en la manera de “aprender” y la manera de expresar los resultados.

Las técnicas quemométricas utilizadas en espectroscopía, también pueden ser clasificadas sobre la base del conocimiento previo que se requiere sobre las muestras a analizar. De acuerdo a este esquema de clasificación las técnicas multivariantes pueden ser **no supervisadas**, o también denominadas **técnicas de clasificación objetivas**, que analizan los grupos naturales que existen en el conjunto de datos y las técnicas **supervisadas** que requieren un conocimiento previo sobre la identidad de las muestras (Mariey y col., 2001; Naumann, 2000) (**Figura 21**).

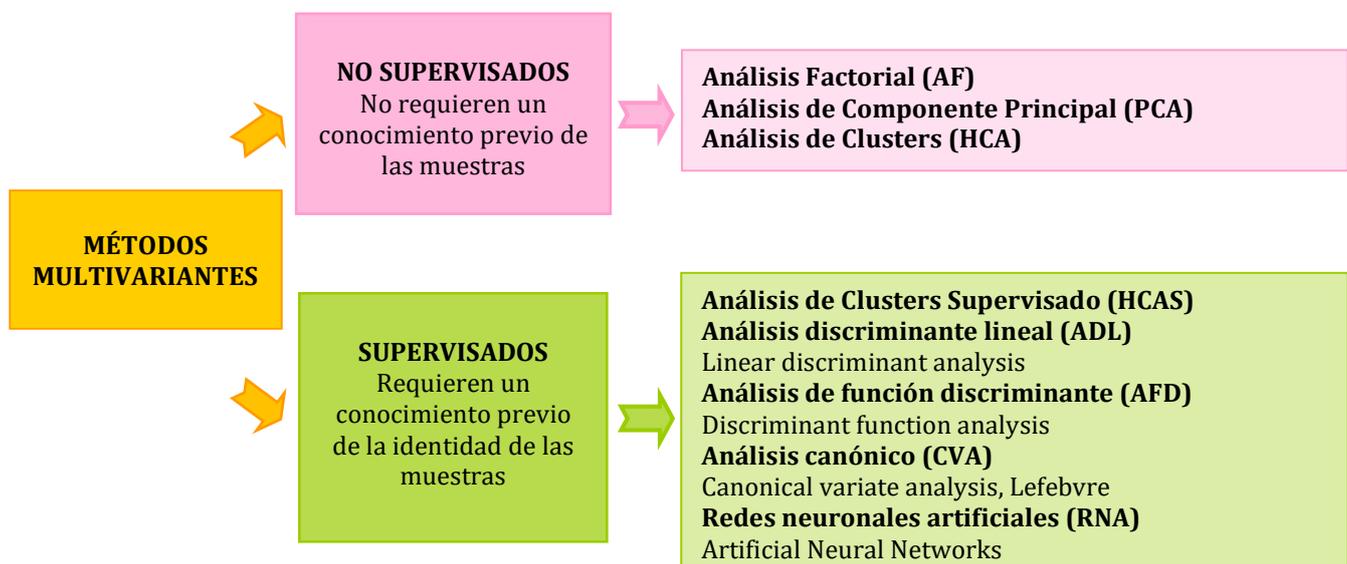


Figura 21. Clasificación de los métodos multivariantes de acuerdo al conocimiento previo que es necesario tener de la identidad de las muestras.

4.3.2.1.1 Métodos multivariantes no supervisados

Los métodos no supervisados, también llamados **métodos exploratorios, o de clasificación objetiva**, describen la estructura de los datos espectrales sin un conocimiento previo de la identidad de las muestras. Están basados en criterios objetivos de pertenencia a un grupo en el conjunto de datos. Un ejemplo de este tipo sería efectuar un análisis de heterogeneidad en una población de microorganismos: establecer el grado de diversidad en un conjunto de aislamientos, por ejemplo hospitalarios o de una región del país, determinar si los mismos son similares o no desde el punto de vista de su expresión fenotípica. Estos métodos tratan de encontrar estructuras de grupos intrínsecas dentro del conjunto de datos sin la necesidad de una asignación o partición previa.

Otra aplicación de los métodos multivariantes no supervisados, de gran utilidad en diagnóstico médico y microbiología, es el desarrollo de modelos de clasificación. Para llevar a cabo estos estudios debe contarse con cierta información previa sobre las muestras, es decir que cada espectro debe estar asociado a un dato cualitativo, debe estar previamente caracterizado con algún criterio que permite asignarle pertenencia a un grupo. Cuando se aplican estos métodos a la caracterización o identificación de microorganismos, por ejemplo, deben incluirse en el esquema de análisis, espectros de muestras perfectamente caracterizadas por otras técnicas (bioquímicas o de biología molecular), cada espectro incluido en el análisis debe ser formalmente asignado a una clase (género, especie o cepa). Posteriormente espectros de muestras desconocidas son desafiados a estos esquemas de clasificación y se evalúa el grado de pertenencia a alguna de las clases previamente definidas (Mariey y col., 2001; Naumann, 2000; Schmitt y Udelhoven, 2001).

4.3.2.1.2 Métodos multivariantes supervisados

Las técnicas quemométricas denominadas supervisadas emplean un conocimiento previo sobre la identidad o característica de las muestras, y cada espectro debe *a priori* ser formalmente asignado a una clase definida por su identidad o característica. Se desarrolla un modelo en base a estas diferencias que permitirá luego identificar o caracterizar muestras desconocidas (Maquelin y col., 2003; Naumann, 2000).

Estos modelos supervisados pueden desarrollarse en base a diferentes estrategias matemáticas. Una de ellas consiste en hacer combinaciones lineales de los datos,

asignando diferentes pesos para minimizar la varianza dentro de un grupo y maximizar la varianza entre grupos. La distancia entre los diferentes grupos o clases, se mide a través de la distancia *Mahalanobis*, la cual caracteriza la partición obtenida. Estos métodos una vez desarrollados deben ser validados a través de diferentes *tests* de validación externa que indicarán la **robustez** del sistema de clasificación desarrollado. Para realizarse los test de validación externa se emplea otro conjunto de muestras perfectamente conocidas y clasificadas no empleadas para la etapa de desarrollo del modelo. De modo que por lo general los estudios supervisados requieren de un gran número de muestras perfectamente identificadas. Como se describirá más adelante (sección de Materiales y Métodos) son clasificadas en dos grupos, uno mayoritario (70% de los datos) denominado un grupo de **entrenamiento** que se utiliza para elaborar el método y un grupo de **testeo** que se emplea para su validación.

Otra de las estrategias matemáticas empleadas para la clasificación o identificación de muestras por métodos supervisados es el desarrollo de redes neuronales artificiales (RNA). Las mismas constituyen uno de los procedimientos más utilizados para el desarrollo de sistemas supervisados basados en el entrenamiento. Se definen como sistemas no lineales, flexibles y con gran capacidad de generalización.

El desarrollo de RNA ha tenido un gran impacto en el desarrollo de modelos para identificación de microorganismos. En este sentido, Grunert y colaboradores (Grunert y col., 2013) desarrollaron un sistema de RNA sobre espectros FTIR de *Staphylococcus aureus* para diferenciarlos según sus serotipos capsulares. Asimismo, en los últimos tiempos el desarrollo de estos modelos ha tenido un gran auge en área del diagnóstico médico. El análisis infrarrojo de las modificaciones que sufren líneas celulares de carcinoma ovárico humano frente a la exposición a diferentes antibióticos estudiadas por FTIR en combinación con RNA y ACP permitió el desarrollo de prototipos de métodos automatizados para determinar el fenotipo de resistencia del cáncer (Zendejdel y col., 2012). Del mismo modo, entre otros logros de la espectroscopía FTIR combinada con análisis supervisados multivariantes basados en RNA podemos mencionar el desarrollo de un método de diagnóstico alternativo a los métodos clínicos y genéticos utilizados hasta el momento, para la detección en los trastornos vasculares de tipo Telangiectasia hemorrágica hereditaria (Lux y col., 2013).

Si bien el estudio y la aplicación de herramientas quemométricas multivariantes aplicadas en espectros FTIR de muestras biológicas incrementan continuamente a nivel mundial, su estudio y desarrollo es limitado en nuestro país. Siendo así de gran

relevancia la adquisición de conocimientos que permitan su utilización para poder ser empleadas en diferentes estudios de espectroscopía.

4.4 Aplicaciones de la espectroscopía FTIR en la biología, la microbiología, la industria y el diagnóstico médico.

La gran cantidad de ventajas que posee la espectroscopía FTIR, entre las que se destacan la rapidez de la metodología para la obtención de resultados comparada con las técnicas convencionales; la amplia aplicabilidad a diversos tipos de muestras (sólidas, líquidas, suspensiones); la gran especificidad para diferenciar composición molecular entre distintos materiales y su alta sensibilidad en la detección de grupos funcionales, hace a esta técnica sumamente atractiva y de amplia aplicación en distintas áreas. Asimismo, debido a que la espectroscopía IR requiere de una pequeña cantidad de consumibles y los sistemas computacionales que necesitan ser aplicados no requieren de un hardware específico el costo de la aplicación de esta metodología es reducido si se cuenta con el equipo correspondiente. Se debe reconocer en este sentido que la inversión inicial puede resultar importante, pero que la misma es compensada ampliamente durante la vida útil del equipo.

La posibilidad de crear bases de datos espectrales que pueden ser compartidas e intercambiadas entre los diferentes laboratorios nacionales e internacionales es una de sus principales ventajas. Existen universalmente bases de datos espectrales de proteínas que son utilizadas para determinar estados conformacionales en las mismas (Fabian 2002), bibliotecas espectrales de microorganismos relacionados con la salud y con la industria alimenticia (Bosch y col., 2010; Lecellier y col., 2014; Maquelin y col. 2003; Rebuffo y col., 2006; Wenning 2002; Wenning y col., 2014). En el área microbiológica, especialmente en el tema de salud, se ha demostrado la capacidad de la técnica para realizar estudios epidemiológicos con gran eficiencia, para la detección de cadenas de infección, así como también para el control en el mantenimiento de colecciones de microorganismos. También ha sido reportada la aplicación en las industrias de la alimentación, las farmacéuticas y estudios de calidad de aguas (Schmidt y col., 2012; Shapaval y col., 2012; Wenning y col., 2014). En el monitoreo y control de los procesos biotecnológicos constituye una técnica alternativa a los procedimientos químicos convencionales (Havlik y col., 2013; Sampaio y col., 2017; Shuster, 1999; Tseng y col.,

1996), que permite obtener, en tiempos reales, información del fenotipo de las poblaciones en crecimiento.

El desarrollo de nuevos espectrómetros de alta tecnología, sumado a las estrategias de evaluación de los espectros obtenidos, ha hecho posible el análisis sobre muestras biológicas como virus, células animales y vegetales y aún en el estudio de tejidos, y fluidos biológicos que por otras metodologías no resulta posible analizar.

La **Figura 22** muestra las aplicaciones de la espectroscopía FTIR en estudio de sistemas biológicos. Las investigaciones sobre la complementariedad de FTIR con otras técnicas como FTNIR y FTRaman, y el desarrollo de nuevos sistemas de computación para el análisis de reconocimiento de *patterns*, abre caminos impensados en las aplicaciones biológicas y biomédicas.

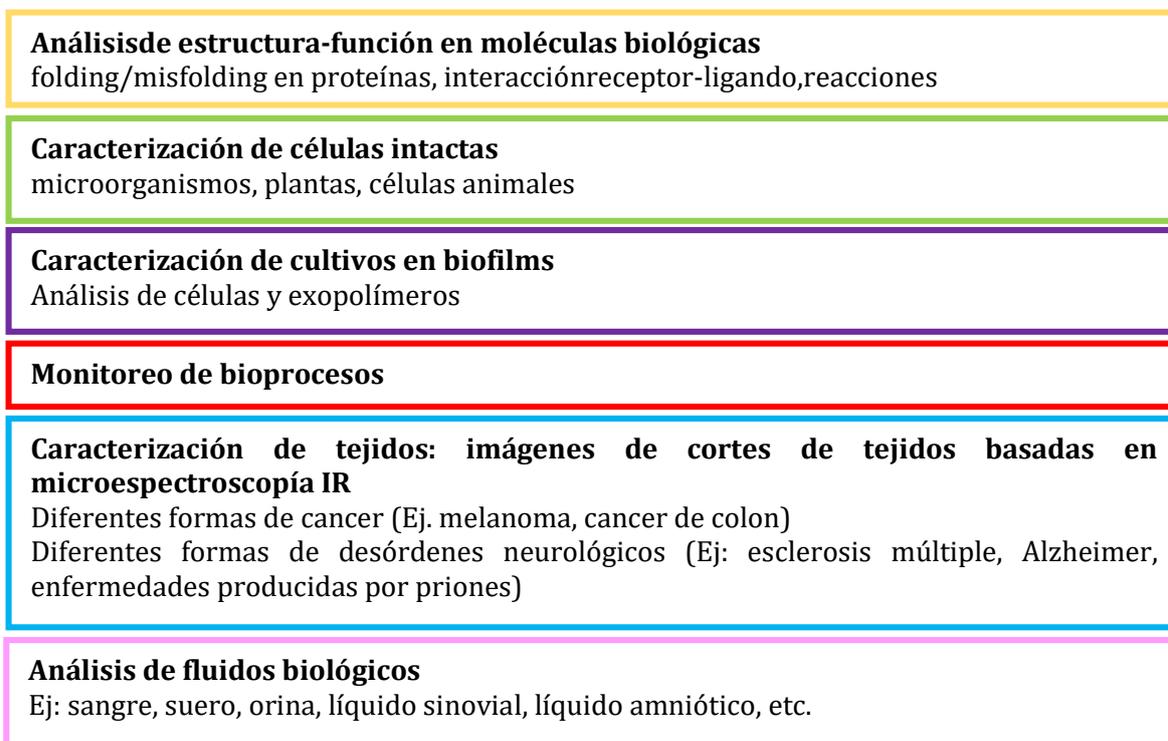


Figura 22. Aplicaciones de espectroscopía Infrarroja en el estudio de material biológico.

Hipótesis

-Durante su crecimiento en medios líquidos los embriones obtenidos por Fertilización *in vitro* producen metabolitos que son liberados al medio de cultivo. Los sustratos consumidos y los productos del metabolismo a lo largo de 3 días de incubación dependen de la evolución de cada embrión en particular.

-El metaboloma de los embriones que implantan es diferente a la de los embriones que no implantan.

-Las técnicas fisicoquímicas basadas en espectroscopía FTIR combinadas con métodos quemométricos multivariantes permiten detectar la presencia de marcadores bioquímicos en los sobrenadante de cultivos de embriones asociados a su potencial de implantación.

-Este estudio metabolómico permitirá seleccionar dentro de una cohorte de embriones el/los embriones con mayor potencial de implantación.

-La inclusión de parámetros asociados a la madre y a los embriones en los modelos de predicción del potencial de implantación basados en la metabolómica, mejorarán la probabilidad de éxito del tratamiento de fertilización.

Objetivos

1 Objetivo general

Desarrollar una nueva estrategia no invasiva que permita determinar, con mayor precisión que los métodos actualmente en uso, el potencial de implantación de embriones obtenidos en procedimientos de fertilización asistida. La nueva metodología implicará desarrollar un sistema informático basado en estadística multivariante, que permita el análisis y la discriminación de espectros infrarrojos de sobrenadantes de cultivo de embriones por su distinta capacidad de implantación.

Se pretende desarrollar una herramienta que combine espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) con procedimientos bioinformáticos para detectar el potencial de implantación de un embrión y que en consecuencia permita reducir la gestación múltiple.

1.1 Objetivos específicos

1- Instalar, poner a punto y adquirir los conocimientos necesarios para manejar el espectrómetro FTIR VERTEX 70 (Bruker Optik, Alemania) acoplado al módulo externo HTS-XT de alta performance (*High-Throughput Screening*). Este equipo fue adquirido en el marco de este estudio a través del Premio *Internacional a la Innovación en Fertilización Asistida -Grant for fertility innovation, GFI 2012-*. Estudiar el manejo del software OPUS/LAB (Bruker Optik, Alemania) que permite la adquisición, control y evaluación de los datos espectrales registrados con este espectrómetro FTIR.

2- Optimizar y estandarizar los parámetros de preparación de muestra y registro de espectros. Registrar espectros infrarrojos de los sobrenadantes de cultivo de embriones obtenidos de pacientes sometidas a tratamientos de fertilización *in vitro* en la clínica de fertilización asistida PREGNA Medicina Reproductiva, en el período 2012-2015.

3- Analizar de cada embrión incluido en el estudio, las características morfológicas mediante microscopía óptica, registrar la capacidad de implantación, en el caso de los embriones transferidos.

4- Aplicar técnicas de pre-tratamiento espectral para: i) eliminar los espectros que no cumplan con los requisitos de calidad espectral, y ii) preparar los espectros para ser sometidos a estudios estadísticos multivariantes.

5- Construir una base de datos espectrales que incluya no menos de 2000 espectros de sobrenadantes de cultivo de embriones provenientes de no menos de 300 pacientes a

tratar. Ordenar y clasificar dichos espectros en clases según si los mismos provienen de embriones transferidos o no y dentro de los primeros si provienen de embriones que implantaron o no.

6- Aplicar métodos quemométricos (uni- y multi-variantes) a los espectros pre-tratados con el objetivo de buscar marcadores espectroscópicos asociados a la implantación. Se pretende desarrollar un moldeo informático basado en FTIR que permita predecir el potencial de implantación de embriones antes de ser transferidos a las madres. Con este propósito se analizarán las características espectrales como bandas, picos, áreas espectrales, y se llevarán a cabo análisis basados en el estudio de *patterns* como análisis de clusters, redes neuronales artificiales, análisis factorial, análisis de componentes principales, cuadrados mínimos parciales.

7- Estudiar la posibilidad de mejorar los modelos de discriminación basados en la metabolómica -reflejada en los espectros FTIR de sobrenadantes de cultivo-, combinando esta variable con otros parámetros que podrían influir favorable o desfavorablemente a la probabilidad de implantación del embrión. Entre estos factores consideraremos: i) las características morfológicas del embrión (MI, MII, MIII, MIV); ii) la edad de la madre (joven, media, avanzada); iii) el índice de masa corporal materno; y iv) tabaquismo. Estos estudios se realizarán combinando los espectros FTIR, con datos obtenidos de las madres y de los embriones, y la aplicación de métodos multivariantes de mínimos cuadrados parciales y discriminación lineal (parcial least square -linear discrimination –PLSLD-) desarrollados en el Departamento de Ciencias Matemáticas y Tecnología de la *Norwegian University of Life Sciences*, Ås Noruega.

Es importante señalar que el desarrollo de esta investigación se llevó a cabo en el marco de un **TRIAL CLINICO**¹ cumpliendo estrictas normas internacionales de bioseguridad, aplicando las "Buenas Prácticas en Manejo de Datos para Investigación".

¹ La Organización Mundial de la Salud (OMS) define un TRIAL CLINICO como «estudios de investigación que exploran si una estrategia médica, tratamiento o dispositivo es seguro y eficaz para los seres humanos».

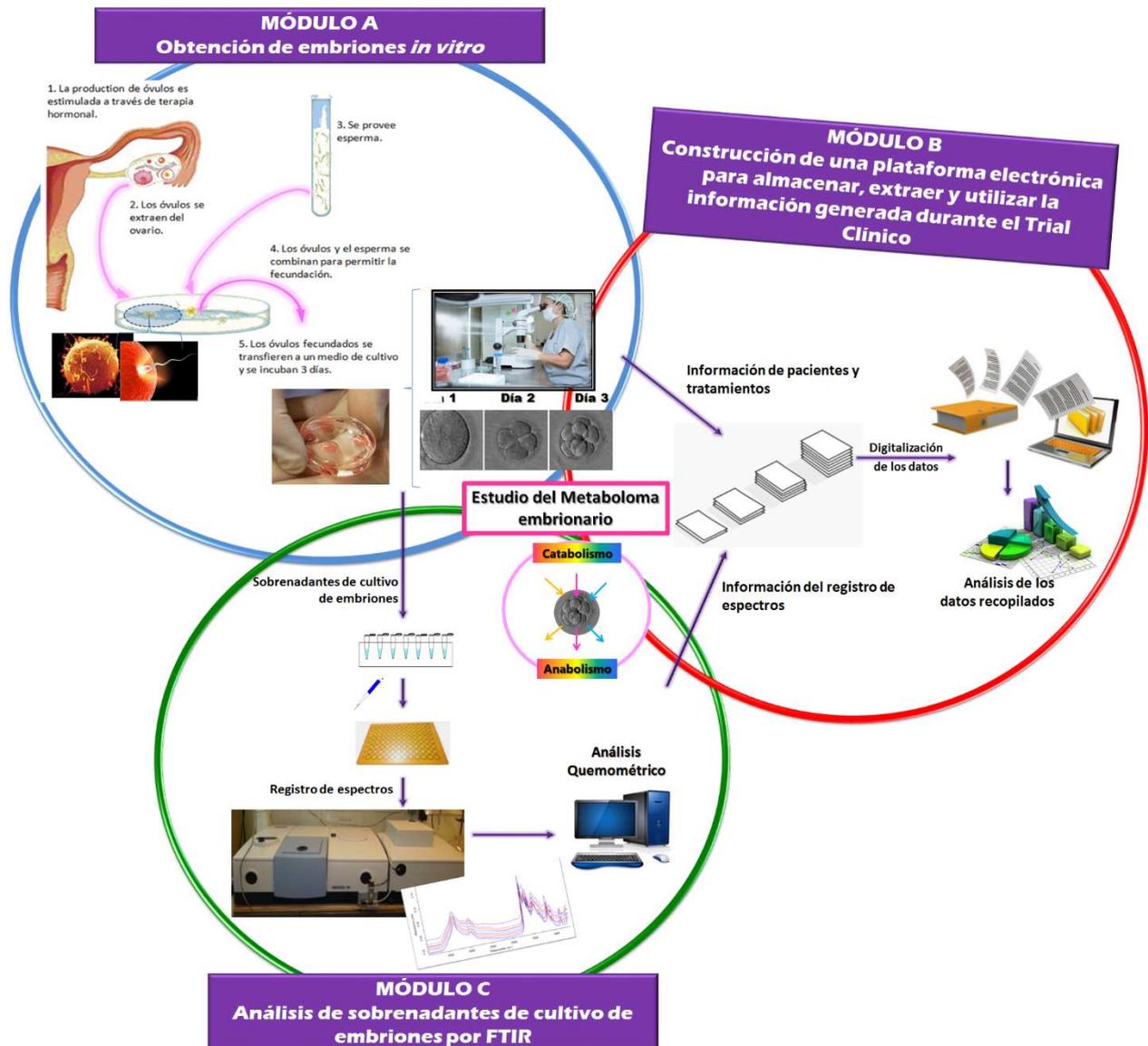
Para asegurar y facilitar el almacenamiento y manejo de datos, se trabajó bajo el “*OpenClinica*”, uno de los sistemas informáticos de captura electrónica de datos empleado a nivel internacional para la investigación clínica. El “*OpenClinica*” es una herramienta informática basada en un sistema de formularios y protocolos que permite para cada pareja incluida en el tratamiento registrar su consentimiento a formar parte del estudio, los datos correspondientes a la madre y el padre, el número y características de los embriones obtenidos, datos asociados a la evolución del embarazo, etc. Este sistema fue instalado en un servidor Web para ser operado desde los tres centros involucrados en la investigación (CINDEFI, PREGNA Medicina Reproductiva, e IECS Instituto de Efectividad Clínica Sanitaria).

Los procedimientos realizados en esta investigación fueron evaluados y aprobados por el **Comité de Ética en Investigación**, Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas “Norberto Quirno” (CEMIC) (**ANEXO I**).

Materiales y Métodos

ESQUEMA GENERAL DEL TRIAL CLÍNICO

La ejecución de la investigación implicó un trabajo interdisciplinario del que participaron médicos y biólogos del Centro de fertilización **PREGNA Medicina Reproductiva**, investigadores/docentes del laboratorio de biospectroscopía del **CINDEFI-CONICET, UNLP** y estadísticos e informáticos especializados en el área clínica del **Instituto de Efectividad Clínica y Sanitaria (IECS)**. Debido a la diversidad de las actividades involucradas en esta investigación, y con el objetivo de optimizar la descripción y comprensión de las mismas, se dividieron los estudios realizados en tres módulos:



Módulo A: Obtención de embriones *in vitro*. Estudios morfológicos de los mismos por microscopía. Extracción de sobrenadantes del cultivo de embriones (en PREGNA Medicina Reproductiva) y envío al CINDEFI manteniendo cadena de frío.

Módulo B: Construcción de una plataforma electrónica para almacenamiento de datos. Abarca el registro y manejo de datos generados en PREGNA Medicina Reproductiva asociados a los pacientes, las características y número de embriones, y la información proveniente del laboratorio de Bioespectroscopía del CINDEFI. No se incluyó en esta plataforma los espectros FTIR registrados.

Módulo C: Involucra la preparación de las muestras para el registro de los espectros FTIR de los sobrenadantes del cultivo de embriones y su análisis de discriminación.

MÓDULO A

OBTENCIÓN DE EMBRIONES Y SOBRENADANTES DE CULTIVOS DE EMBRIONES *IN VITRO*

1 Pacientes y procedimiento para la obtención de óvulos

Todas las investigaciones fueron realizadas en el marco de un *Trial Clínico* en el cual se definieron en primer lugar, los criterios de selección de las pacientes a incluir. Las pacientes elegidas fueron las provenientes de parejas con infertilidad de más de 1 año de duración, con no más de 2 tratamientos previos de FIV, mujeres menores de 42 años y con al menos 1 embrión seleccionado para la transferencia. Fueron excluidas del proyecto, aquellas con más de 2 intentos previos de FIV, mujeres de 42 años o más, uso de tratamiento hormonal distinto de la estimulación ovárica, carencia de embriones para la transferencia, pérdida recurrente del embarazo, hidrosálpinx, patología uterina que impide la implantación (miomas intramurales o submucosos, adenomiosis, pólipos o endometrio Hiperplasia), o anomalías mullerianas, trombofilia, síndrome de ovario poliquístico, enfermedades crónicas; así como también factor masculino severo que requiere biopsia testicular. Aquellas parejas que cumplían con los requerimientos y deseaban formar parte del proyecto y autorizaban además la divulgación de la información médica, dejaron constancia de ello a través de la firma de un **Formulario de Consentimiento**, el cual fue elaborado para este caso particular (**ANEXO II**).

Teniendo en cuenta los criterios antes descriptos, las pacientes de hasta 42 años de edad recibieron un tratamiento de hiperestimulación ovárica controlada mediante el uso de gonadotrofinas recombinantes, urinarias o combinadas, y agonistas o antagonistas de GnRH para el control del pico de LH. Se realizaron monitoreos del crecimiento folicular y endometrial por vía ecográfica transvaginal. Al cumplirse los criterios de desarrollo folicular (crecimiento adecuado), se procedió a la maduración ovocitaria final con gonadotrofina coriónica humana, o agonistas de GnRH.

La punción para la recuperación ovocitaria se realizó en quirófano, bajo sedación endovenosa y anestesia local. Los líquidos foliculares resultantes fueron entregados inmediatamente al laboratorio de embriología, contiguo a la sala quirúrgica (**Figura 1**).



Figura 1. Imagen tomada en el Centro de fertilización PREGNA. Los líquidos foliculares son entregados inmediatamente a su obtención al laboratorio de Reproducción Asistida, contiguo a la sala quirúrgica.

2 Laboratorio de embriología

El esquema general del trabajo realizado en la Clínica de fertilización asistida PREGNA Medicina Reproductiva, se indica en la **Figura 5**.

i) El día de la punción folicular los complejos cumulus-corona recuperados (entre 1 y 14 ovocitos aproximadamente según la paciente) se lavaron en medio tamponado sobre platina térmica y luego se colocaron en placas de cuatro pocillos conteniendo 500 μ L de medio G-IVF (Vitrolife) cubierto con aceite mineral (Ovoil, Vitrolife) y llevados de inmediato a la incubadora.

ii) Las muestras de semen se procesaron mediante gradientes discontinuos de densidad 90-50 % (Sperm Grad, Vitrolife). La suspensión final fue dejada a temperatura ambiente hasta el momento de la inseminación.

iii) Obtención del embrión:

-Por FIV convencional, la inseminación se llevó a cabo 2-4 horas después de la recuperación de los ovocitos en medio G-IVF bajo aceite. La concentración de espermatozoides para inseminación se ajustó a 200.000 espermatozoides progresivos rápidos/mL.

-Por ICSI, 2-4 horas después de la aspiración folicular, los ovocitos captados se desnudaron de sus células del cumulus mediante un método mecánico y tratamiento con hialuronidasa (Hyase, Vitrolife) (**Figura 2**). Los procedimientos de ICSI se llevaron a cabo de acuerdo a protocolos estandarizados (Palermo y col., 1992).

La fecundación fue verificada 18-20 horas después de la inseminación. Los ovocitos fertilizados normales (2PN) fueron transferidos para ser cultivados individualmente en microgotas de 35 μ L de medio G1 Plus (Vitrolife) cubiertos con aceite para evitar la evaporación del medio de cultivo, e incubados por 3 días.

iv) Durante la incubación los embriones fueron observados microscópicamente y clasificados de acuerdo a su morfología según el Consenso de Estambul (Balaban y col., 2011) en clases de I a IV (en la siguiente sección se darán los detalles de los criterios de clasificación morfológica).

v) Dentro de la cohorte de embriones de cada paciente (entre 1 y 14 embriones) se seleccionaron los de mejor calidad desde el punto de vista morfológico y se transfirieron utilizando catéteres EchoTip® Soft-Pass™ TVP (Cook Medical, Bloomington, Estados Unidos) o PM Trans Set Mini CH3© (Prince Medical, Erculs, Francia) para las transferencias más difíciles (**Figura 3**). El número de embriones transferidos varió entre 1 o 2 según las características de la cohorte de embriones (número total y morfología).

Los embriones no transferidos a las madre tuvieron dos destinos posibles: a) se llevaron a cultivos en medio G2 (una gota de medio cultivo cubierta de aceite) para prolongar su incubación por 2 o 3 días adicionales, obteniendo así blastocistos de 5 o 6 días de desarrollo; b) se criopreservaron para futuras transferencias

vi) Los blastocistos de 5 o 6 días de desarrollo se clasificaron morfológicamente según el Consenso de Estambul (Balaban y col., 2011) y luego fueron transferidos o criopreservados. **Los sobrenadantes de los embriones de 5 o 6 días de incubación, tanto transferidos como criopreservados no fueron incluidos en esta investigación.**



Figura 2. Imagen de dos ovocitos porcinos. 1: Ovocito rodeado por sus células del cumulus oophorus expandidas tras la maduración *in vitro* (40X), 2: Ovocito denudado antes de ser sometido a la digestión de la zona pelúcida (ZP) (40X) (Romar Andrés, 2001).

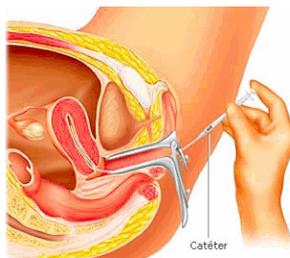


Figura 3. Transferencia de embriones utilizando catéter.

2.1 Clasificación morfológica de embriones

Como se mencionó anteriormente la clasificación morfológica de los embriones se realizó teniendo en cuenta los parámetros internacionales establecido en el Consenso de Estambul (Balaban y col., 2011), entre los cuales se incluyen:

Parámetros establecidos para la clasificación de embriones según la morfología. Embriones en etapa de escisión (Tabla 1).

- ***Fragmentación:*** un fragmento puede ser definido como una estructura anuclear, extra-citoplasmática unida a la membrana. La incidencia de la fragmentación es difícil de evaluar, ya que primero es necesario diferenciar los fragmentos de las células, y luego estimar la proporción relativa del embrión que está fragmentado. Los grados relativos de la fragmentación se definieron como: leve (<10 %), moderado (10-25 %) y severo (>25 %). Los valores de los porcentajes se basan en los equivalentes de células, por lo que para un embrión de 4 células, el 25% de fragmentación equivaldrían en volumen a una de sus blastómeras.
- ***Multinucleación:*** Una blastómera que contiene más de un núcleo en interfase se define como multinucleada. La presencia de multinucleación se considera anormal y se ha informado tanto en embriones *in vivo* (Hertig et al., 1954) y en particular *in vitro* (Tesarik et al., 1987; Winston et al., 1991; Pickering et al., 1995). Se estableció que la multinucleación se asocia con una disminución del potencial de implantación, y que los embriones multinucleados están asociados con un mayor nivel de anomalía cromosómica y, como consecuencia, aumenta el riesgo de aborto espontáneo. Se acordó que la evaluación de la multinucleación debe llevarse a cabo en el día 2 (es decir, 44 + 1 horas después de la inseminación), y que la observación

de multinucleación en una célula es suficiente. Asimismo se estableció que evaluar la multinucleación en el día 3 es más difícil debido al tamaño más pequeño de las células, y por lo tanto sería menos confiable.

- *Tamaño de las células:* Se acordó que para los embriones en las etapas de 2, 4 y 8 de células, las blastómeras deben ser de igual tamaño. Para todas las demás etapas, se podría esperar una diferencia de tamaño en las células, debido a que la fase de escisión no se ha completado.
- *Otras características morfológicas de embriones de Día 2 y 3:* granularidad citoplasmática, apariencia de la membrana y presencia de vacuolas, también pueden ser evaluadas. Es importante destacar que estas características pueden variar entre los embriones de un paciente y entre pacientes. No hay evidencias significativas para apoyar un efecto biológico claro de estas características en el potencial de implantación.
- *Embrión no viable.* Un embrión no viable es un embrión en el que el desarrollo se ha detenido durante al menos 24 horas, o en el que todas las células han degenerado o lisado.

Tabla 1. Sistema de puntuación para los embriones en etapa de escisión.

Clasificación	Descripción
Bueno (Morfología I)	- < 10% fragmentación - tamaño celular específico del estadio - sin multinucleación
Intermedio (Morfología II)	- 10-25% fragmentación - mayoría de las células con tamaño celular específico del estadio - sin evidencias de multinucleación
Pobre (Morfología III)	- fragmentación severa (>25%) - tamaño celular no específico del estadio - evidencia de multinucleación
No viable (Morfología IV)	- desarrollo detenido durante al menos 24 horas - todas las células han degenerado o lisado

2.2 Muestras adicionales empleadas como control

En todos los ensayos dentro de la cohorte de embriones obtenida para cada pareja se incluyó un control que consistió en una gota de medio de cultivo cubierta con aceite incubada bajo las mismas condiciones que los embriones.

Se tomaron también alícuotas de medio de cultivo de diferentes lotes y de aceite mineral de diferentes partidas y/o proveedores para controlar la variabilidad en su composición química.

2.3 Identificación de las muestras

Para cada pareja se generó un código identificador (ID), que constaba de un valor numérico de 4 dígitos (en orden creciente) y dos letras que eran establecidas al azar. Posteriormente, los embriones, y los correspondientes sobrenadantes de cultivo de los embriones de cada paciente eran enumerados consecutivamente (de 1 al 14), y tanto el número del embrión, como los días de desarrollo de los mismos fueron incluidos en el ID. De este modo, cada embrión y cada sobrenadante de cultivo, de cada paciente quedaba perfectamente individualizado e identificado (**Figura 4**).

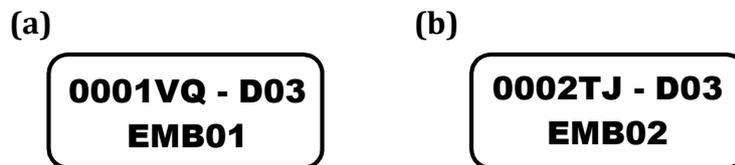


Figura 4. Ejemplo de códigos identificadores (ID) generados para los embriones y sus correspondientes sobrenadantes. **(a)** Identificación del embrión 01 de 3 días de desarrollo, paciente 0001VQ. **(b)** Identificación del embrión 02 del paciente 0002TJ, con 3 días de incubación.

2.4 Obtención y preservación de los sobrenadantes de cultivo

Una vez registrada la morfología de cada uno de los embriones (paso v), previo a la transferencia, criopreservación, o prolongación del cultivo del embrión a 5 o 6 días

(paso vi), se tomó el sobrenadante de cultivo (aproximadamente 30 μ L) teniendo especial cuidado en no arrastrar el aceite que cubría al medio de cultivo de cada embrión.

Las muestras de sobrenadante fueron rotuladas como se mencionó arriba y congeladas a -80° C en crioviales hasta su envío a La Plata. El envío al laboratorio de Bioespectroscopía se realizó bajo estrictas normas de bioseguridad, en cajas de telgopor, herméticamente cerradas, conteniendo las muestras en hielo seco.

Los procedimientos de obtención de embriones *in vitro* y de sobrenadantes de cultivo de embriones se resumen en manera esquemática en la **Figura 5**.

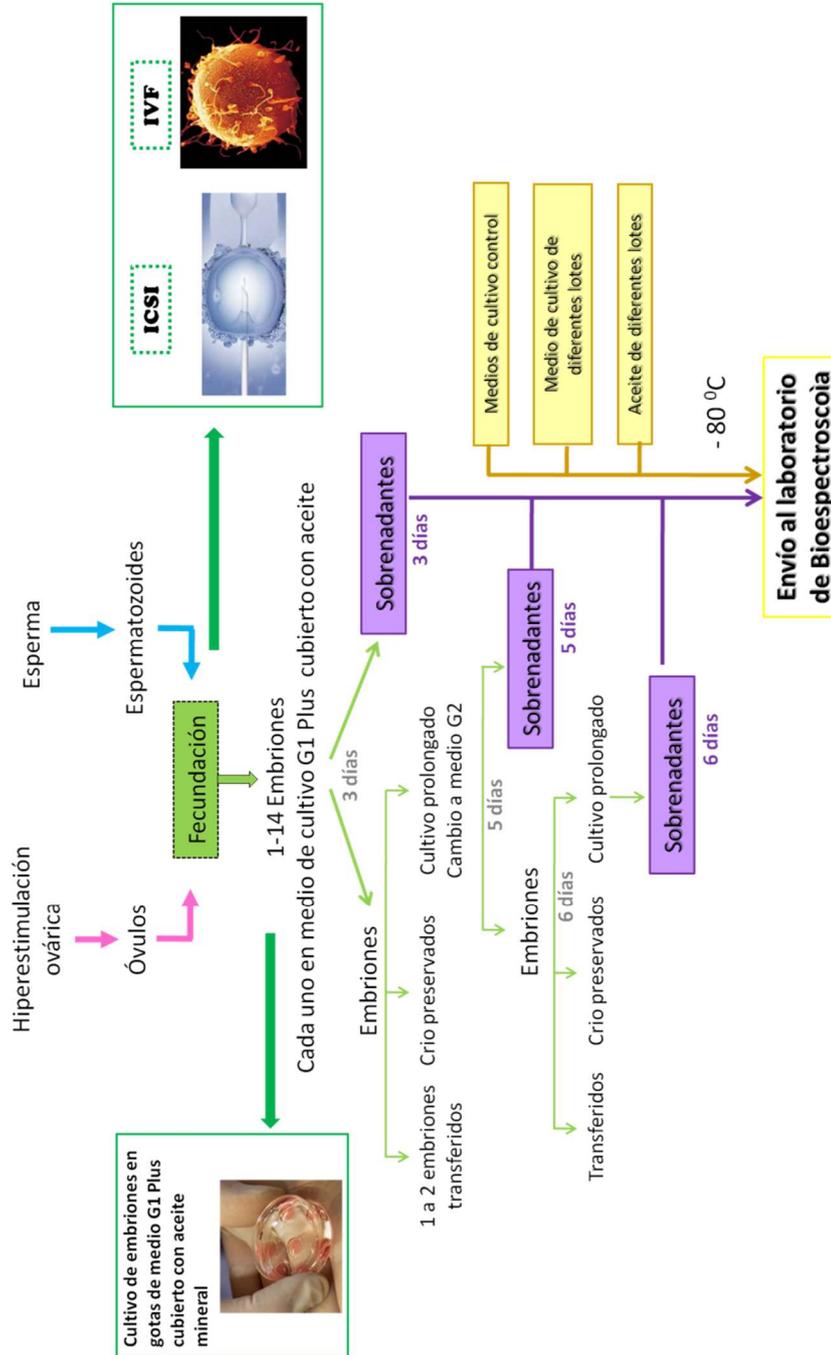


Figura 5. Esquema general de obtención de embriones y sobrenadantes de cultivos *in vitro*.

MÓDULO B

CONSTRUCCIÓN DE UNA PLATAFORMA PARA ALMACENAR, EXTRAER Y UTILIZAR LA INFORMACIÓN GENERADA

El ordenamiento y la utilización sistemática de la información recopilada, surgida de: i) los pacientes, ii) los tratamientos seguidos, iii) laboratorio de embriología, y iv) del laboratorio de bioespectroscopía; resultó una tarea muy compleja pero fundamental para llevar a cabo los diferentes tipos de análisis de este trabajo.

Los métodos y las herramientas que se han empleado tradicionalmente para la recolección y visualización de datos biológicos han mejorado en forma considerable en los últimos años. Entre las herramientas disponibles en la actualidad se cuenta con aquellas que permiten la captura electrónica de datos clínicos de manera más limpia, permitiendo realizar estudios supervisados y monitoreados. Uno de los sistemas más empleados a nivel internacional es la plataforma **OpenClinica**. El desarrollo e implementación de la misma se realizó en colaboración de los profesionales del Instituto de Efectividad Clínica y Sanitaria (IECS).

El sistema de datos online desarrollado permitió recopilar datos de los establecimientos, Centro de Fertilización PREGNA y del Laboratorio de Bioespectroscopía (CINDEFI-Universidad de La Plata).

La elaboración de la base de datos incluyó los siguientes procedimientos:

- i) Creación de un nuevo estudio en la plataforma
 - Creación de un perfil para el estudio
 - Descripción y Estado
 - Configuración de parámetros básicos
- ii) Creación de formularios de reporte (Case Report Forms - CRF)
 - Elaboración de los diferentes formularios electrónicos para la entrada de datos (clínicos y de laboratorio)
 - Diseño de la configuración de CRF
 - Definición de las estructuras de datos

- Incorporación de capacidades dinámicas (mostrar/esconder, omitir modelos, calcular y asignar puntuación)
- Reutilización de formatos y elementos de datos
- iii) Creación de Eventos/Visitas
 - Definición de un tipo de evento (programado, no programado, repetitivo)
 - Selección de los CRF que se asociaron con el evento
 - Indicación si el CRF es para un paciente o uso clínico
 - Establecimiento de requisitos para la Verificación de la fuente de datos (Source Data Verification –SDV), doble ingreso de datos, etc.

iv) Creación de grupos temáticos

Creación de categorías por temas como por ejemplo: seguimiento de grupos con tratamiento, cohortes, etc.

v) Creación de reglas

Definición de reglas para automatizar tareas rutinarias de limpieza de datos, enviar notificaciones, manejar calendarios de estudios, y más

vi) Creación de sitios

Aditamento de sitios para el estudio. Adaptación del protocolo según el sitio si es necesario

vii) Asignación de usuarios

Ingreso de usuarios al estudio y gestión de los derechos de acceso

viii) Incorporación de módulos disponibles para el estudio

Siguiendo estas pautas y pasos se generó la plataforma y se desarrolló un Manual o instructivos dirigidos al personal involucrado para su entrenamiento y formación técnica. Una vez optimizado el sistema se continuó con el ingreso de datos a lo largo de todo el Trial Clínico y paralelamente se resolvieron inconsistencias y discrepancias.

La plataforma **OpenClinica** como se mencionó anteriormente presenta una alta eficiencia para el registro y almacenamiento de datos involucrados en un Trial Clínico. Sin embargo, poder disponer de dicha información para realizar análisis posteriores requirió de la reestructuración de los datos de los pacientes (edad, peso, altura, etc.), laboratorio de embriología (número de embriones, morfología, etc.), evolución del embarazo (implantación, número de embriones que implantaron, tipo de embarazo), entre otros (**Figura 6**). Los procedimientos necesarios para reestructurar y analizar los datos generados fueron realizados en el laboratorio de Bioespectroscopia (CINDEFI).

MÓDULO C

ANÁLISIS DE SOBRENADANTES DE CULTIVO DE EMBRIONES POR ESPECTROSCOPIA FTIR

Los espectros IR de los sobrenadantes del cultivo de embriones constituyen un *fingerprinting* metabólico que es altamente específico y reproducible si se mantienen las mismas condiciones operativas. La composición química de los sobrenadantes (proteínas, lípidos, carbohidratos, pequeñas moléculas), depende de una serie de variables tales como la composición del medio de cultivo, los tiempos y las condiciones de incubación. Pequeños cambios en estos parámetros, así como en la preparación de las muestras, o la adquisición de datos espectrales, producen efectos significativos en el espectro resultante. Por lo tanto, con el fin de obtener resultados reproducibles, es necesario construir una base de datos robusta de los espectros infrarrojos, para lo cual el desarrollo de un procedimiento de estandarización es crítico. Los estudios de caracterización de muestras biológicas por FTIR son absolutamente fiables sólo si las condiciones de preparación y registro están perfectamente ajustadas. Por esta razón, es necesario estudiar en profundidad las diferentes fuentes de variación en los espectros FTIR de sobrenadantes de cultivo de embriones, con el fin de minimizar, eliminar o estandarizar estos factores.

Para el procedimiento de estandarización se utilizaron lotes de medio de cultivo G1 Plus remitidos por el Centro de fertilización PREGNA al laboratorio de Bioespectroscopía y muestras de pacientes que salieron del estudio por presentar alguna dificultad (cancelación del ciclo por endometrio fuera de condiciones para la transferencia, riesgo de síndrome de hiperestimulación ovárica).

El proceso de optimización y estandarización de la adquisición de los espectros FTIR de sobrenadantes de cultivo de embriones, el pre-procesamiento espectral y el análisis espectral incluyó una serie de pasos que se indican en el esquema de la **Figura 7**.

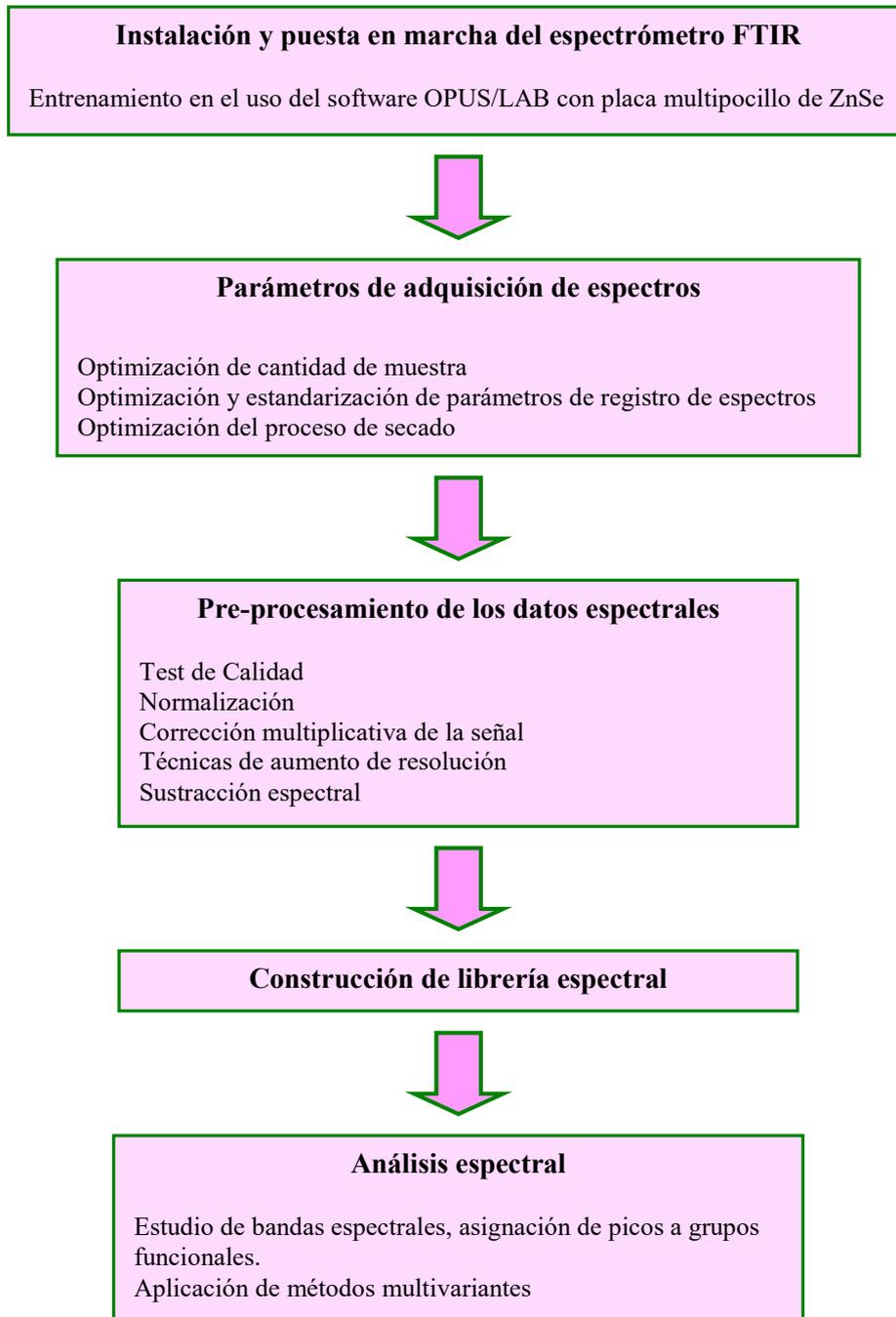


Figura 7. Etapas involucradas desde la optimización y estandarización del registro de espectros FTIR hasta el análisis espectral.

1 Instalación y puesta en marcha del espectrómetro FTIR

Se puso en marcha en el laboratorio el espectrómetro FTIR, VERTEX 70 acoplado al módulo HTX-XT de alta *performance* (Bruker Optics, Alemania, **Figura 8**) el cual fue adquirido por el CINDEFI en el marco del desarrollo de este proyecto.

1) Instalación del equipamiento (espectrómetro y módulo de lectura automática) con expertos enviados por la empresa Bruker Optics desde Alemania.

2) Optimización de las condiciones de trabajo (instalación apropiada, circulación de corriente de aire seco, etc.).

3) Puesta a punto de las lecturas FTIR empleando la placa multi-pocillo para el registro de 96 muestras de manera automatizada.

4) Implementación del uso del paquete OPUS/LAB del software **Opus 7.0** para la lectura automática de las muestras empleando el módulo HTX-Xt y el análisis de los espectros.

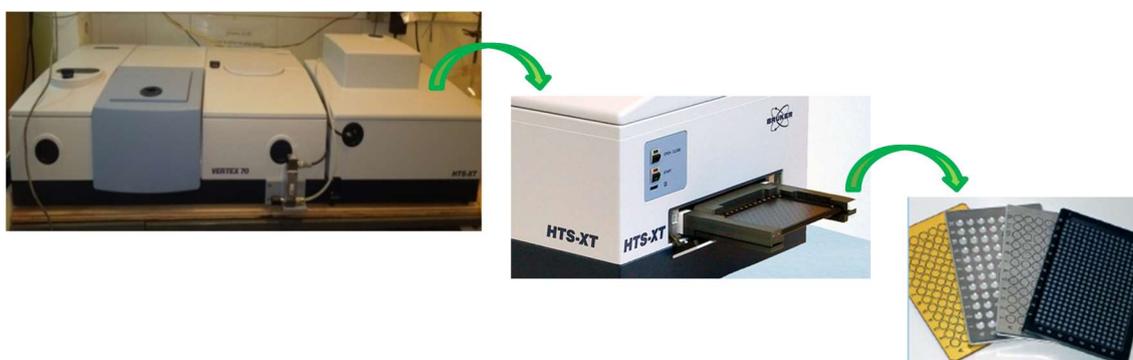


Figura 8. Espectrómetro VERTEX 70 acoplado al módulo HTX-Xt de alta *performance*.

2 Parámetros de adquisición de espectros

Previo a la adquisición de los espectros, se **registró** en la base de datos del **OpenClinica** la **recepción** de cada una de las muestras de sobrenadante recibidas en el laboratorio de Bioespectroscopía en La Plata.

2.1 Cantidad óptima de sobrenadante de cultivo

Desde los inicios de la utilización de la espectroscopía FTIR para caracterizar, discriminar o identificar sistemas biológicos, se considera la preparación y toma de muestra como los pasos esenciales para obtener reproducibilidad en las medidas y robustez en los modelos desarrollados (Bruker Optik 2011; Helm y col. 1991; Helm 1995; Naumann, 2000).

El primer parámetro que se optimizó fue entonces el volumen de muestra que se requiere para que los espectros presenten una absorbancia suficiente para superar el test de calidad espectral (QT) (que se describirá a continuación). Dado que los embriones se cultivan en 40 μL de medio G1 Plus, el máximo volumen de muestra a analizar con el que se contaría a lo largo del estudio sería de 30 a 35 μL . Con el objetivo de estudiar si era posible obtener más de un replicado por muestra donde cada uno cumpla con los requisitos que se van a describir posteriormente en el test de calidad, se evaluaron 3 volúmenes diferentes de medio de cultivo G1 Plus (10, 20 y 30 μL .) realizando 10 repeticiones de cada uno para comprobar qué volumen mínimo de sobrenadante de cultivo podría ser analizado.

2.2 Optimización y estandarización de los parámetros de registro de espectros FTIR

Se ajustaron los principales parámetros de adquisición de los espectros FTIR: resolución, velocidad de medida, número de escaneos, intervalo de medida, y se evaluó la variación en el valor de absorbancia máxima, relación señal:ruido en la región 1700-1500 cm^{-1} y 1200-900 cm^{-1} .

i) Resolución

Los valores de resolución utilizados en las muestras de origen biológico, microorganismos, tejidos, fluidos, etc., son por lo general entre 4 y 6 cm^{-1} (Lasch and Wolfgang, 2011; Naumann 2000). Valores superiores a 6 cm^{-1} son muy elevados y no permiten resolver los detalles de los espectros, y a valores inferiores a 4 cm^{-1} es muy difícil extraer información debido a que las bandas características de los sistemas biológicos son bandas anchas. En base a la experiencia previa del laboratorio se decidió registrar los espectros con resolución de 6 cm^{-1} .

ii) Escaneos y velocidad de lectura

Se ensayaron diferentes números de escaneos a diferentes velocidades de lectura de manera de optimizar la relación señal:ruido. Se obtuvieron finalmente como

parámetros óptimos para el espectrómetro VERTEX 70 acoplado al módulo HTX-XT de alta *performance* 64 escaneos a una velocidad de lectura de 0.2 cm/s.

iii) Intervalo de medida

Se comprobó si la placa de ZnSe de lectura múltiple (96 pocillos) del dispositivo HTX-XT tenía el mismo intervalo de lectura -de 4000 a 650 cm^{-1} -, que las celdas individuales de ZnSe de 13 mm de diámetro, de uso corriente en el laboratorio.

2.3 Optimización del tiempo y modo de secado de las muestras en las celdas de ZnSe.

En el presente trabajo se realizaron las medidas FTIR por Absorbancia/Transmitancia empleando como celda de lectura una placa de ZnSe de 96 “pocillos” utilizando la técnica del film seco. Como primordial requisito para que las medidas sean reproducibles y de buena calidad, el film que se forma sobre la celda debe ser **delgado, transparente y homogéneo**. La formación de una película adecuada resulta un desafío que requiere del testeo experimental de una gran cantidad de parámetros (Bruker Optik, 2011). Esto se logra optimizando entre otros parámetros, los asociados al secado de la suspensión acuosa sobre la celda: temperatura y tipo de secado. En este sentido, se evaluaron diferentes métodos de secado: secado al vacío en desecador en presencia de silicagel, a temperatura ambiente, en estufa a 30 °C y 60 °C. La calidad del film obtenido se evaluó por su transparencia y homogeneidad, reflejadas a través de las características espectrales generales, como desvío de la línea de base, la absorbancia máxima obtenida y forma de las bandas espectrales.

3 Pre-procesamiento de datos espectrales en muestras biológicas

El desarrollo de nuevas tecnologías en el campo de la espectroscopia IR y Raman, han permitido la generación de un gran número de datos, por lo que se ha producido una necesidad urgente del desarrollo de nuevos métodos automatizados de almacenamiento y nuevas estrategias de pre-procesamiento y análisis de datos espectrales (Lasch, 2012).

El pre-procesamiento espectral es un primer paso importante en el flujo de trabajo del análisis de los espectros FTIR, que implica la realización de tratamientos específicos

sobre los datos originales. Se demostró que el pre-procesamiento tiene una crucial importancia para las subsiguientes tareas de *data-mining* (proceso computacional que permite descubrir patrones en conjuntos de datos). De hecho, es ampliamente reconocido que los modelos cuantitativos y de clasificación elaborados sobre la base de datos pre-procesados generalmente se desempeñan mejor que los modelos que utilizan únicamente los datos originales crudos (Baker y col., 2014; Heraud y col., 2006; Kohler y col., 2006; Lasch, 2012; Wenning y Scherer, 2013).

Los objetivos del pre-procesamiento espectral son:

- a- Mejoramiento de la robustez y precisión de los posteriores análisis cuantitativos y de clasificación.
- b- Mejoramiento de la interpretación: los datos originales se transforman en un formato que va a ser mejor comprendido por el operador y los software.
- c- Detección y eliminación de valores atípicos y tendencias.
- d- Reducción de la dimensión de la información irrelevante y redundante.

3.1 Test de calidad

Uno de los pasos claves del pre-procesamiento espectral, es evaluar la calidad de un espectro para determinar si el mismo tiene las propiedades mínimas necesarias para ser incorporado a un estudio del tipo caracterización, discriminación y/o identificación. En los inicios de las investigaciones de la espectroscopía aplicada al estudio de los sistemas biológicos el grupo del Dr. Dieter Naumann del Robert Koch Institute, Berlín, Alemania, junto a Bruker Optics definieron ciertos criterios o umbrales (*thresholds*) máximos y mínimos en los valores de absorbancias y ruido que los espectros debían superar antes de ser analizados, y los resumieron en lo que hoy se conoce como el **Test de Calidad** espectral o *Quality Test (QT)* (Naumann, 2000). El QT incluye entonces, la evaluación de: i) valores de absorbancias en diferentes regiones del espectro, ii) intensidades de las bandas rotacionales del vapor de agua ya que éstas interfieren en el análisis espectral de las muestras biológicas principalmente por sus bandas características en la región Amida I, iii) la intensidad del ruido, iv) la relación señal:ruido en diferentes rangos y v) la deriva de la línea de base (*fringes* ópticos). Todos los software desarrollados por Bruker Optics desde entonces, Opus 4.0 en adelante, poseen una función denominada QT () que realiza todos estos análisis simultáneamente para cada espectro, e indica

si los valores de absorbancia, ruido y vapor de agua son los adecuados para que dicho espectro pueda ser analizado. Desde entonces, el test de calidad se ha adoptado como paso fundamental en el pre-tratamiento espectral.

Para determinar el valor de la señal espectral en las diferentes regiones del espectro, el software evalúa los valores que alcanzan las derivadas primeras en dichas regiones. La **Tabla 2** resume los parámetros evaluados por el software **Opus 7.0** en las diferentes regiones espectrales y contiene los valores umbrales (*thresholds*) máximos y mínimos descritos por Naumann (2000) para que un espectro obtenido de una suspensión microbiana sea incluido en una base de datos de identificación y/o caracterización (Bruker Optik, 2011). Teniendo en cuenta estos antecedentes será necesario para cada estudio en particular analizar previamente cuáles serán los límites admitidos para estos parámetros. En nuestro caso, al comenzar las investigaciones se realizaron más de 200 medidas entre muestras de medio de cultivo G1 Plus (que se empleó para cultivar los embriones) y sobrenadantes de cultivo de 3 días para establecer los límites máximos y mínimos de estos parámetros.

Tabla 2. Test de Calidad espectral (QT). Ejemplo del Test de calidad establecido para el análisis espectral de suspensiones bacterianas (**Opus 7.0**).

Parámetros	Longitudes de onda en cm ⁻¹				
	1800-1600 Proteínas	1200-900 Carbohidratos	2100-2000	1847-1837	2200-2000
ΔA mínima	0.354				
ΔA máxima	1.245				
Ruido máximo			0.00015		
Señal1 /ruido	200	40			
Señal 2/ ruido					
Vapor agua				0.0003	
Señal1/Vapor agua	100	20			
Señal 2 / vapor agua					
Fringes					5x10 ⁻³

ΔA : variación de absorbancia (absorbancia máxima –absorbancia mínima)

El cálculo de los parámetros mencionados anteriormente se realiza del siguiente modo (Bruker Optik, 2011; Lasch, 2012; Naumann 200; **Figura 9**):

(1) Variación de absorbancia máxima y mínima entre 1800 y 1600 cm^{-1} (ΔA)

Región Amida I. Esta región es donde la mayoría de las muestras biológicas tienen el máximo de absorbancia, por lo cual se considera para analizar si la cantidad de muestra utilizada fue la correcta. Se ha demostrado que la absorbancia IR cumple la Ley de Lambert y Beer entre 0.345 y 1.245 unidades de absorbancia para la mayoría de las muestras biológicas. Para evaluar este parámetro se calcula la diferencia entre el máximo y el mínimo de absorbancia registrados en el espectro (Δ absorbancia). Es el único criterio del test de calidad que se mide sobre el espectro “crudo” sin derivar.

Dado que los medios de cultivo empleados para el cultivo de embriones (por ejemplo el medio de cultivo G1 Plus), están formulados con suero humano, el principal componente es la albúmina sérica. De modo que la máxima absorbancia de los espectros de los sobrenadantes es en la región de Amida I, por lo que nosotros tomamos también el valor de ΔA de absorbancia máximos y mínimos en la región 1800-1600 (**Figura 9**).

(2) Cálculo del ruido (r)

Se calcula la diferencia entre el máximo y mínimo valor de la derivada primera de los espectros en la región 2100 a 2000 cm^{-1} . Se elige este intervalo porque en él no se registran absorbancias asociadas a moléculas biológicas o componentes de sobrenadantes de cultivo, de modo que si hay bandas presentes en esa región son debidas al ruido de base del espectrómetro. Dicha diferencia debe ser $<1.5 \times 10^{-4}$.

(3) Relación señal/ruido

Los valores de las señales, (*Señal S_1* y *Señal S_2*), se evalúan en la derivada 1^{ra} de los espectros.

Señal S_1 : la diferencia entre el máximo y el mínimo valor de la derivada primera en la región de 1800 a 1600 cm^{-1} (asignada al enlace peptídico).

Señal S_2 : la diferencia entre el máximo y el mínimo valor de la derivada primera en la región de 1200 a 900 cm^{-1} (asignada a carbohidratos). En el caso de los espectros de bacterias (para las cuales se desarrolló el QT) la absorción en la región asignada a carbohidratos es siempre más baja que la absorción en Amida I. De modo que este valor es evaluado para asegurarse que aún a bajos valores de Amida I, el valor de la señal en la región 1200-900 cm^{-1} sea válido para el análisis espectral.

Una vez que el software determina los valores de S_1 y S_2 , calcula el cociente entre estos valores y el valor del ruido (r) obtenido según el punto (2). En estudios microbianos

se ha establecido que estos cocientes deben ser mayores que 200 y 40 respectivamente (**Tabla 2**). En el caso de los sobrenadantes de cultivos de embriones, al igual que en el estudio de microorganismos, es importante evaluar la señal de los espectros en la región de carbohidratos ($1200-900\text{ cm}^{-1}$). Esta región es de significancia en nuestro estudio (asociada al metabolismo de carbohidratos) por lo que debe asegurarse que su absorbancia sea suficientemente alta para que pueda ser analizada (**Figura 9**).

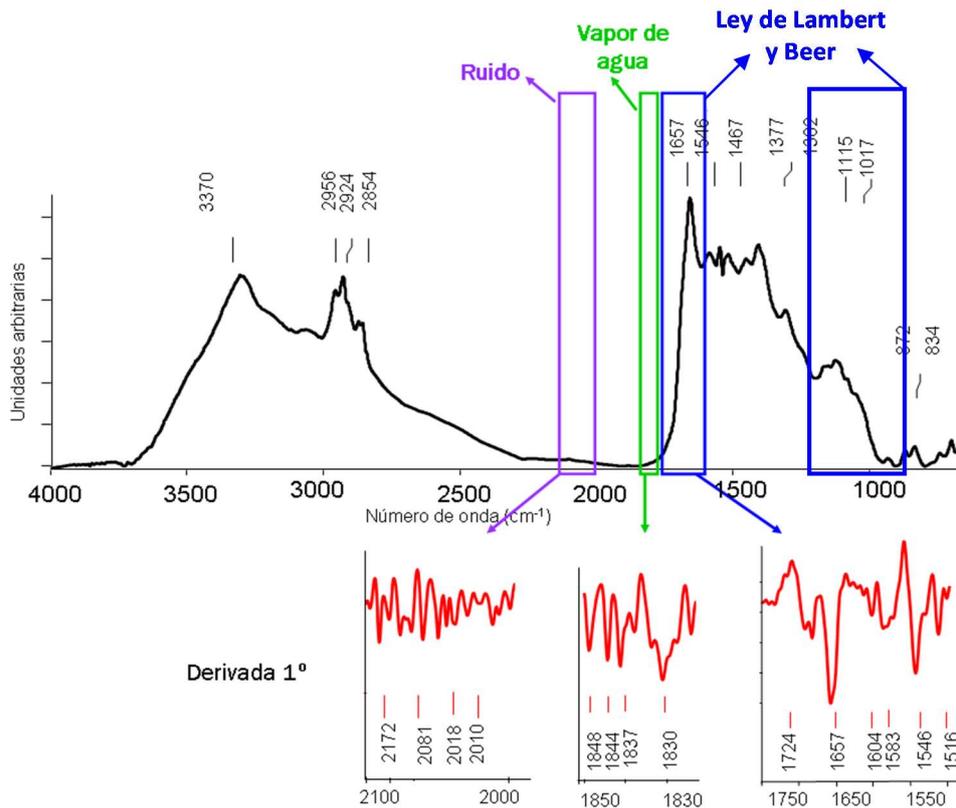


Figura 9. Espectro FTIR del medio de cultivo G1 Plus. Se indican las distintas regiones del espectro y su respectiva derivada 1^{ra} donde se determinan los parámetros del QT.

(4) Vapor de agua (va)

En los espectros FTIR se observan bandas debidas a los estados **rotacionales** del vapor de agua que surgen de la detección del vapor de agua presente en el ambiente, y por lo tanto en la cámara de lectura. La **Figura 10** muestra el espectro registrado del aire de la cámara de lectura (sin muestra alguna) aun habiendo realizado previamente un blanco. En la figura se indican las bandas debidas al estiramiento de CO_2 en la región $2365 - 2330\text{ cm}^{-1}$ y 670 cm^{-1} (intensidad variable) y bandas debidas al vapor de H_2O con

una intensidad entre 10^{-3} o 10^{-4} (dependiendo de la humedad ambiente). Las bandas debidas al CO_2 no interfieren porque en los espectros de muestras biológicas en esas regiones no se observan estiramientos ni balanceos de las principales macromoléculas. En relación a las bandas del vapor de agua para la mayoría de las aplicaciones de FTIR en la industria farmacéutica o control de calidad (donde se analiza, el número de bandas presentes, la posición de las mismas, o el cálculo de áreas o alturas de determinadas bandas), éstas no constituyen una interferencia importante. Sin embargo, su interferencia es significativa en el análisis de los espectros vibracionales de las muestras de origen biológico (Helm y Naumann, 1995; Baker y col., 2014, Lasch y Wolfgang, 2011).

Para evaluar la contribución de dichas bandas en cualquier espectro registrado se emplea la región del espectro 1847 y 1837 cm^{-1} , donde las bandas rotacionales del vapor de agua presentan un pico característico (1844 cm^{-1}), y a la vez las macromoléculas biológicas no poseen bandas vibracionales intensas (**Tabla 2, Figura 9 y 10**). La intensidad de dicha contribución en los espectros se evalúa a través de la derivada primera de los espectros calculando la amplitud de la misma en el mencionado intervalo, donde la diferencia entre el máximo y mínimo debe ser $\leq 3 \times 10^{-4}$. Si un espectro registra una señal de vapor de agua menor al valor establecido, el mismo no afectará el análisis de los resultados.

Dada la humedad ambiente que existe en esta región los valores del parámetro vapor de agua son por lo general mayores 3×10^{-4} , estos suelen ser del orden de 10^{-2} - 10^{-3} . Es por ello que hemos implementado un sistema de circulación de aire seco que purga permanentemente tanto la cámara de lectura como el detector del espectrómetro. Para alcanzar los valores de vapor de agua inferiores a los que exige el test de calidad se instaló un equipo de secado del aire (**Figura 11**). Este instrumento de secado es un sistema de adsorción que trabaja con aire comprimido, modelo HLB, que consiste en dos tubos rellenos con un tamiz molecular A4 el cual trabaja con un aire de salida que contiene 0.11g/m^3 de humedad. Dichos tubos funcionan alternativamente en ciclos de 300/600 segundos (ciclado electrónico) permitiendo el secado por temperatura del tubo que no está siendo utilizado. Se optimizó la presión de trabajo en 7 bar y a la entrada de los desecadores y el caudal del aire de ingreso al espectrómetro en 8 L/h (**Figura 11**).

comparar la derivada segunda del espectro **(a)** y el espectro de absorbancia de vapor de agua **(d)**, puede observarse la superposición de los picos de las macromoléculas de interés y las bandas del vapor de agua. Mientras que en el espectro **(d)** y su respectiva derivada segunda dichas contribuciones no se observan, ya que el espectro ha sido registrado utilizando un equipo que funciona bajo una purga de aire seco. Lo que demuestra que esta metodología permite obtener espectros cuyas señales de vapor de agua están dentro del nivel admisible para poder realizar análisis utilizando sus derivadas.

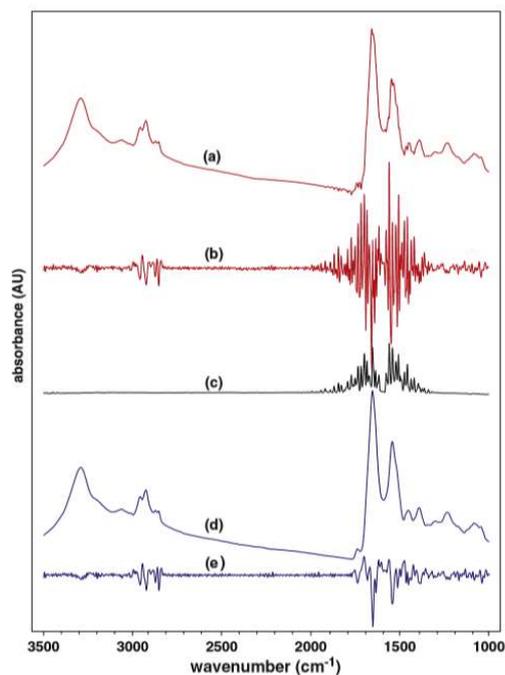


Figura 12. Corrección del vapor de agua en un espectro FTIR. (a) Espectro FTIR de la mucosa del colon humano mostrando la presencia de vapor de agua atmosférico en la región 1345-1950 cm^{-1} . (b) Derivada segunda del espectro (a). Las bandas espectrales están fuertemente superpuestas por bandas del agua. (c) Espectro de absorbancia FTIR de vapor de agua. (d) Espectro de la mucosa del colon humano corregido. (e) Derivada segunda del espectro (d). Las contribuciones espectrales del vapor de agua en el espectro (c) y su respectiva derivada segunda han sido minimizadas por medio del empleo de un sistema de corriente de aire seco en el equipo (Obtenido de Lasch, 2012).

(5) Relación señal/vapor de agua (S/v_a)

Permite comparar la relación de las señales debidas a proteínas y carbohidratos con la absorbancia del vapor de agua (S_1/v_a y S_2/v_a) de manera de asegurar que el valor de las señales son significativamente mayores al valor de las señales debidas a vapor de

agua. Para el caso de los espectros de suspensiones bacterianas se estableció que dichos valores tienen que ser mayores a 100 y 20 respectivamente (**Tabla 2**). Para el caso de los espectros de los sobrenadantes de cultivo estos valores máximos debieron ser calculados y optimizados.

(6) *Fringing*

El *fringing* es la desviación sinusoidal o “la deriva” de la línea de base provocada por problemas eléctricos en la línea del espectrómetro o por el funcionamiento del espectrómetro en sí. El *fringing* se mide a través de la amplitud de la derivada primera de los espectros, en la región donde no hay contribución de bandas de absorción de las muestras biológicas (2200 a 2000 cm^{-1}) (**Tabla 2**). Para asegurar que éste no sea una interferencia en el análisis de los datos espectrales se debe asegurar que su valor sea $< 5 \times 10^{-4}$.

(7) Cantidad de aceite (λ)

Este es un parámetro que hemos incluido nosotros para asegurarnos que los espectros que fueran incorporados al estudio no tuvieran bandas debidas al aceite que pudieran interferir en el análisis. El aceite se utiliza para cubrir los cultivos de embriones y evitar su evaporación. Este parámetro permite evaluar el contenido de aceite mineral presente en los sobrenadantes de cultivo de embriones a través de la intensidad de las señales presentes en la región de lípidos. Se definió como la relación de las intensidades $\lambda = I_{2930} / I_{1654}$, donde I_{2930} representa la altura del pico 2930 cm^{-1} (estiramiento $-\text{CH}_2$ asignado al contenido de lípidos) e I_{1654} la altura del pico 1654 cm^{-1} (estiramientos $\text{C}=\text{O}$, $\text{C}-\text{N}$ y balanceos $\text{N}-\text{H}$ de la banda Amida I asignado a proteínas). Se registraron espectros de medio de cultivo G1 Plus con el agregado de distintas proporciones de aceite mineral y se evaluó la variación de la intensidad de las bandas en la región de lípidos. Considerando más de 100 espectros de sobrenadantes de cultivo con aceite mineral pudimos establecer un valor límite para este parámetro.

Teniendo en cuenta los parámetros pre-establecidos para el estudio de microorganismos (**Tabla 2**), se calcularon los valores límites máximos y mínimos para las señales, el ruido, el vapor de agua y el contenido de aceite para nuestro sistema de estudio. Para ello como se mencionó anteriormente se emplearon más de 200 espectros de medio G1 Plus y de sobrenadantes de cultivo de embriones.

Una vez confeccionada la tabla del QT para nuestro sistema, la misma fue incorporada al software de manera de testear todos los espectros registrados. Los espectros que superaron el test de calidad desarrollado fueron considerados dentro del estudio y los espectros que por algún motivo, tal como valores más altos o más bajos de absorción en Amida I, valores altos de vapor de agua o valores de ruido fuera de los límites establecidos, no superaron el QT fueron descartados.

3.2 Normalización

El principal requisito cuando se comparan una serie de espectros FTIR es que todos ellos deben ser registrados para la misma cantidad de muestra. Sin embargo, en muchos casos esto es variable, por lo general debido a errores experimentales involuntarios. De modo que para compensar estos errores se lleva a cabo una normalización (Baker y col., 2014).

Existen diversos métodos de normalización, entre ellos el que realiza la mayoría de los software es la *Normalización máxima*. Esta consiste en igualar la absorbancia de los espectros que se van a normalizar en alguna banda en particular (por lo general Amida I). Sin embargo, el software de Bruker Optics (en cualquiera de sus versiones) realiza otro tipo de normalización como la *Normalización Vectorial*. Para llevarla a cabo primero calcula el valor promedio de y del espectro considerado. Este valor de y promedio es restado al espectro, de modo que el centro del mismo es llevado a $y=0$. Luego calcula la suma de los cuadrados de todos los valores de y para luego dividir el espectro por la raíz cuadrada de dicha suma. Este método arroja un nuevo espectro que sin modificar las alturas relativas de las bandas tiene la característica de **que la suma de todos los valores de absorbancia al cuadrado es igual a 1** (Bruker Optik, 2011; Lasch y Wolfgang, 2011; Lasch, 2012).

3.3 Corrección Multiplicativa de la Señal Extendida (Extended Multiplicative Signal Correction- EMSC)

El punto de partida de las técnicas de pre-procesamiento basadas en métodos de modelado se iniciaron con el desarrollo de la Corrección Multiplicativa de la Señal (Multiplicative Signal Correction -MSC). El método fue diseñado originalmente para espectroscopía infrarroja-cercana (NIR) aplicada en estudio sobre alimentos. Inicialmente

el término MSC fue usado como una abreviación de Corrección Multiplicativa de la Dispersión, pero luego al entender que éste puede servir como una herramienta genérica para el pre-procesamiento, se introdujo el término Corrección Multiplicativa de la Señal. Asimismo con posterioridad se extendió y aplicó al campo de la espectroscopía FTIR, debido a la flexibilidad que aporta y a que permite la corrección de varios tipos de dispersión y otros efectos no deseados. A partir de ese momento se lo denominó Corrección Multiplicativa de la Señal Extendida (EMSC).

Este método de pre-procesamiento funciona siempre que haya diferencias despreciables entre la referencia y el espectro corregido o, alternativamente, si el análisis de regresión se lleva a cabo en una región carente de información química y, por lo tanto, sólo influenciada por la dispersión de la luz. (Afshet y Kohler, 2012; Malek y col., 2014).

EMSC demostró ser una herramienta confiable para perfeccionar efectos de línea de base aditivos, efectos multiplicativos de escala y efectos de interferencia. Esta técnica se ha utilizado para corregir el grosor/cantidad (thickness) de muestra, vapor de agua, dióxido de carbono, temperatura de las muestras y concentración de sales.

La ventaja que presentan las técnicas de pre-procesamiento basadas en métodos de modelado sobre las otras técnicas es que permiten cuantificar y separan los diferentes tipos de variaciones químicas y físicas en los espectros, lo cual permite el estudio de estos efectos de manera separada (Afshet y Kohler, 2012; Kohler y col., 2010).

3.3 Aumento de resolución espectral

Como ya se mencionó los espectros IR poseen información de la totalidad de la composición química de la muestra que se está analizando. Debido a la gran diversidad de componentes que forman parte de las muestras biológicas, los espectros constituyen una superposición de picos que dan como resultado unas pocas bandas anchas (ver **Figura 17**, Introducción). Esto hace sumamente difícil el entendimiento y análisis de la información contenida en ellos. Para poder aumentar la resolución de dichas bandas anchas y poder analizar los picos que las componen, al menos parcialmente, la estrategia más empleada en espectroscopía IR es la obtención de derivadas (Lasch, 2012; Naumann, 2000). A través de la **derivada primera** se obtiene un primer aumento de resolución. Al igual que en una función matemática la derivada primera registra los cambios de pendiente a lo largo de la curva y *se hace nula en los máximos y mínimos*. La **derivada segunda** por su parte *muestra un mínimo por cada máximo* encontrado en la curva. Ésta

además de dar un patrón de bandas con mayor información que la derivada primera, muestra la posición exacta de los picos que componen las bandas. El análisis detallado de la derivada segunda permite conocer a la composición química de las muestras a través de las posiciones de los picos (Malek y col., 2014).

El análisis de los espectros a través de las derivadas, además de enriquecer el análisis espectral mostrando un mayor número de picos dentro de las bandas anchas, nos permite independizarnos de los problemas de corrimiento de la línea de base. Sin embargo, este tipo de pre-procesamiento sólo se puede aplicar a espectros que tengan una alta relación señal/ruido (Lasch, 2012; Lasch y Wolfgang, 2011; Wenning y Scherer, 2013).

Para la obtención de las derivadas de un espectro, el algoritmo más aplicado es el desarrollado por *Savitzky y Golay* (1964) que simultáneamente deriva y suaviza los espectros (*smooths*), permitiendo aumentar la resolución por la derivada y disminuir el ruido mediante el suavizado.

En este trabajo se aplicaron ambas derivadas sobre todos los espectros registrados. La primer derivada se obtuvo para establecer la calidad espectral y medir los valores de las señales y las relaciones señal:ruido. La segunda derivada, fue calculada para analizar la posición de los picos dentro de las bandas anchas a fin de estudiar la composición química de los sobrenadantes de cultivo, y como estrategia para aumentar la resolución de las bandas y obtener un “*pattern*” más rico en información que los espectros crudos.

3.4 Sustracción espectral

Las muestras de sobrenadante de cultivo de embriones fueron tomadas de una gota de cultivo que tal como se mencionó anteriormente, se encontraba cubierta con aceite mineral para evitar la evaporación. La extracción de 40-30 μL de sobrenadante de cultivo contenía por lo tanto en muchos de los casos, una fracción de aceite que produce distorsiones en el espectro FTIR de los sobrenadantes de cultivo de embriones.

En los espectros de sobrenadantes de cultivo que mostraban una importante contribución de aceite, evaluada a través del factor λ descripto anteriormente, se analizó la posibilidad de eliminar este contaminante de los espectros mediante la estrategia matemática de sustracción espectral (Lasch, 2012).

Los principios básicos de la sustracción espectral incluyen, primero obtener un espectro de alta calidad (alta relación señal/ruido) del contaminante puro. Luego,

basándose en parámetros espectrales seleccionados del contaminante en el espectro de la muestra, se determina un factor de ponderación. A continuación se lleva a cabo la corrección espectral, restando el espectro del contaminante puro multiplicado por el factor de ponderación del espectro de interés (Lasch, 2012).

4 Generación de identificadores de espectros

Para facilitar el análisis de los resultados se decidió incluir en el nombre de los espectros de los sobrenadantes de cultivo algunas características adicionales al nombre identificador de la pareja (ID) y el número de embrión (embrión 1: 1, embrión 2: 2, etc.). Incluimos entonces en el nombre de cada espectro datos tales como: i) la morfología del embrión, ii) el día de registro del espectro (los registros de espectros de un mismo día corresponden a un único pack, registros de diferentes días tienen números de pack diferentes), iii) los días de cultivo del embrión (D3: 3 días de cultivos, D5: 5 días de cultivo), iv) el destino del embrión (T: transferido, N: no transferido), v) el lote de medio de cultivo utilizado. En caso que correspondiera al espectro control se indicaba como “BLA”, (Figura 13).

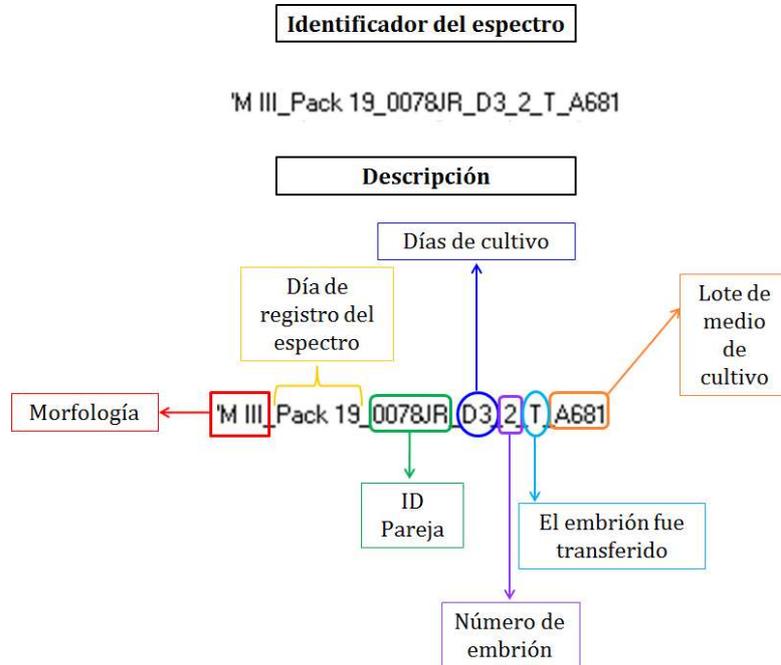


Figura 13. Descripción del identificador de un espectro de sobrenadante de cultivo de embrión.

5 Librería espectral

La librería espectral es una base de datos donde se almacenan los espectros, sus derivadas primeras y segundas normalizadas, ordenadas de manera que sea posible disponer de ellos de forma rápida y sencilla. Una vez registrados y pre-procesados todos los espectros fueron almacenados en una librería espectral, agrupados y clasificados en carpetas para facilitar estudios quemométricos.

La librería desarrollada a lo largo de este trabajo incluyó espectros de medio de cultivo, aceite mineral puro y sobrenadantes de cultivo de embriones.

Todos los espectros registrados fueron almacenados en la computadora agrupados por carpetas

GRUPO A

Se almacenaron en este grupo los espectros de diferentes lotes de medio de cultivo, cultivos controles y aceite utilizados a lo largo de todo el proyecto.

GRUPO B

Corresponde a los espectros de sobrenadante de cultivo de embriones registrados durante la totalidad del estudio. A partir de los cuales se generaron dos subgrupos.

GRUPO B1

Incluyó los espectros de sobrenadante de cultivo de embriones de 3 días de desarrollo que **fueron transferidos a la madre, criopreservados o transferidos a otro medio de cultivo** para prolongar la incubación 2 días más.

Dentro de este grupo se construyeron 4 carpetas en las que se agruparon los espectros según la morfología observada por microscopía (Clases I a IV).

GRUPO B2

Incluyó los espectros de sobrenadante de cultivo de embriones **que fueron transferidos** y dentro de este grupo se clasificaron de acuerdo a su resultado de implantación.

Dentro de este grupo se agruparon 3 clases de acuerdo al resultado de implantación (los que implantaron todos los embriones transferidos, los que de los dos

embriones transferidos implantó uno solo pero no es posible identificar cual, los que no implantaron ninguno de los dos embriones transferidos).

6 Análisis de los espectros para caracterización y construcción de modelos de discriminación

Los estudios de clasificación, diferenciación e identificación, así como también los análisis cualitativos, se realizaron utilizando diferentes herramientas computacionales:

- **Opus**, Bruker Optics, Alemania: en diferentes versiones.
Opus 4.5 (para windows NT) que incluye los paquetes IDENT (para Análisis de Clusters y construcción de bibliotecas) y el paquete QUANT (para análisis multivariante cuantitativo).
Opus 7.0 (para Windows NT), software con el cual se registraron los espectros IR y se realizaron las técnicas de pre-procesamiento, determinaciones de posición de bandas. Incluye también los paquetes que permiten realizar Análisis de Cluster y Análisis Factorial.
- **NeroDeveloper®**, desarrollado por Synthon Analytics, Heidelberg, Alemania para la creación de modelos basados en redes neuronales artificiales.
- **PyChem**, software de uso libre que incluye las herramientas para el estudio espectral por medio de Análisis de Cluster, Componente Principal, entre otros.
- **MATLAB** (versión R 2015a). Los códigos fueron desarrollados por el grupo de Bioespectroscopía de la Universidad de Ås, Noruega, a cargo del *Dr. Achim Kohler*. Estos permiten aplicar correcciones a los espectros por metodologías EMSC, y realizar análisis de tipo Componente Principal, Mínimos Cuadrados Parciales.
- **OMNIC 7**, (Thermo Scientific), permite la recopilación de datos, visualización, procesamiento y herramientas de análisis
- **The Unscrambler® X** (CAMO Software), permite la calibración y desarrollo de modelos predictivos en espectroscopía.

6.1 Estudio y análisis de los espectros

Como se mencionó anteriormente se denomina **quemometría** la aplicación de métodos estadísticos y/o matemáticos a los espectros para poder obtener de manera eficiente la información contenida en los mismos. Los espectros FTIR pueden ser estudiados mediante la aplicación de dos grandes estrategias, los métodos univariantes o métodos multivariantes.

6.1.1 Análisis Univariante

6.1.1.1 Análisis de bandas espectrales

Mediante este tipo de análisis se realizó el estudio y caracterización de los componentes de los medios cultivos empleados, y de las principales macromoléculas y metabolitos secundarios presentes en los sobrenadante de cultivo de embriones.

Este análisis se basa en identificar dentro de los espectros picos o bandas características, variaciones en la posición de alguna banda característica o identificación de picos o bandas de absorbancia de interés relacionadas a un grupo químico en particular. Para este tipo de estudio se utilizó principalmente el software **Opus 7.0** de Bruker Optics el cual permite la localización de picos en las bandas espectrales a través de la derivada segunda de los espectros. La asignación de picos o bandas a grupos funcionales se realizó luego en base a datos bibliográficos.

6.1.2 Análisis multivariantes por reconocimiento de *patterns*

El estudio de los espectros por reconocimiento de *patterns* se basa en considerar los espectros FTIR como complejos *fingerprints* que pueden ser diferenciados mediante diversas técnicas informáticas de análisis multivariante. Para llevar a cabo estos estudios se emplearon los espectros como tales, sus derivadas primeras y sus derivadas segundas normalizadas.

6.1.2.1 Análisis de Cluster

El análisis de cluster es una de las técnicas quemométricas más sencillas, cuyo principal objetivo es establecer similitudes y disimilitudes entre los espectros y

representar dichas diferencias mediante dendrogramas que agrupan los más semejantes en categorías o *clusters*. Estas distancias pueden calcularse por diferentes algoritmos, en particular en este trabajo las medidas de similitud fueron obtenidas por el cálculo del Coeficiente de Correlación de *Pearson*, distancia Euclideana (Standard) y Normal to replevel.

La metodología más ampliamente utilizada es el coeficiente de correlación de *Pearson*, en este se minimiza la heterogeneidad espectral al dividir la distancia por la desviación estándar residual normalizada:

$$r_{jk} = \frac{\left(\sum_{i=1}^n x_{ji}x_{ki}\right) - n\bar{x}_j\bar{x}_k}{\sqrt{\left(\sum_{i=1}^n x_{ji}^2 - n\bar{x}_j^2\right)\left(\sum_{i=1}^n x_{ki}^2 - n\bar{x}_k^2\right)}}$$

Donde r_{jk} es el coeficiente de correlación, x_{ji} representa el espectro, x_{ki} representa el espectro a comparar y n es el número total de los espectros. Para dos espectros muy similares el $r_{jk} \approx 1$ (es decir, la distancia ≈ 0), mientras que para los espectros completamente diferentes este valor se aproxima a 0 (es decir, la distancia es grande). Posteriormente, los dos espectros más similares se fusionan en un "cluster", y se calcula una nueva matriz de distancia para el nuevo grupo y todos los espectros existentes. El proceso de fusión de espectros en nuevos grupos se repite, y la matriz de distancia se recalcula hasta que todos los espectros se han combinado en unos pocos grupos. El objetivo es lograr que la varianza intra-clase sea la menor posible, mientras que la varianza inter-clase sea máxima. Todos los objetos pertenecientes a un *cluster* poseen la mayor similitud, mientras que los que pertenecen a distintos *cluster* son los más diferentes posible (Naumann, 2000).

Una vez calculadas las distancias y agrupados ya los espectros por similitud existen diferentes algoritmos que nos permiten representar gráficamente esas diferencias en un diagrama denominado **dendrograma**. Este consiste en una representación en forma de árbol que muestra los datos en categorías, grupos o *clusters*. En este trabajo para obtener dicha representación se aplicaron 2 tipos de algoritmos: el *algoritmo de Ward* que muestra la distribución de los clusters en función de la heterogeneidad de los espectros y *Average linkage* que muestra dicha distribución en función de la distancia espectral (Malek y col., 2014).

Los AC pueden realizarse teniendo en cuenta dos enfoques, no supervisados y supervisados.

6.1.2.1.1 Análisis de cluster no supervisado

Previamente a realizar los estudios de discriminación de sobrenadantes de cultivo de embriones se llevaron a cabo estudios de variabilidad de los medios de cultivo. Se cuantificó la variabilidad de los medios de cultivo en los distintos lotes a lo largo de los 4 años de investigación empleando AC no supervisado.

1- Sobre los espectros almacenados en la base de datos GRUPO A (contiene los espectros de los medios de cultivo G1 Plus y G2 de distintos lotes) se realizó el pre-tratamiento espectral (derivada y normalización).

2- Para el cálculo de la distancia espectral del conjunto de espectros se empleó la metodología propuesta por Rebuffo y col. (Rebuffo y col., 2006). Se tomaron todas las derivadas de los espectros normalizadas se analizaron en todas las ventanas espectrales independientemente y todas juntas para observar si existía variabilidad en la composición de carbohidratos ($1200-900\text{ cm}^{-1}$), proteínas ($1800-1500\text{ cm}^{-1}$) o lípidos ($3000-2800\text{ cm}^{-1}$). La variabilidad o varianza dentro de la población se midió a través de la distancia espectral media (\overline{D}) más o menos dos veces la desviación de la distancia espectral (σ) ($\overline{D} \pm 2\sigma$), que es una medida de la disimilitud. D es igual a $(1-r) \times 1000$ y r es el coeficiente de correlación de *Pearson* (Bosch y col., 2008; Kohler y col., 2105; Rebuffo y col., 2006).

3- Las matrices de correlación obtenidas se emplearon para construir dendrogramas aplicando el algoritmo *Average Linkage*. Los valores de fusión obtenidos para los dendrogramas generados se correspondieron con las distancias espectrales indicativas de las varianzas entre los espectros.

6.1.2.1.2 Análisis de cluster supervisado

El procedimiento para realizar un AC **supervisado** es el siguiente (ver esquema de trabajo en la **Figura 15**):

1- Se clasifican primeramente los espectros de la base de datos en las clases o grupos que se desean discriminar. Por ejemplo en el estudio que se realizó sobre la

discriminación de los embriones por su morfología, los espectros de los sobrenadantes de cultivo almacenados en la librería espectral en el *GRUPO B1*, fueron clasificados primeramente en 4 clases según si provenían de embriones con morfología I, II, III o IV. En el caso del estudio de discriminación entre espectros que provenían de embriones que implantaban de los que no implantaban primeramente se clasificaron los espectros en dos clases, los que provenían de embriones que implantaron de los que no implantaron (*GRUPO B2* de la librería espectral).

2- Se cargan los espectros, sus derivadas primeras y segundas empleando el software **Opus 7.0** (Bruker Optics) coloreando con diferentes colores cada clase de manera de poder diferenciarlos en la pantalla de la computadora.

3- Se analizan primero los espectros, luego las derivadas primeras y por último las derivadas segundas. Se busca en ellos las principales diferencias entre los grupos de espectros a analizar. Para ello se analiza de manera visual qué ventanas o regiones espectrales contienen las mayores diferencias entre dichas clases, es decir qué ventanas espectrales contienen la menor varianza entre los espectros de la misma clase, y la máxima varianza entre los espectros de diferente clase. A modo de ejemplo en la **Figura 14** se indica una comparación entre derivadas primeras de dos clases de espectros (derivadas primeras de espectros una clase en rojo y las derivadas primeras de los espectros de la otra clase en azul). En amarillo se indican las ventanas espectrales que se seleccionaron donde las diferencias entre las derivadas de una misma clase fueron mínimas y las diferencias entre clases fueron máximas

4- Se emplean dichas regiones espectrales para calcular el coeficiente de *Pearson*, distancia Euclídeana (Standard) o Normal to replevel y poder establecer matemáticamente la disimilitud entre los grupos o espectros comparados.

5- Se construye el dendrograma que mostrará dichas diferencias o disimilitudes. Como se mencionó anteriormente, éste puede ser representado utilizando el *algoritmo de Ward* o *Average linkage*.

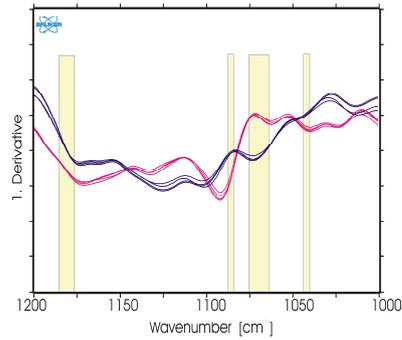


Figura 14. Ejemplo: diferenciación entre dos clases de espectros. Las zonas amarillas son las zonas donde la varianza entre los replicados de las derivadas de los espectros de cada tipo de muestra (espectros rojos o espectros azules) son mínimas y las diferencias entre las clases son máximas.

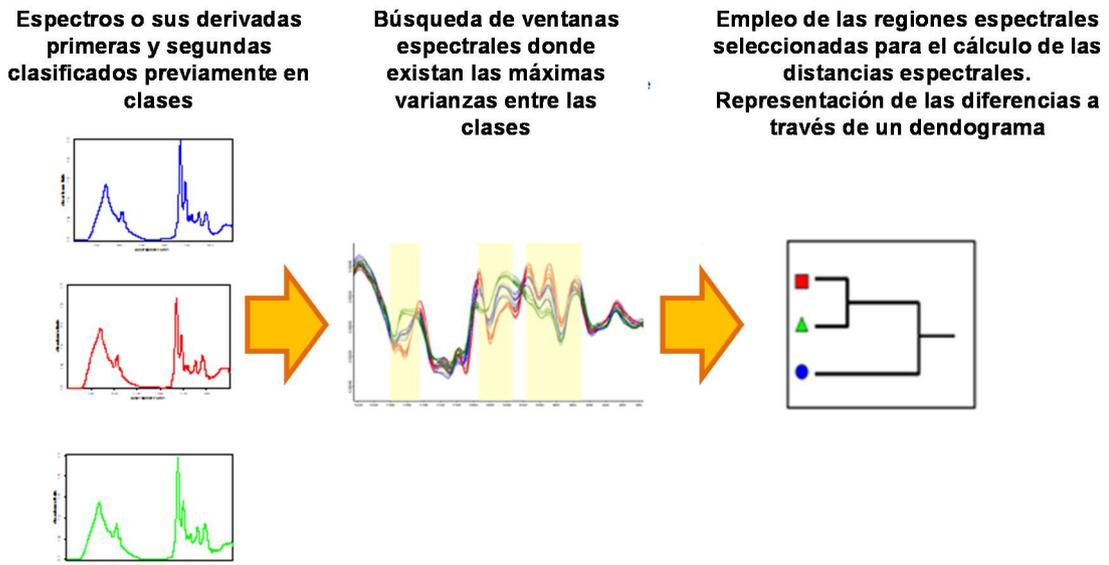


Figura 15. Esquema del procedimiento para el análisis de cluster supervisado. Paso 1- clasificación de los espectros, Paso 2- carga de espectros y sus derivadas, coloreo de espectros según el grupo al que pertenezcan, Paso 3-búsqueda de diferencias entre los grupos, Paso 4-cálculo de AC por diferentes metodologías, Paso 5- construcción del dendrograma.

6.1.2.2 Redes Neuronales Artificiales (RNAs)

Las redes neuronales artificiales son modelos computacionales inspirados en los principios "de organización" utilizados en el ser humano. Estos sistemas de cálculo se

asemejan a las redes neuronales biológicas al utilizar nodos (neuronas) interconectados. Estos nodos reciben la información, realizan operaciones sobre los datos y transmiten sus resultados a otros nodos. En los sistemas de RNA el conocimiento es adquirido por la red por un proceso de aprendizaje y luego la fuerte conexión entre las neuronas guarda esa información adquirida (Dayhoff y DeLeo 2001; Ozaki y Murayama 2001).

Las RNA se utilizan como aproximadores universales, capaces de adaptar cualquier función continua, lineal o no lineal, entre variables independientes y dependientes. Consisten básicamente en *inputs* (como sinapsis), que se multiplican por pesos/importancia (weights). Si el peso es alto, entonces el *input* será fuerte. Mediante el ajuste de los pesos podemos obtener el *output* (salida) que queremos para *inputs* específicos. Pero cuando tenemos una RNA de cientos o miles de neuronas, sería bastante complicado encontrar manualmente todos los pesos necesarios. Para ello se cuenta con algoritmos que pueden ajustar los pesos de las RNAs para obtener la salida deseada. Este proceso de ajustar los pesos se llama aprendizaje o entrenamiento. El entrenamiento comienza con pesos al azar, y la meta es ajustarlos para que el error sea mínimo.

Entre las arquitecturas o patrones de conexión que pueden adoptar, uno de los más empleados son los basados en perceptron multicapa (Multilayer Perceptron-MLP) (**Figura 16**). Éstas son redes neuronales de tres capas (capa de ingreso, capa oculta, capa de salida) totalmente conectadas, que se re-alimentan (*feedforward*: la modificación o control de un proceso se realiza utilizando los resultados o efectos previos). Esto significa que la salida de cada *input* y neurona oculta distribuye a todas las neuronas en la siguiente capa (**Figura 16**). La arquitectura de las redes neuronales puede ser variable (pueden tener diferente número de capas ocultas) pero todas ellas tienen una capa de entrada y una capa de salida. Cuando hay más de una capa oculta, la salida de cada una se introduce en la siguiente capa.

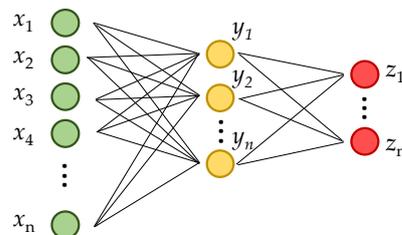


Figura 16. Estructura de *Multilayer Perceptron*. En este caso la RNA consta de una capa de ingresos (x_n), una interna (y_n) y una de salida (z_n).

Para llevar a cabo el proceso de aprendizaje hay diferentes alternativas, una de ellas es emplear el algoritmo de *Back propagation*. Este algoritmo calcula la magnitud del error entre las respuestas experimentales y predichas, a continuación optimiza los parámetros y vuelve a generar una RNA. El procedimiento se repite hasta que se alcanza la convergencia, es decir que se logra un nivel de error bajo. Las RNA que implementan este tipo de algoritmo tienen pocas capas, ya que el tiempo de entrenamiento crece exponencialmente (Gupta, 2013; Udelhoven y col., 2003).

El software *NeuroDeveloper*[®] (Synthon, Heidelberg, GmbH) fue la herramienta elegida en este trabajo para realizar el estudio de discriminación por RNA. Éste consta de cuatro módulos especializados, cada uno diseñado con la finalidad de desarrollar el procedimiento de clasificación más sencillo para el operario. El estudio comienza con el *FeatureDeveloper* que ofrece una visualización fácil de los espectros crudos, en esta etapa se emplean métodos altamente sofisticados para la selección de longitudes de onda y compresión que permitirán obtener mejores algoritmos de clasificación. Luego, empleando los espectros pre-procesados el *NeuroSimulator* realiza un entrenamiento de redes neuronales artificiales basadas en estructuras definidas por el usuario. El desarrollo de redes neuronales modulares y organizadas jerárquicamente de cualquier grado de complejidad se lleva a cabo en el *ModuleDeveloper*. Posteriormente, la evaluación de nuevos datos por las RNA construidas y el uso de redes jerárquicas se logra mediante el módulo de *Classification*, que ofrece una documentación completa a través de impresiones y archivos de registro (**Figura 17**) (Udelhoven y col., 2003, The NeuroDeveloper[®] 2.5 Manual, 2014).

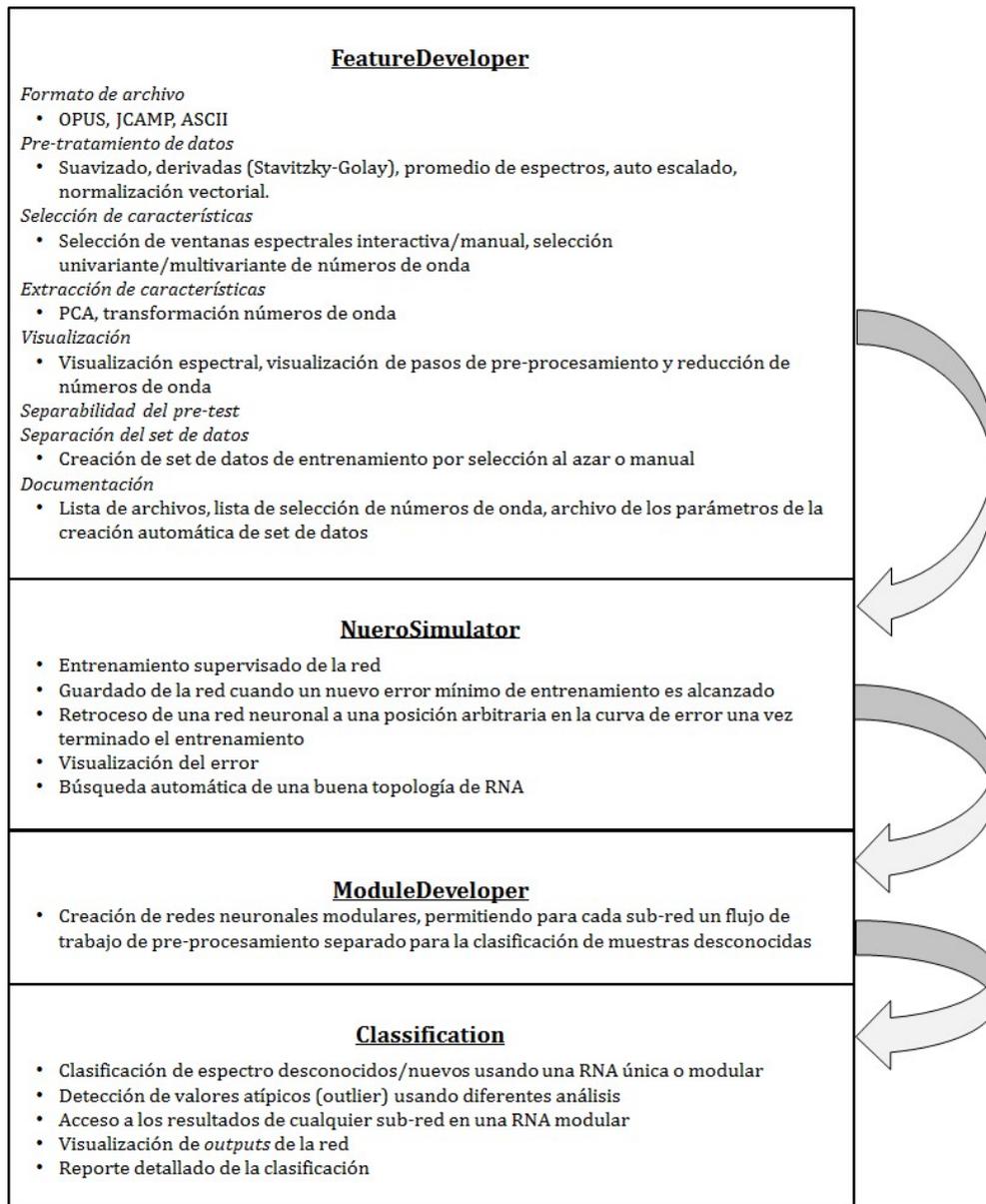


Figura 17. Esquema general de los módulos del software *NeuroDeveloper*[®] (The *NeuroDeveloper*[®] 2.5 Manual, 2014).

Teniendo en cuenta los módulos que ofrece el software *NeuroDeveloper*[®] el esquema de trabajo para el entrenamiento y validación de las redes fue el siguiente (Figura 18):

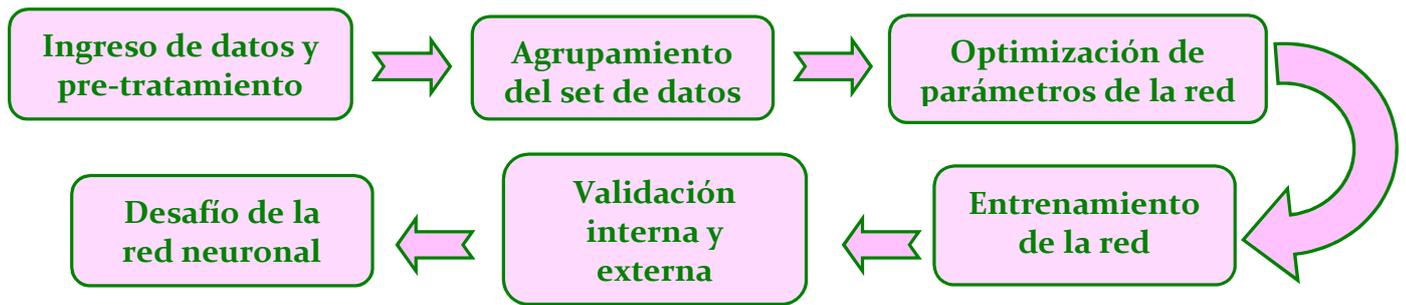


Figura 18. Esquema general de trabajo para el entrenamiento y validación de las RNAs.

Clasificación de los datos de ingreso: Los datos de ingreso lo constituyen los espectros de los sobrenadantes de cultivo de embriones previamente clasificados en la librería espectral del *GRUPO B2* por su potencial de implantación (produjo implantación, no produjo implantación). Dentro de cada grupo los datos fueron reagrupados del siguiente modo:

Set de entrenamiento: Se eligieron al azar 70 % de los espectros para ser empleados para el entrenamiento y validación interna. De modo que dentro de este grupo se armaron dos carpetas, una con el 80% de los espectros para ser empleados para el entrenamiento de la red (*training set*), y la otra con el 20% restante se empleará en un la validación interna (*test set*).

Set de validación externa: comprendió el 30 % restante. Estos espectros se reservaron para llevar a cabo la validación externa

En todos los espectros de todas las carpetas se realizan los procedimientos de pre-tratamiento, obtención de derivadas segundas y normalización (global o respecto alguna ventana en particular). Luego se seleccionan ventanas espectrales.

Optimización de parámetros de la red neuronal: Para cada estudio realizado se llevó a cabo una optimización del número de niveles jerárquicos de la red, del número de capas ocultas (topografía de la red), este software utiliza RNA con arquitecturas del tipo *Multilayer Perceptrons* con el algoritmo de entrenamiento *Resilient propagation (Rprop)*. Los parámetros de la red fueron optimizados teniendo en cuenta el error mínimo (SSE) calculado en cada paso (**Figura 19**).

Validación de las RNAs: Con el 30 % de los espectros que se no fueron utilizados en el entrenamiento de la RNA se llevó a cabo la **validación externa**. La clasificación obtenida fue luego validada mediante dos técnicas: “winner takes all” (WTA) y la regla 402040.

La habilidad de las RNAs para aprender automáticamente de los ejemplos las hace atractivas y emocionantes. En lugar de seguir un conjunto de reglas especificadas por expertos, parecen aprender reglas subyacentes del conjunto de datos representativo de la población. Esta es una de las principales ventajas de las redes neuronales sobre los sistemas tradicionales de clasificación.

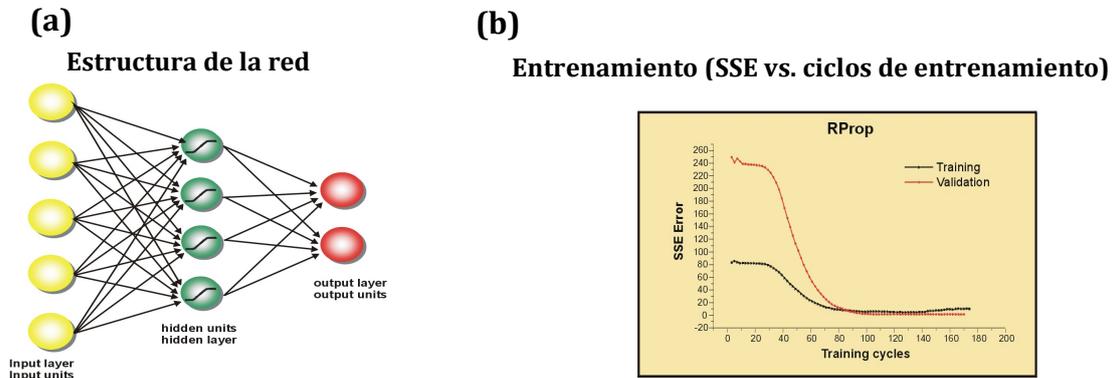


Figura 19. (a) Estructura de la red neuronal artificial. **(b)** Gráfico de determinación del error mínimo.

6.1.2.3 Análisis de datos por métodos no supervisados

Los métodos multivariantes no supervisados tienen como objetivo encontrar una agrupación en una nube de datos no clasificados previamente.

En contraposición a los métodos supervisados, la mayoría de los métodos de modelado estadístico clásicos, imponen un mínimo de presunciones distributivas y de requisitos de independencia, la idea es *“dejar que los datos hablen por sí mismos”* (Kohler y col., 2008).

La aplicación de métodos multivariantes no supervisados se puede llevar a cabo, por Análisis Factorial (AF) y Análisis de Componente Principal (ACP), los cuales nos permiten analizar *un solo tipo de datos*, en este caso los espectros FTIR. Dentro de los estudios más complejos podemos citar el análisis de Mínimos Cuadrados Parciales (Partial Least Squares-PLS), que permite encontrar y revelar las principales covarianzas dentro de *dos grupos de datos* (un grupo constituido por espectros FTIR y otro compuesto por las características registradas de los pacientes y los embriones).

La aplicación y estudio de las metodologías de análisis no supervisados de tipo AF, PCA y PLS se realizaron bajo la guía y entrenamiento del Dr. Achim Kohler y su

grupo de especialistas, en un primer momento vía Skype y luego mediante una estadía de dos meses que realicé en su laboratorio en el Departamento de Matemáticas y Tecnología, de la Universidad de Ås, Noruega.

6.1.2.3.1 Análisis de un solo conjunto de datos

Cuando se recoge la información de un conjunto de datos, lo más frecuente es tomar el mayor número posible de variables. Sin embargo, si tomamos demasiadas variables sobre un conjunto de objetos, tendremos que considerar un gran número de posibles coeficientes de correlación. Otro problema que se presenta es la fuerte correlación que muchas veces se presenta entre las variables: si tomamos demasiadas variables, puede que estén relacionadas o que midan lo mismo bajo distintos puntos de vista. Es por ello que se hace necesario reducir el número de variables. Es importante resaltar el hecho de que el concepto de mayor información se relaciona con el de mayor variabilidad o varianza. Cuanto mayor sea la variabilidad de los datos (varianza) se considera que existe mayor información (Tusell, 2012).

6.1.2.3.1.1 Análisis de Componente Principal (ACP)

Como se dijo anteriormente el ACP empleado como método no supervisado es **exploratorio, o de clasificación objetiva**. Busca describir la estructura de los datos espectrales sin un conocimiento o clasificación previa de las muestras.

Para estudiar las relaciones que se presentan entre p variables correlacionadas (que miden información común) este tipo de análisis utiliza una transformación ortogonal. Convierte el conjunto original de variables en otro conjunto de nuevas variables no correlacionadas entre sí (que no tengan repetición o redundancia en la información), llamado conjunto de componentes principales (CP). Las nuevas variables son combinaciones lineales de las anteriores, y se van construyendo según el orden de importancia en cuanto a la variabilidad total que recogen de la muestra (Li y Wang, 2014; Kohler y col., 2015). Es decir, los CP se ordenan de tal manera que el primer CP da cuenta de la varianza principal, mientras que el segundo contiene la segunda variación, y así sucesivamente. Cada CP se relaciona con un patrón de variación de muestra independiente y un patrón de variación variable independiente, que puede representarse

en gráficos de *scores* y correlaciones de *loading*, respectivamente (**Figura 20**) (Kohler y col., 2015).

De modo ideal, se buscan $m < p$ variables que sean combinaciones lineales de las p originales y que estén no correlacionadas, recogiendo la mayor parte de la información o variabilidad de los datos. El ACP es una técnica matemática que no requiere la suposición de normalidad multivariante de los datos, aunque si esto último se cumple se puede dar una interpretación más profunda de las componentes.

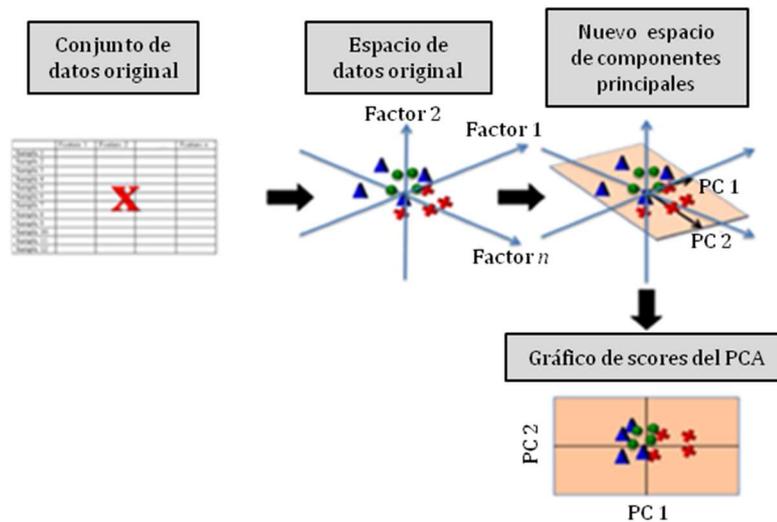


Figura 20. El ACP se aplica al "conjunto de datos original" (arriba a la izquierda). El algoritmo gira el espacio de datos original (centro superior) en un "nuevo espacio de componentes principales" (arriba a la derecha), como los nuevos ejes; aquí PC1 y PC2 corresponden a la dirección de mayor varianza calculada a partir de los datos. En este ejemplo, el "gráfico de scores del PCA" (abajo a la derecha) representa un plano bidimensional que normalmente permite extraer conclusiones cualitativas sobre la separación de las muestras.

Este análisis puede ejecutarse utilizando diferentes algoritmos como la *descomposición de valores singulares* (singular value decomposition-SVD) o los *mínimos cuadrados parciales no iterativos* (non-iterative partial least squares-NIPALS).

Los software **PyChem** y **MATLAB** fueron las herramientas disponibles en este trabajo para realizar el estudio de discriminación por ACP.

- Los procedimientos involucrados para el ACP en el Software **PyChem** incluyeron:

1- Los espectros en formato .0 (Opus 7.0) se convirtieron en formato .CVS, para esto se debió recurrir al software *OMNIC 7* (Thermo Fisher Scientific).

2- La carga de los datos en **PyChem** se realiza en dos pasos, primero se importan las absorbancias espectrales registradas para los espectros y posteriormente los números de onda de la región espectral.

3- Selección de las regiones espectrales para el análisis.

4- El pre-tratamiento que dispone el software permite realizar una derivada con diferentes filtros y una normalización vectorial.

5- El software dispone de diferentes opciones para realizar el cálculo del ACP, ya sea por SVD o NIPALS.

➤ Los pasos involucrados para analizar el ACP en el Software **MATLAB** incluyeron:

1- Los espectros en formato .0 (Opus 7.0) se convirtieron en formato *saisr*, para esto se debió recurrir al software *The Unscrambler® X* (CAMO Software). De todos los espectros se genera un único archivo que incluye las absorbancias, números de onda y nombres de los espectros.

2- Para la carga de los espectros se incorpora en los códigos Matlab la ubicación donde se almacenó el archivo generado en el paso 1.

3- Selección de las regiones espectrales para el análisis.

4- El pre-tratamiento incluye la aplicación del método EMSC y la derivada segunda normalizada.

5- Los códigos MATLAB fueron desarrollados en base al algoritmo NIPALS para realizar los cálculos de ACP.

6.1.2.3.1.2 Análisis Factorial

El Análisis Factorial es un método multivariante que pretende expresar p variables observables como una combinación lineal de m variables hipotéticas o latentes, denominadas factores (Cuadras, 2014). Este análisis se utiliza para identificar un conjunto de factores no observados que reconstruyen la complejidad de los datos observados. El factor extraído debe retener toda la información importante disponible en los datos originales, mientras que la información innecesaria y/o redundante, así como el ruido se eliminan. Es una herramienta destinada a generar una nueva teoría explorando factores

latentes que explican mejor las variaciones e interrelaciones de las variables manifiestas (Matsunaga, 2010).

El AF tiene una formulación similar a la del ACP, por ello puede ocurrir que se tomen como sinónimos sin embargo ambas estrategias son diferentes. El objetivo de ambas es reducir la dimensionalidad de un conjunto de datos, pero los enfoques adoptados para hacerlo son diferentes.

El AF busca reproducir las inter-correlaciones entre las variables, en las que los factores "representan la varianza común de las variables, excluyendo la varianza única". En términos de la matriz de correlación, esto se corresponde a centrarse en explicar los términos fuera de la diagonal (es decir, la covarianza compartida), mientras que la ACP se centra en explicar los términos que se sitúan en la diagonal. Es decir en ACP, si alguna variable individual es casi independiente de todas las demás variables, entonces habrá un componente principal correspondiente a cada una de esas variables, por lo que ese CP será casi equivalente a la variable correspondiente. Por el contrario, un factor común en el análisis factorial debe contribuir a al menos dos de las variables, por lo que no es posible tener un factor común de "una sola variable".

Por lo tanto, para un conjunto dado de datos, el número de factores requeridos para un modelo de factor adecuado no es mayor -y puede ser estrictamente menor- que el número de CPs requeridos para explicar la mayor parte de la variación en los datos.

A pesar de sus diferentes formulaciones y objetivos, puede ser informativo mirar los resultados de ambas técnicas en el mismo conjunto de datos.

- El software **Opus 7.0** dispone del método quemométrico de AF, su aplicación requiere de los siguientes pasos:
 - 1- Abrir el *Pack Identity Test* en el software.
 - 2- Carga de los espectros
 - 3- Selección de regiones espectrales que se desean estudiar.
 - 4- El pre-procesamiento incluyó la derivada segunda normalizada de forma vectorial.
 - 5- Selección el método de análisis *Factorization*.

6.1.2.3.2 Análisis de dos conjuntos de datos

6.1.2.3.2.1 Mínimos Cuadrados Parciales (Partial Least Squares - PLS)

El análisis de datos biológicos a menudo implica problemas debido a la alta dimensionalidad y multicolinealidad. El análisis de PLS, fue introducido por Wold (1966), y se ha utilizado como un enfoque alternativo para la regresión de mínimos cuadrados ordinarios (MCO) en los modelos de regresión lineal que surgen en varias disciplinas como la química, la economía, la medicina, la psicología y la ciencia farmacéutica (de Jong, 1993).

El PLS es una técnica ampliamente utilizada para optimizar la separación entre diferentes grupos de muestras, que se alcanza uniendo dos matrices de datos X (por ejemplo, datos brutos/crudos/raw) e Y (por ejemplo, grupos, pertenencia a clases, etc.) Este análisis pretende maximizar la covarianza entre las variables independientes X (lecturas muestrales) y la correspondiente variable dependiente Y (clases, grupos, es decir, los objetivos que uno quiere predecir) de variables de datos altamente multidimensionales, mediante la búsqueda de un sub-espacio lineal de las variables explicativas. Este nuevo sub-espacio permite la predicción de la variable Y basada en un número reducido de factores (componentes PLS). Estos factores describen el comportamiento de las variables dependientes Y y abarcan el sub-espacio sobre el cual se proyectan las variables independientes X . Esta metodología proporciona una interpretación visual de conjuntos de datos complejos a través de una disminución de su dimensión, utilizando gráficos de *scores* de fácil interpretación que ilustran la separación entre los diferentes grupos (Gromski y col., 2015).

➤ En PLS-DA se corre bajo el software **MATLAB**, y conlleva los diferentes procedimientos (**Figura 21**):

1- Los espectros en formato .0 (Opus 7.0) se convirtieron en formato *saisr*, para esto se debió recurrir al software *The Unscrambler® X* (CAMO Software).

Una vez cargados los espectros se deben corroborar y volver a escribir sus nombres. Las variables que formarán la matriz Y se generan a partir de los datos incorporados en los nombres de los espectros. Por ello, es fundamental corroborar que los nombres de los espectros incluyan las variables Y que se desean analizar, y que éstas se encuentren en el mismo orden y tengan la misma cantidad de caracteres.

De todos los espectros y sus nombres se genera un único archivo que incluye las absorbancias, números de onda y nombres de los espectros (formato *saisr*).

2- Para la carga de los espectros se incorpora en los códigos Matlab la ubicación donde se almacenó el archivo generado en el paso 1.

3- Selección de las regiones espectrales para el análisis.

4- El pre-tratamiento incluye la aplicación del método EMSC y la derivada segunda normalizada.

5- Los códigos **MATLAB** permiten seleccionar de manera conjunta y alternada las diferentes características que se quieran incluir en la matriz **Y**. Para ello se indica en los códigos Matlab la posición que ocupa en el nombre la característica que quiere estudiarse, y esta será transformada e incluida en la matriz en una matriz.

De ser necesario se deben normalizar los datos incluidos en la matriz **Y**

6- Se corren los códigos que permiten realizar el análisis PLS.

The Unscrambler[®] X

1- Se importan los espectros al software *The Unscrambler[®] X*. Se corroboran los nombres de los espectros. Se genera un solo archivo (formato *sairs*).

2- Carga de los espectros

3- Selección de las regiones espectrales

4- Pre-tratamiento: EMSC y la derivada segunda normalizada.

5- Selección de manera conjunta y alternada las diferentes características que se quieran incluir en la matriz **Y**. Normalizar los datos incluidos en la matriz **Y**.

6- Se corren los códigos que permiten realizar el análisis PLS.

Figura 21. Procedimientos para realizar PLS-DA bajo el software **MATLAB**. 1- Se importan los espectros al software *The Unscrambler[®] X*. Se corroboran los nombres de los espectros. Se genera un solo archivo (formato *sairs*), 2- Carga de los espectros, 3- Selección de las regiones espectrales, 4- Pre-tratamiento: EMSC y la derivada segunda normalizada, 5- Selección de manera conjunta y alternada las diferentes características que se quieran incluir en la matriz **Y**. Normalizar los datos incluidos en la matriz **Y**. 6- Se corren los códigos que permiten realizar el análisis PLS.

Resultados y Discusión

MÓDULO A

OBTENCIÓN DE EMBRIONES Y SOBRENADANTES DE CULTIVOS DE EMBRIONES *IN VITRO*

1 Pacientes y procedimiento de fertilización *in vitro*

Durante el período comprendido entre octubre 2012 a diciembre de 2015 firmaron el formulario de consentimiento y participaron del estudio de investigación propuesto 414 pacientes. De acuerdo a los datos extraídos posteriormente de la plataforma digital **OpenClinica**, las mujeres incluidas tenían entre 27 y 41 años de edad (edad promedio 37), y sus parejas entre 28 y 56 años (dentro de este grupo se verificó un solo paciente de 63 años, edad promedio del grupo 39). Las causas de infertilidad que presentaban los pacientes incluyeron: 54,35% factor masculino, 15,45% baja respuesta, 14,73% edad reproductiva avanzada, 9,9% tubo peritoneal, 8,21% endometriosis y 4,34% síndrome de ovario poliquístico. En algunos casos más de un factor contribuyó a la infertilidad. Las estadísticas encontradas en la población analizada en este trabajo sobre la incidencia del factor masculino en la incapacidad de poder concebir un hijo de manera natural, coincide con datos reportados previamente que indican que el hombre es responsable aproximadamente del 50% de los casos de infertilidad (Stephen y col., 2006).

Contrariamente a lo que se cree, los tratamientos de FIV no garantizan el éxito de embarazo en la mujer, entre el 38-49% de las parejas que inician dichos tratamientos no tendrán éxito (van Loendersloot y col., 2013). Debido a esta baja efectividad es que los pacientes se someten a varios ciclos hasta lograr concebir. La **Figura 1** muestra la distribución de las pacientes analizadas en este estudio teniendo en cuenta el número de ciclos de tratamientos de FIV que hubieran experimentado previamente. Para la mayoría de las parejas incluidas (63%), éste representaba su primer ciclo de reproducción asistida de alta complejidad. El 38,89 % de las parejas habían transcurrido algún ciclo previo, y sólo el 1,69 % tuvieron más de 2 tratamientos anteriores. Si bien entre los criterios de inclusión especificados para este estudio se indicaba que se incluirían solo parejas con no más de 2 tratamientos previos, 7 pacientes no cumplieron con dicho criterio.

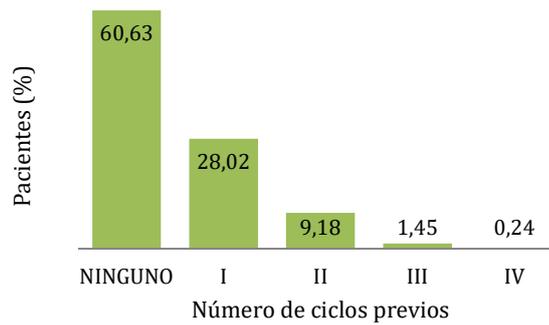


Figura 1. Distribución de pacientes según el número de ciclos previos de tratamientos de alta complejidad.

Con cada ciclo menstrual natural, el sistema hormonal femenino regula la ovulación de un único ovocito. La hormona GnRH (sintetizada por el eje hipotálamo) promueve la secreción de las gonadotropinas FSH y LH, quienes ejercen su función en el ovario. Existen dos tipos de análogos de la GnRH, agonistas y antagonistas, ambos se consideran idóneos para evitar que en las estimulaciones ováricas controladas se produzca un pico prematuro de LH que provocaría no poder captar los ovocitos en la punción y por tanto tener que cancelar el ciclo. Como puede observarse en la **Figura 2** las agonistas producen un incremento inicial de FSH y LH y luego su supresión, mientras que los análogos antagonistas dan una supresión inmediata de las hormonas (Barros San Cristóbal, 2014). No hay evidencia de una diferencia en la posibilidad de lograr un embarazo tras comparar el uso de antagonista y agonista de la GnRH (Al-Inany y col., 2016, Mackey y col., 2016). En cuanto al tratamiento hormonal dado en este estudio para la hiperestimulación ovárica, el 93,48 % de las pacientes recibió tratamiento con antagonistas y solo 4,6% con agonistas.

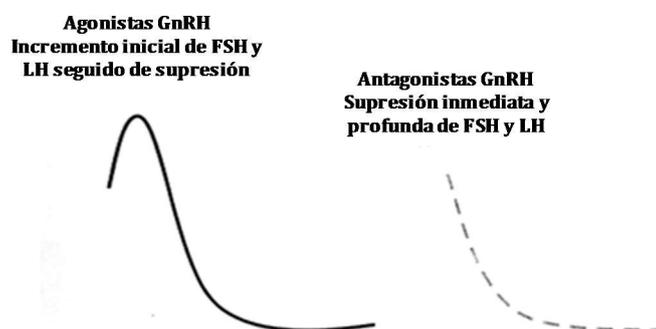


Figura 2. Perfil sérico de las gonadotropinas tras la administración de los dos tipos de análogos de GnRH.

Al mismo tiempo que se estudian posibles causas de infertilidad en la mujer y se realizan los procedimientos para la recuperación de óvulos, se obtiene y analizan las características seminales. La calidad del semen se emplea como medida sustitutiva de la fecundidad masculina a través del análisis de los parámetros espermáticos, los que suelen dirigir la clasificación del diagnóstico de la enfermedad y la selección de FIV o ICSI (Zheng y col., 2015). En los últimos años se ha observado un gran incremento en la aplicación de procedimientos de ICSI por sobre los de FIV. Sin embargo, no se cree que se deba al aumento proporcional de la infertilidad masculina, sino a un uso más difundido de esta técnica en casos de infertilidad mixta, infertilidad inexplicada, infertilidad masculina leve, bajo número de ovocitos y fallas de fertilización (Calhaz-Jorge y col., 2016). Durante los procedimientos de fertilización en este estudio en 173 casos se realizó FIV, 174 casos ICSI y para uno de los pacientes se realizó un tratamiento combinado de FIV+ICSI. De estos procedimientos se obtuvo ovocitos en metafase II y posteriormente se observaron 1421 cigotos con 2 pronúcleos (PN), y 1448 embriones clivados.

De cada paciente se obtuvo entre 1 y 14 embriones, los cuales eran evaluados durante su desarrollo registrando las diferentes características morfológicas como se detalló en la sección de Métodos (2.1 Clasificación morfológica de embriones). Teniendo en cuenta el número de embriones totales de la cohorte de embriones de cada paciente y sus características morfológicas se transfirieron 1 o 2, eligiendo aquellos que presentaran las mejores características morfológicas de la cohorte.

De los ciclos iniciados un total de **497 embriones se transfirieron en día 3** (39 transferencias de 1 embrión y 229 transferencias de 2 embriones). Por otro lado, 39 embriones se transfirieron en el estado de blastocisto en día 5 (14 transferencias de 1 embrión y 12 transferencias de 2 embriones), sin embargo estos últimos no fueron considerados en este estudio.

A lo largo de todo el período en que transcurrió esta investigación se fueron tomando muestras de los diferentes lotes de medios de cultivo G1 Plus, G2 y aceite utilizados. Se colectó un total de 90 muestras de cada uno. Los sobrenadantes recuperados junto con las muestras de los medios de cultivo y el aceite se enviaron desde el Centro de fertilización PREGNA al laboratorio de Bioespectroscopía en la ciudad de La Plata. El envío se realizó bajo estrictas normas de seguridad biológica. Para ello se contrató un servicio de envío especial puerta a puerta que trasladaba el material en contenedores adecuados para las muestras, con hielo seco y perfectamente embalado.

MÓDULO B

CONSTRUCCIÓN DE UNA PLATAFORMA PARA ALMACENAR, EXTRAER Y UTILIZAR LA INFORMACIÓN GENERADA

1 Construcción de la plataforma OpenClinica

Durante el desarrollo de esta investigación se aplicaron estrictas normas internacionales de bioseguridad, aplicando las "Buenas Prácticas en Manejo de Datos para Investigación". Para tal efecto fue necesario desarrollar una herramienta informática basada en un sistema de formularios y protocolos para el almacenamiento, clasificación, análisis y visualización de datos.

Los obstáculos científicos, reglamentarios, contractuales y de seguridad del paciente para iniciar un estudio clínico son bastante difíciles, por lo cual la tecnología no debe formar parte de esa lista. **OpenClinica**, es un software para ensayos clínicos de código abierto, el cual se generó debido a que los existentes eran poco flexibles, caros e imponían obstáculos para un inicio rápido y eficiente del estudio. Lanzado por primera vez en 2005, **OpenClinica** se ha convertido en el software para ensayos clínicos de más rápido crecimiento del mundo, en parte porque ayuda a eliminar estos obstáculos.

La base de datos (**Figura 3**) se encuentra operando efectivamente en el sitio web <http://OpenClinica/pages/login> el cual está restringido por claves personales a los integrantes del proyecto. Una vez construida, se almacenaron en ella los datos recolectados en el Centro de fertilidad PREGNA asociados a la obtención de los óvulos y espermatozoides, cultivo de embriones, evaluación de la morfología, recolección de sobrenadantes de cultivo, transferencia de embriones seleccionados, datos asociados a estos procedimientos tales como edad de la madre, altura, peso, tabaquismo, etc. Por otro lado, en el laboratorio de Bioespectroscopía se registró la información relacionada al análisis espectral de los sobrenadantes de cultivo de embriones.

La construcción de dicha herramienta informática se basó en el desarrollo de 7 formularios (**ANEXO III**) que en conjunto reclutan el total de la información:

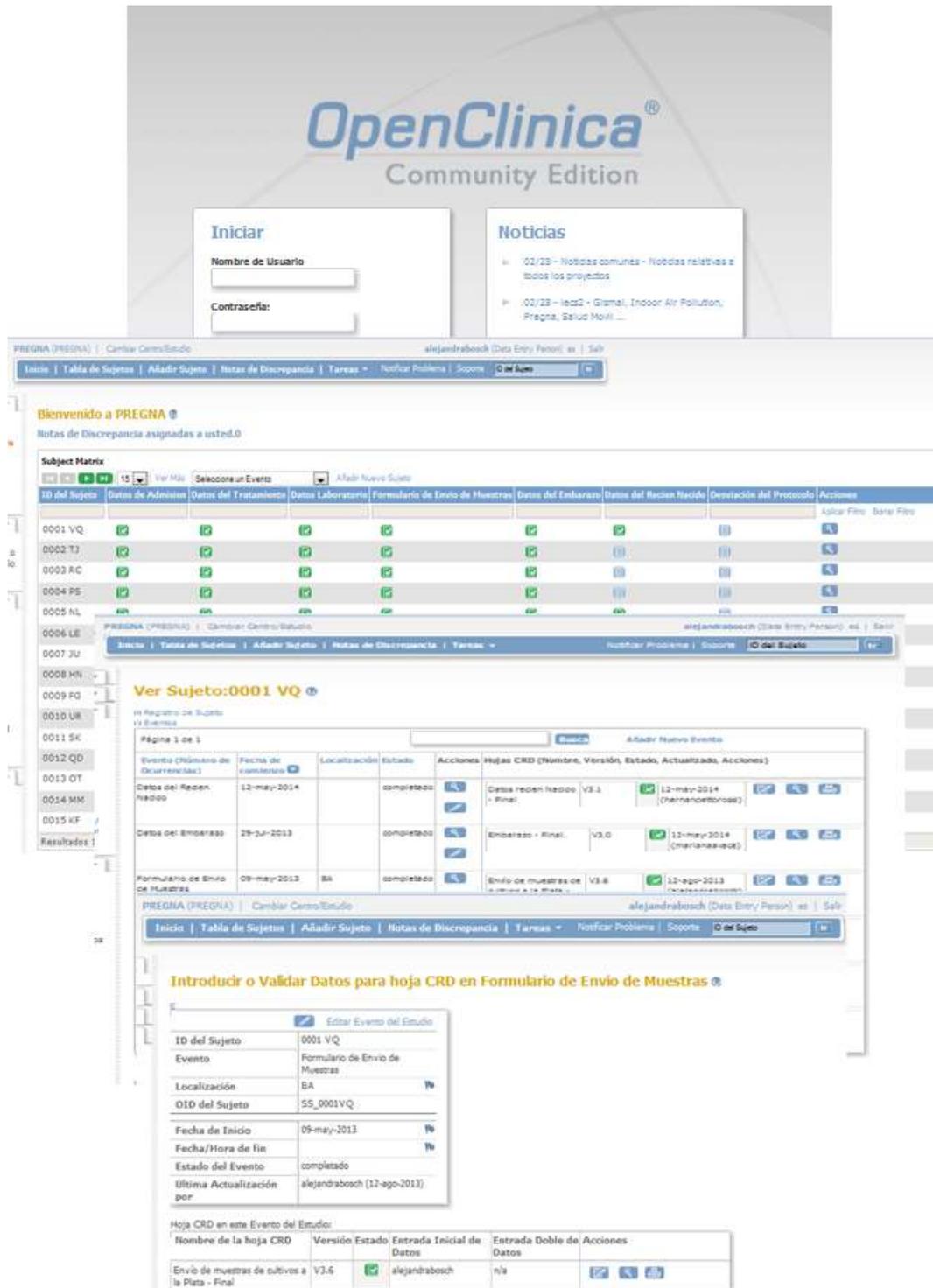


Figura 3. Esquema de la base de datos OpenClinica.

Formulario 00: Evaluación de Elegibilidad. Este formulario consta de un cuestionario en el que la pareja da su consentimiento o no, a ser parte de esta investigación

y autoriza la divulgación de la información médica, permite a su vez evaluar si la misma reúne los requisitos para aceptar su admisión al mismo.

Formulario 01: Admisión. Contiene los datos clínicos de la pareja que participará de la investigación.

Formulario 02: Datos del tratamiento. En él se vuelcan los datos sobre la estimulación a la madre (drogas empleadas, tiempos, etc.) y las condiciones y características de los óvulos recolectados.

Formulario 03: Datos recolectados durante la fertilización in vitro. Registra la cantidad de embriones fecundados, la información sobre las características morfológicas de los embriones, las características y calidad de la transferencia embrionaria.

Formulario 04: Datos espectroscópicos. Datos sobre el envío de muestras de sobrenadantes de medios de cultivo desde el Centro de Fertilidad Buenos Aires-Pregna al laboratorio de Bioespectroscopía. Esta planilla registra los ID de los sobrenadantes enviados, indica la calidad morfológica del embrión del cual proviene cada sobrenadante remitido y otros datos de interés sobre los embriones y la madre.

Formulario 05: Datos del embarazo. Registra la evolución de parámetros sanguíneos de la madre asociados al embarazo (subunidad Beta de la Hormona Gonadotropina Coriónica), las características de la evolución del embarazo (bioquímico, aborto clínico, embarazo ectópico, embarazo clínico), tipo de embarazo (único, múltiple).

Formulario 06: Datos del recién nacido. Contiene la descripción sobre complicaciones durante el embarazo, fecha del parto, edad gestacional, peso, sexo, de/los recién nacidos.

Paralelamente a la construcción de la base **OpenClinica** se desarrolló un manual o instructivo dirigido al personal involucrado que describen: los procedimientos para la recolección y manejo de datos empleando estos formularios; y el acceso y manejo del sistema de **OpenClinica** (ANEXO IV).

2 Procedimientos del Ensayo Clínico

Teniendo en cuenta la información generada durante los tratamientos de reproducción asistida se realizó un esquema del flujo de trabajo con los datos más relevantes (**Figura 4**). A partir de ellos se determinó que la tasa de embarazo fue del 37% (109/294), pero debido a abortos involuntarios y embarazos ectópicos, la tasa de embarazo en curso fue del 27,2% (80/294).

El Registro Argentino de Fertilización Asistida (RAFA, 2004-2014) (Mackey, 2016) muestra valores similares al que fue hallado por nosotros (28,92 % período 2004-2012; 27,62 % año 2013 y 26,87% año 2014). Sucede lo mismo con los datos arrojados por el último reporte publicado por la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología (28,6 % año 2012, ESHRE, 34 países participantes) (Calhaz-Jorge y col., 2016), mientras que el divulgado por la CDC de los Estados Unidos (36,4 % año 2012) (Sunderam y col., 2014) es un poco superior.

Tradicionalmente en los tratamientos de reproducción asistida se transferían embriones de 3 días de crecimiento. Posteriormente y gracias a los avances en la dinámica de cultivo embrionario que permitió obtener blastocistos, comenzaron a transferirse embriones de 5 días de desarrollo, la elección de esta práctica experimenta un incremento constante. La transferencia en esta etapa se considera un momento fisiológicamente más apropiado, ya que imita más de cerca el tiempo de la implantación natural y puede mejorar la sincronía entre el endometrio y el desarrollo del embrión (Kaur y col., 2014). El objetivo principal de este estudio era desarrollar una metodología que permitiera evaluar el potencial de implantación de embriones de 3 días de desarrollo es por ello que la incidencia de transferencias de blastocistos es mucho menor (8,89%) en este estudio. Al analizar la tasa de embarazo en curso de las transferencias de embriones de 3 días de desarrollo este valor (26%) permanece similar al global, mientras que incrementa a un 46% si solo se tienen en cuenta los ciclos donde se transfirieron embriones de 5 días de desarrollo. Esta diferencia entre los valores de tasa de embarazo en curso coinciden con lo reportado en el review realizado por Glujovsky y col. (2016) quienes analizando los registros de que si una clínica tiene una tasa de embarazo del 29% transfiriendo embriones de 3 días de desarrollo, entonces ésta incrementará a un 32-42% si la clínica transfiriera blastocistos (Glujovsky y col., 2016).

Si bien los ciclos de FIV donde se realizan transferencias de blastocisto suelen mostrar mejores tasas de embarazo en curso en comparación con aquellos donde se transfieren embriones de 3 días de cultivo, la obtención de blastocisto en mujeres de edades avanzadas es más incierta, es por ello que la mayoría de las clínicas realizan tratamientos donde se transfieren embriones en la etapa de clivaje (3 días de cultivo).

Durante el proyecto se recolectaron sobrenadantes de cultivo de embriones de 5 días de desarrollo, sin embargo el número de muestras recuperado fue muy bajo, e incluso aún menor fue la cantidad de sobrenadantes de embriones analizados que lograron

implantar. Por lo cual, no fue posible determinar las diferencias metabólicas entre embriones de 5 días de desarrollo que implantan o no.

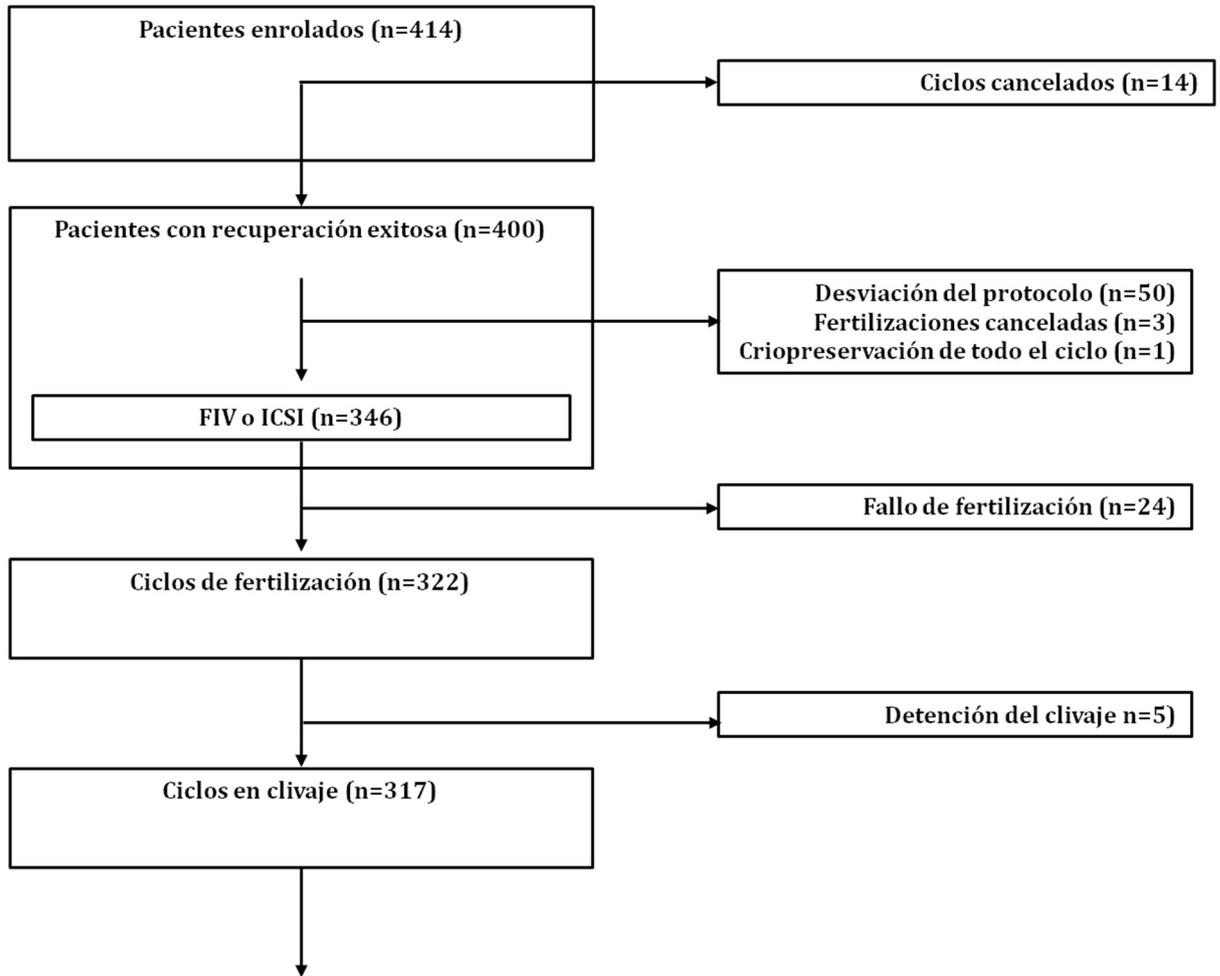


Figure 4. Procedimientos del Ensayo Clínico

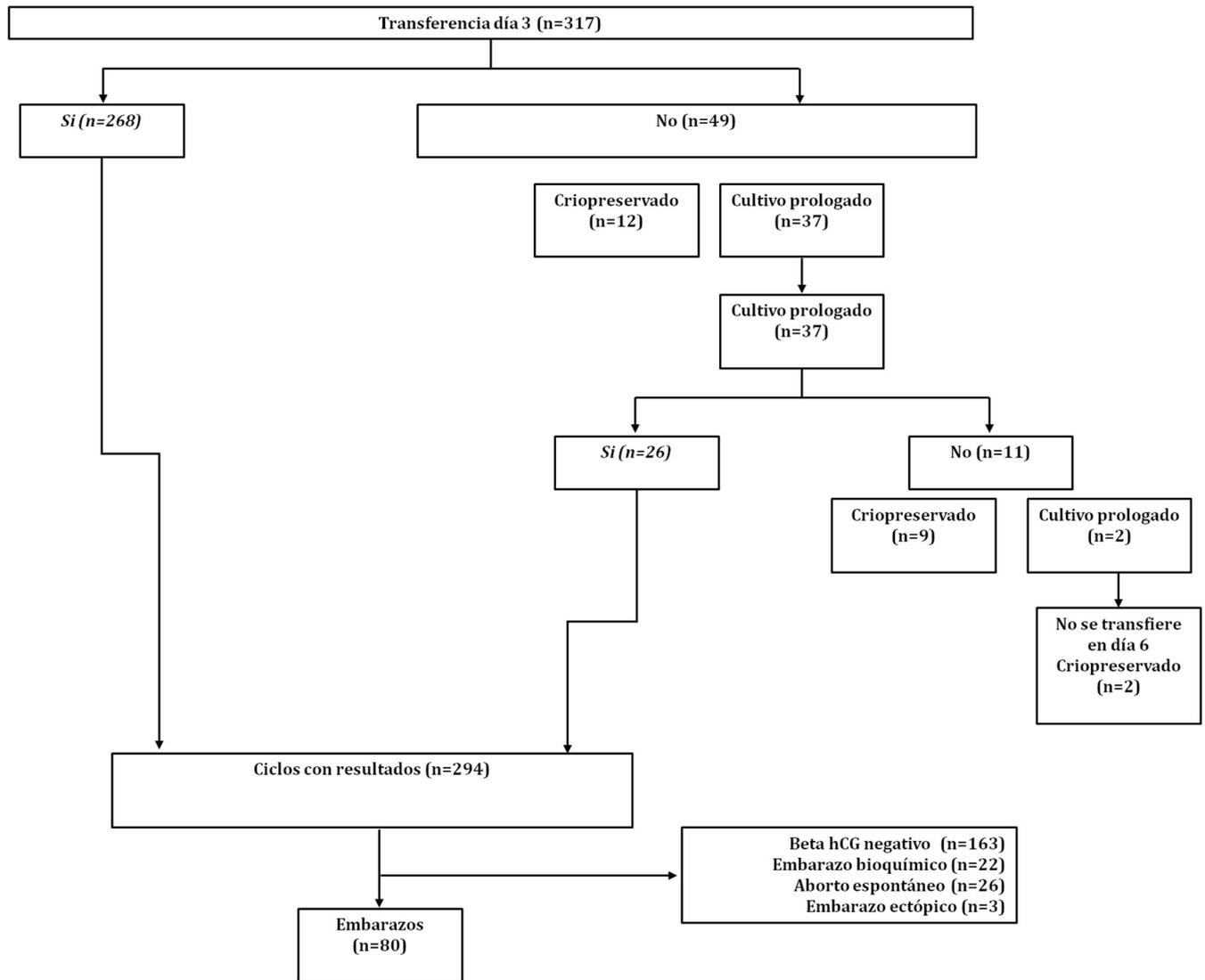


Figure 4. Procedimientos del Ensayo Clínico.

3 Análisis de factores que afectan la probabilidad de implantación

Dado que la aplicación de las tecnologías de reproducción asistida (TRA) se incrementa constantemente y sus costos emocionales así como el tiempo y el dinero invertido son significativos, es muy importante conocer los factores que pueden afectar la tasa de éxito. Un área clave de investigación, debido a que los datos reportados son muy disidentes, es estudiar como los factores asociados al estilo de vida tales como el tabaquismo, el consumo de alcohol y la ingestión adecuada de frutas y verduras, entre otros, inciden en los resultados de FIV. Varios informes han sugerido que éstos repercuten

en la reproducción natural y la fertilidad y, por tanto, podrían ser causa de infertilidad incrementando el número de parejas que requieren tratamientos de TRA. Es totalmente posible que cambios en los estilo de vida antes de los ciclos de FIV puedan conducir a una restauración natural de la fertilidad, y así reducir la necesidad de estos procedimientos. En consecuencia, es esencial comprender cómo estos factores de estilo de vida pueden afectar a los resultados, particularmente porque son comportamientos modificables que podrían ser modificados para aumentar la probabilidad de éxito.

La información registrada y almacenada en la plataforma **OpenClinica**, cuya eficiencia fue guiada por especialistas de IECS, debió ser reestructurada en el laboratorio de Bioespectroscopía para poder estudiar las características y factores relacionados a hábitos de vida de la población.

3.1 Edad materna

Teniendo en cuenta los datos incorporados en la base **OpenClinica** se determinó que la edad promedio de las pacientes de nuestro estudio fue de 34,4 años para los casos en los cuales **todos los embriones transferidos implantaron (Pacientes tipo I)**, de 36,91 años para aquellos en los que **solo uno de los embriones transferidos completó el ciclo (Pacientes tipo II)**, y de 37,9 años promedio para los cuales **no hubo implantación de embriones (Pacientes tipo III)**.

Estos resultados estarían indicando una fuerte influencia de la edad promedio de la mujer con el resultado de la implantación. Sin embargo, esto se hace notorio si desglosamos la distribución de edades de la mujer en 3 grupos, menores a 34 años, entre 34 y 40 años y mayores de 40. Analizando esta distribución se pudo observar que en la Pacientes tipo I (todos los embriones implantaron) no hay mujeres mayores de 39 años, mientras que en aquellas parejas que forman la Pacientes tipo III (no hubo implantación) hay una mayor proporción de mujeres mayores a 40 años (**Figura 5**). Del mismo modo analizando la tasa de embarazo en curso global teniendo en cuenta estos tres rangos de edades (≤ 34 años, entre 34 a 39 años y ≥ 40 años), nuevamente se observa que las mujeres de edades menos avanzadas tienen más probabilidad de lograr un embarazo cuando transcurren por un ciclo de TRA (**Figura 6**). Esta misma tendencia se obtuvo al analizar las transferencias de blastocistos.

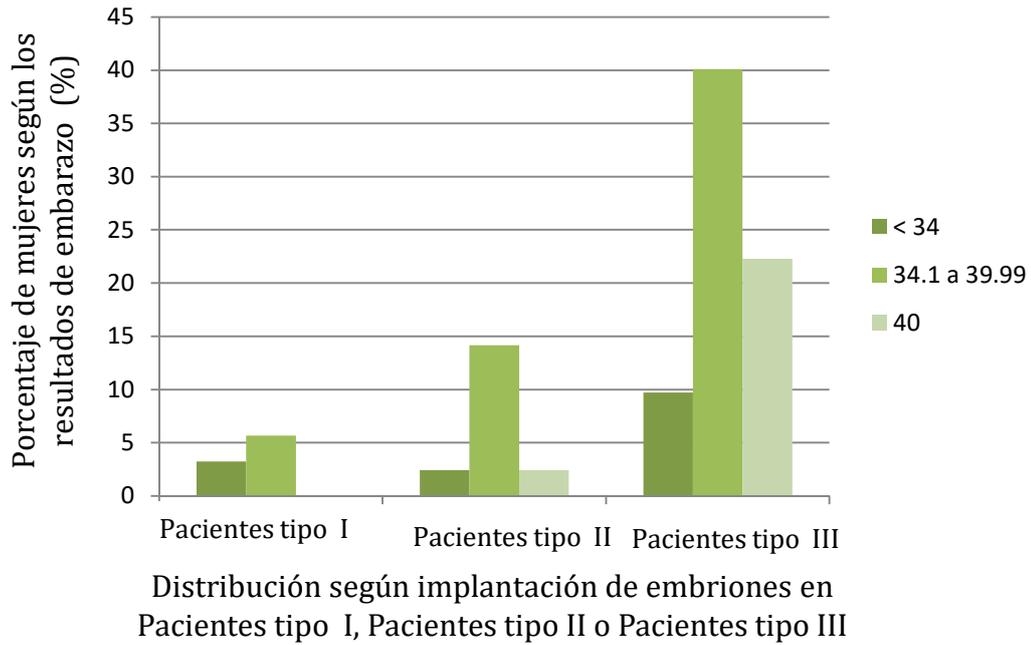


Figura 5. Rango de edades de las mujeres que participaron en el estudio según los resultados de implantación. Pacientes tipo I: pacientes en las que todos los embriones transferidos implantaron, Pacientes tipo II: pacientes en las que uno de los embriones transferidos implantó, Pacientes tipo III: pacientes en las cuales no hubo implantación de embriones.

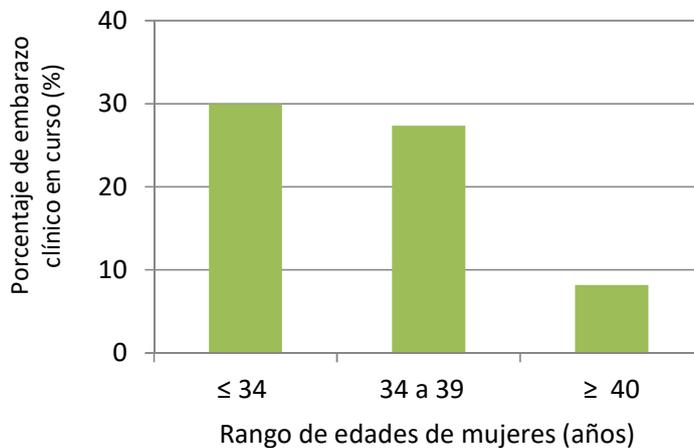


Figura 6. Porcentaje de embarazo en curso según tres rangos de edades (≤34 años, 34 a 39 años y ≥ 40 años) de las mujeres participantes.

El aumento en el retraso en la búsqueda de la maternidad es resultado de la educación femenina, la participación de la mujer en la fuerza de trabajo y en la búsqueda de mejorar los ingresos en el hogar. Además, la creciente incertidumbre económica, el desempleo en jóvenes-adultos y los nuevos valores incompatibles con la paternidad han

sido identificados como factores importantes en la reciente transición de postergación (Basten y col., 2013). Esto conlleva a que las mujeres de edades avanzadas requieran de TRA para lograr un embarazo. De modo que por lo general las mujeres afrontan estos tratamientos en edades avanzadas cuando diversos estudios han demostrado que la edad femenina se correlaciona negativamente con el nacimiento vivo después de FIV o ICSI (Choi y col., 2013; Nelson y col., 2011; Ottosen y col., 2007; van Loendersloot y col., 2013). Incluso mujeres que requieren técnicas de reproducción asistida de más de 40 años pueden llegar a ser madres casi exclusivamente a través de la donación de óvulos de donantes jóvenes, ya que los tratamientos de FIV usando ovocitos propios muestran tasas de éxito más bajas debido a una combinación de ciclos bajos de embarazo y altas tasas de pérdida de embarazo (Kocourkova y col., 2015; Sobotka, 2013;).

De modo que lo hallado en nuestra población de estudio fue consistente con los estudios que sugieren **que la edad es uno de los principales factores predictivos del embarazo en mujeres** (Calhaz-Jorge y col., 2016; Mackey, 2016; Vaegter y col., 2016; Wiweko y col., 2010).

3.2 Índice de masa corporal materna

Otro factor que podría influenciar los resultados de los ciclos de FIV es el sobrepeso. Se ha demostrado que la obesidad tiene consecuencias negativas para la salud, afectando prácticamente todos los sistemas del cuerpo humano (Guh y col., 2009; Haslam y col., 2005). En mujeres se ha relacionado con un mayor riesgo de disfunción menstrual, anovulación e infertilidad (Zain y Norman, 2008), inclusive un índice de masa corporal (body mass index-BMI), dado por la relación peso a talla, superior a lo normal produce problemas adicionales durante el embarazo. Mientras que los efectos negativos de la obesidad femenina se asocian con un mayor riesgo de infertilidad y complicaciones del embarazo entre las mujeres que intentan concebir sin asistencia médica (Aune y col., 2014; Brewer y col., 2010), su impacto sobre el resultado en técnicas de reproducción asistida, sigue siendo controvertido (Koninget y col., 2012).

En lo que concierne a los valores de BMI de las pacientes participantes en este estudio no se contó con una alta incidencia de mujeres con obesidad (7,41%) de hecho la mayoría tenían una talla saludable (Pacientes tipo I 79%, Pacientes tipo II 92%, Pacientes tipo III 84%).

Al considerar la tasa de embarazo clínico teniendo en cuenta el BMI de la mujeres participantes llama la atención ver que aquellas mujeres con los índices más altos presentan tasas de embarazo (27.77%) similares a las que tienen una talla normal (25.14%), mientras que aquellas cuyo BMI es muy bajo (12.5%) o por sobre lo normal (17.39%) toman valores menores. Estos resultados si bien parecerían contradictorios pueden deberse al hecho de que solo se consideraron los valores de BMI y no otros posibles factores que estarían cooperando negativamente al éxito del tratamiento. También podrían explicarse debido a que en realidad no hay una asociación entre la talla de la mujer y su posibilidad de lograr un ciclo de TRA exitoso.

Nuestros resultados coinciden con lo reportado en numerosos estudios quienes hallaron que no hay asociaciones significativas entre la obesidad y el embarazo o el éxito del nacimiento vivo. Inclusive Legge y col. (2014) observaron que mujeres de peso normal y obesas requerían dosis comparables de gonadotropinas para una estimulación folicular adecuada (Farhi y col., 2010; Legge y col., 2014; Sathya y col., 2010; Schliep y col., 2015; Thum y col., 2007; Zhang y col., 2010). Contrariamente, una revisión sistemática de 2011, informó que mujeres con sobrepeso y obesidad tenían menores tasas de embarazo clínico y de nacidos vivos, y mayores tasas de aborto involuntario después de someterse a fecundación *in vitro* (Rittenberg y col., 2011).

Un estudio del año 2012 investigó el efecto del cambio de peso a corto plazo en los resultados de FIV encontrando que la pérdida de peso mejoró la calidad del ovocito, pero no logró modificar las tasas de embarazo clínico o nacidos vivos (Chavarro y col., 2012). En este mismo trabajo proponen que futuros análisis que incluyan programas de intervención para la pérdida de peso deberían dirigirse a mujeres obesas que planean un tratamiento de FIV, y evaluar si la reducción de peso lleva a mejoras en los resultados.

Debido a que los estudios que evaluaron la relación entre el BMI de una mujer y los resultados de la FIV han sido contradictorios, el verdadero impacto de la obesidad sobre los tratamientos de fertilización aún no está claro.

3.3 Tabaquismo

La posibilidad de identificar con precisión el efecto del consumo de tabaco sobre la fertilidad es difícil debido a múltiples factores de confusión, que pueden contribuir a una fertilidad disminuida, tales como el estatus socioeconómico, el consumo de caféina y alcohol, entre otras. El mecanismo exacto por el cual fumar puede disminuir la

fertilidad es desconocido (Wright y col., 2006). Sin embargo, las toxinas del humo de cigarrillo han sido implicadas como posibles inductoras de perturbaciones en los ciclos menstruales, originando ciclos más corto o irregulares (Liu y col., 2004), así como la disminución de la reserva ovárica, que se refleja en un menor recuento de folículos antrales y los niveles séricos más bajos de la hormona antimulleriana (Freour y col., 2012). Asimismo se ha reportado que el inicio más temprano de la menopausia es mayor en individuos fumadores en comparación con los no fumadores, y curiosamente, el riesgo de inicio de menopausia temprano se reduce en las mujeres que habían dejado de fumar en comparación con aquellas fumadoras actuales (Hayatbakhsh y col., 2012). Estas investigaciones demuestran la influencia significativa del tabaquismo en varios aspectos de la fertilidad femenina.

Con respecto a la fertilidad masculina, en individuos fumadores se ha demostrado una disminución significativa de la densidad del espermatozoide, en el número de espermatozoides móviles y el recuento total (Gaur y col., 2010; Künzle y col., 2003). Más específicamente, Künzle y col. (Künzle y col., 2003) encontraron que el consumo de cigarrillos causó una disminución del 15,3% en la densidad del espermatozoide, del 16,6% en el número de espermatozoides móviles y del 17,5% en el recuento total de espermatozoides. También se ha indicado que tiene un efecto en la fragmentación de ADN del espermatozoide y otros parámetros morfológicos (Anifandis y col., 2014).

Aunque es tentador extrapolar el efecto aparente del consumo de tabaco en mujeres que conciben de manera natural a aquellas que realizan técnicas de reproducción asistida, en la actualidad estos dos grupos son bastante diferentes. Las técnicas de reproducción artificial pueden hacer que las gametas sean menos susceptibles a las toxinas presentes en el humo del cigarrillo, y es posible que otros factores de infertilidad subyacentes puedan enmascarar cualquier pequeño efecto nocivo del tabaco.

Teniendo en cuenta los datos de los pacientes participantes en este estudio se pudo observar que la mayoría de las mujeres son no fumadoras (Pacientes tipo I 77%, Pacientes tipo II 53%, Pacientes tipo III 61,6%). En la Pacientes tipo III un 3,3% de las pacientes declararon consumir al menos 5 cigarrillos. Por otro lado, se observó que aquellas mujeres que eran fumadoras tuvieron una tasa de embarazo de solo el 8.7 %, mientras que aquellas que nunca consumieron tabaco fue del 50.72%.

Lo hallado en este estudio es consistente con lo informado por un estudio que analizó el efecto del tabaquismo sobre la tasa de éxito de FIV en 8457 mujeres (Lintsen

y col., 2005). Así mismo, Firms y col. (2015) observaron que las tasas de fertilización disminuyeron a medida que aumentó el número de años de consumo de tabaco.

Asimismo un meta-análisis realizado en 2008 incluyó 21 estudios que se centraron en los resultados reproductivos y los factores de estilo de vida. Ellos encontraron que los fumadores de cigarrillos tenían una tasa de embarazo y nacidos vivos significativamente menor por ciclo en comparación con los no fumadores. En el mismo meta-análisis, el tabaquismo también se asoció significativamente con un mayor riesgo de aborto espontáneo. Sin embargo, no hubo asociación entre el tabaquismo y las tasas de fertilización en 17 trabajos que incluyeron los parámetros de tasa de fertilización (Waylen y col., 2009). Es por ello que los estudios que evalúan el efecto del tabaquismo en parejas bajo tratamientos de reproducción asistida han producido resultados no concluyentes (Cinar y col., 2014; Wright y col., 2006). Esto puede deberse a los diferentes criterios de valuación del tabaquismo utilizados, siendo así es que algunos autores establecen que la manera más objetivamente de evaluar la exposición al tabaco es estudiando la nicotina urinaria (Freour y col., 2008).

3.4 ¿Las características morfológicas del embrión están asociadas a la capacidad de implantación?

Un paso crítico en todos los procedimientos de TRA es el cultivo de ovocitos fertilizados y la posterior selección de uno o más embriones presumiblemente viables para la transferencia (Meseguer y col., 2012). La morfología del embrión determinada por microscopía óptica, se inspecciona y se evalúa en unos pocos momentos discretos durante su desarrollo (Meseguer y col., 2012). Su calidad depende en gran medida de la edad del paciente, las causas de infertilidad, la calidad de los ovocitos y del espermatozoides (Wiweko y col., 2010). Sin embargo, estos procedimientos tienen limitaciones significativas cuando se trata de predecir la probabilidad de éxito de la implantación y de los nacimientos vivos. Además, ha sido demostrado que la evaluación morfológica no refleja completamente el potencial de desarrollo de un embrión (Kotze y col., 2014). A pesar de ello sigue siendo la técnica más ampliamente utilizada en las clínicas.

Teniendo en cuenta el criterio de selección de los embriones en etapa de clivaje (día 3), en nuestra población de estudio, observamos que en **los casos donde hubo embarazo** prevalecieron las transferencias de embriones de **morfología I y II**, mientras que en los ciclos en los cuales no hubo embarazo se pudo observar la transferencia de

embriones de morfología III y una disminución de transferencia de embriones de morfología I y II (**Figura 7**). Se debe tener en cuenta que las transferencias de embriones de baja calidad se realizan en los casos en que la paciente no cuente con otro tipo de embrión para transferir.

Como se mencionó anteriormente, numerosos estudios ya reportaron la incapacidad de la evaluación morfológica en predecir con precisión el potencial reproductivo de un embrión individual (Vergouw y col., 2014). Incluso se ha encontrado que embriones de día 3 con una morfología "normal" son en realidad cromosómicamente anormales (Kotze y col., 2014). Alfarawati y col. (2011) contemplaron la posibilidad de que prolongar el cultivo de embriones hasta la etapa de blastocisto puede ser utilizado como una manera de eliminar muchos embriones cromosómicamente anormales antes de su transferencia. En contraposición, Kotze y col. (2012) informaron que el 67% de los ovocitos aneuploides progresaron y desarrollaron hasta el día 5. Por lo tanto, alcanzar esta etapa de desarrollo no garantizaría tampoco, que los embriones sean euploides y/o "competentes".

Sin embargo, en nuestro estudio se pudo observar una cierta tendencia sobre la posible influencia de la morfología sobre el éxito de un tratamiento de FIV, ya que no se han registrado dentro del grupo Pacientes tipo I (todos los embriones transferidos implantaron) embriones de morfología III.

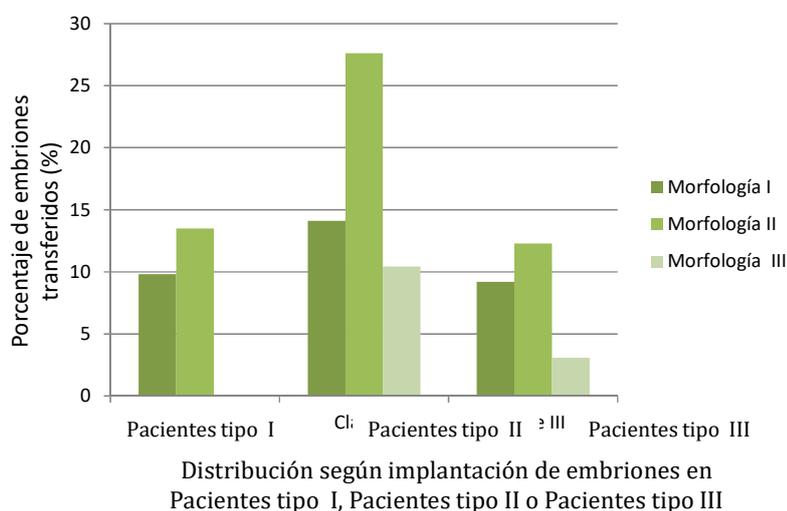


Figura 7. Prevalencia de transferencia de las diferentes morfologías embrionarias según los resultados de implantación.

Es interesante resaltar que la información almacenada hoy en la base **OpenClinica** es sumamente rica, por lo que a través de un enfoque multidisciplinario por diferentes grupos de profesionales, se podrían realizar asociaciones y correlaciones de datos que permitirían conocer otros factores de relevancia a tener en cuenta a partir de la población en estudio.

A modo de ejemplo se podría analizar en el futuro la influencia de otros factores sobre los ciclos TRA, entre ellos la alimentación, el alcoholismo, grosor del endometrio, altura femenina, tales como los realizados por Firms y col., (2015), Rockliff y col., (2014), y Vaegter y col. (2016).

Otro de los factores que deben tenerse en cuenta en estos tipos de análisis que muchas veces producen variaciones no deseadas es la diferente respuesta emocional que de cada paciente en particular. Las diferencias en la respuesta del tratamiento FIV al estrés pueden producir modificaciones en los resultados obtenidos.

No podemos dejar de remarcar sin embargo, que hay una serie de factores que contribuyen a las discrepancias entre los estudios, entre ellos se pueden incluir el tamaño de las muestras, diferencias en los protocolos de estimulación, variación de los sistemas de clasificación y las medidas de resultado definidas de manera incoherente. Consecuentemente, es claramente necesario el desarrollo de estudios que estén óptimamente diseñados y adecuadamente impulsados para correlacionar con precisión el impacto de diferentes factores sobre la fertilidad y los resultados de los tratamientos.

MÓDULO C

ANÁLISIS DE SOBRENADANTES DE CULTIVO DE EMBRIONES POR ESPECTROSCOPIA FTIR

Como se indicó en las secciones anteriores, el análisis de los sobrenadantes de cultivo por espectroscopía FTIR involucró la siguiente secuencia de trabajo (**Figura 8**).

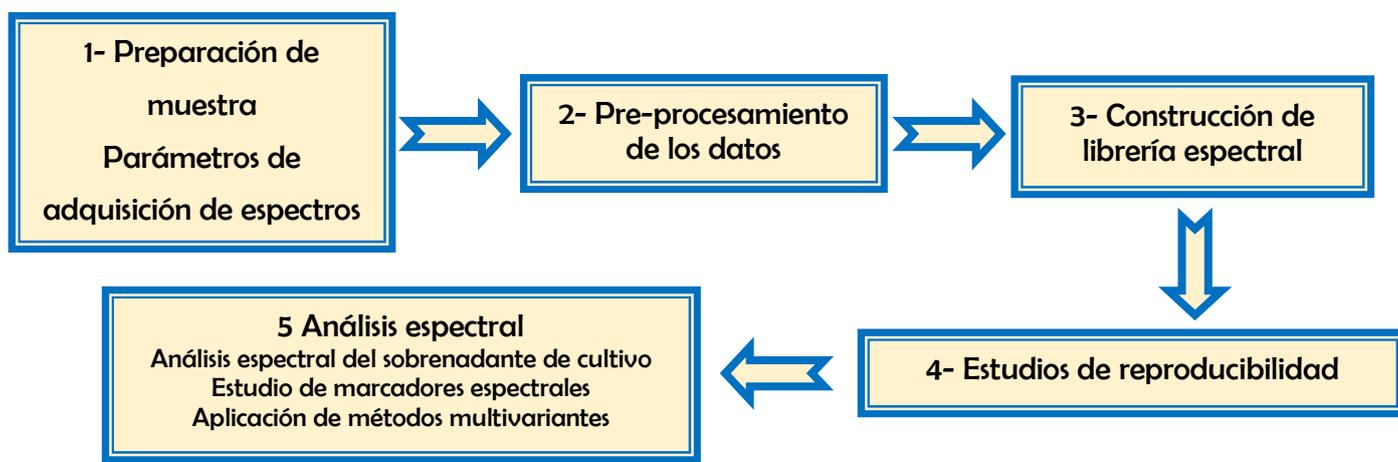


Figura 8. Esquema general de trabajo del Módulo C - Análisis de sobrenadantes de cultivo de embriones por espectroscopía FTIR.

1 Preparación de muestras y parámetros de adquisición de espectros

1.1 Optimización de la cantidad de sobrenadante de cultivo, del tiempo y modo de secado de las muestras en las celdas de ZnSe

La obtención de un film adecuado para espectroscopía infrarroja representa un desafío que requiere pruebas experimentales empíricas de las condiciones de preparación, necesarias para obtener un espectro de alta calidad. Uno de los parámetros a considerar es la siembra de las muestras en la celda de ZnSe donde las suspensiones deben completar el área del pocillo de registro. Esto garantiza que el film que se genera cubra la totalidad del área definida para la medida (tamaño del haz IR). El volumen de la muestra, la homogeneidad y concentración de la suspensión determinan la calidad del film formado.

La preparación de films defectuosos puede ocurrir por diversas causas que pueden ser reconocidas fácilmente por inspección visual o posteriormente a través de ciertas características del espectro. Si el sobrenadante de medio de cultivo no cubre la totalidad del área de medida consecuentemente el haz IR penetra por regiones donde no hay muestra, esto introduce artificios en los registros, causando posteriores errores en los procedimientos de identificación y clasificación (**Figura 9 (b) y (c)**). Films de suspensiones heterogéneas, como aquellas originadas por la presencia de aceite en los sobrenadantes de cultivo, pueden generar inconvenientes similares. La luz IR puede saturarse en la muestra y esto puede conducir a efectos de no-linealidad en las bandas de los espectros. Suspensiones muy concentradas pueden distorsionar el film produciendo estructuras en forma de cráteres lunares o montañas centrales, causando consecuencias parecidas a las observadas por muestras heterogéneas (**Figura 9 (d)**). De menor consideración son los efectos surgidos por concentraciones por debajo de cierto límite, generado por la utilización de muy poca muestra, y que luego se eliminarán por no cumplir con el test de calidad.

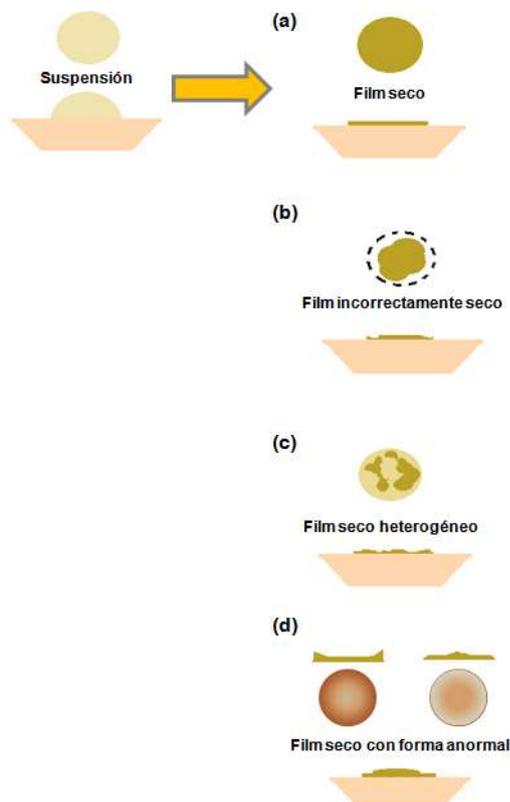


Figura 9. Formación de films normales y posibles deformaciones que pueden producir debido al secado incorrecto.

El espectrómetro FTIR, VERTEX 70 acoplado al módulo HTS-XT de alta *performance* (Bruker Optics, Alemania) permite el registro de espectros de hasta 2 μl de muestra. Sin embargo al evaluar 3 volúmenes diferentes de medio de cultivo G1 Plus se pudo observar que los espectros obtenidos para 15 y 20 μl de muestras daban valores de absorbancias muy bajas. Esto dificultaría en un futuro su posterior análisis por métodos quemométricos y por lo tanto la detección de diferencias que podrían existir entre los espectros de sobrenadantes de embriones que implantaron y los que no lo hicieron, (**Figura 10**). Por lo tanto, se determinó que los espectros obtenidos con 30 μl de muestra eran aquellos cuyos parámetros de absorbancia permitirían dar suficiente información para los posteriores análisis espectrales.

Asimismo, se observó que 30 μl de medio de cultivo es suficiente para cubrir el área de la muestra por completo de manera homogénea.

La metodología de secado al vacío a temperatura ambiente fue aquella que permitió la obtención de films sin grumos, bordes uniformes y un secado sincronizado de todas las muestras en la celda (96 pocillos). El tiempo requerido para el secado varió según la cantidad de muestras sembradas en los pocillos de la celda, siendo 3 horas el tiempo máximo requerido.

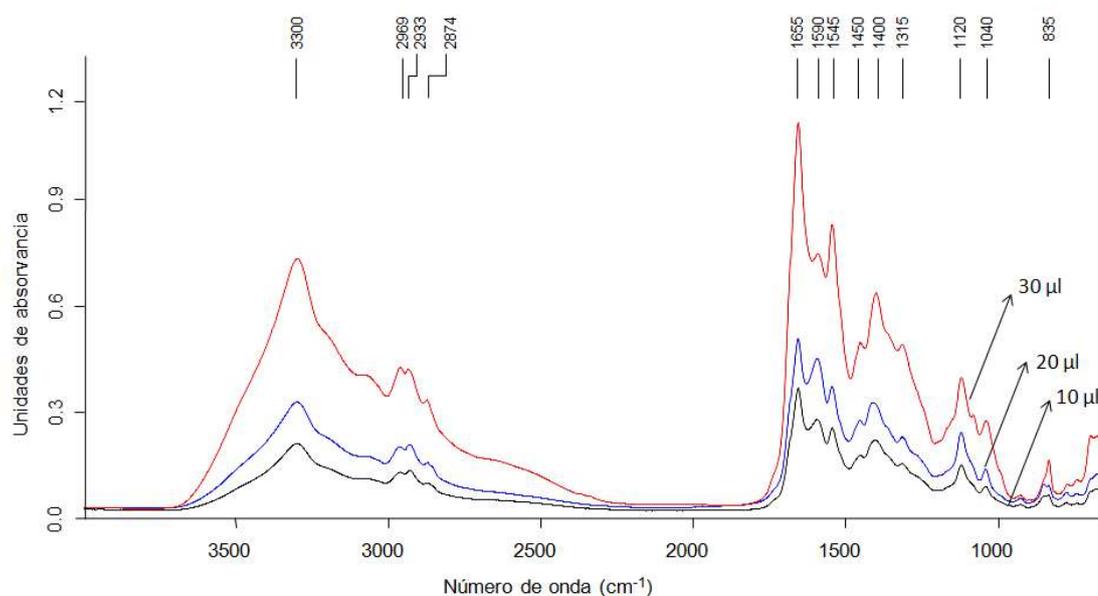


Figure 10. Optimización del volumen de sobrenadante de cultivo. Espectros FTIR de 15, 20 and 30 μl de muestra de medio G1 Plus.

2 Pre-procesamiento de datos espectrales en muestras biológicas

El pre-procesamiento tiene como objetivo esencial mejorar la robustez y precisión de los análisis multivariados posteriores y de esta forma aumentar la certeza en la interpretación de los datos a través de la corrección de artificios asociados con la adquisición de datos espectral (Lasch y col., 2013).

2.1 Test de calidad

Empleando aproximadamente 200 mediciones entre medio de cultivo G1 Plus y muestras de sobrenadantes de cultivo de embriones de 3 días se calcularon los valores de los parámetros del QT que debían cumplir los espectros para poder ser incluidos en los tratamientos matemáticos (**Tabla 1**). Para establecer dichos límites de aceptación del QT se calcularon las derivadas primeras de todos los espectros, y se determinaron para cada uno de los parámetros el valor medio y el desvío estándar. El límite superior o inferior de cada parámetro del test se estableció sumando o restando el desvío estándar al valor medio, respectivamente.

Tabla 1. Descripción del pre-procesamiento y región espectral para calcular los parámetros del Test de Calidad.

Denominación	Elemento empleado	Región (cm ⁻¹)
Absorbancia máxima	Espectro original	1800 - 1600
Ruido	Derivada1°	2100 - 2000
Señal S₁ enlace peptídico	Derivada1°	1800 - 1600
Señal S₂ carbohidratos	Derivada1°	1200 - 960
Vapor de agua	Derivada1°	1847 - 1837
Fringing	Derivada1°	2200-2000
Cantidad de aceite	Espectro original	2930, 1650

2.1.1 Evaluación de la cantidad de aceite (λ)

Como se indicó previamente si bien este parámetro no estaba incluido en el test de calidad propuesto originariamente por el Dr. Dieter Naumann (Naumann, 2000), en nuestro caso debió desarrollarse a causa de la posible presencia de aceite en las muestras de sobrenadantes de cultivo. A pesar de los esfuerzos de los biólogos de PREGNA en tratar de retirar el sobrenadante de cultivo sin incluir el aceite, y luego de los procedimientos de centrifugación durante 5 min a 3000 rpm realizados en el Laboratorio de Biospectroscopía para buscar separarlo, un alto porcentaje de las muestras incluidas en el estudio contenían dicha contaminación.

Por lo anteriormente mencionado y para poder determinar la cantidad de aceite que tiene cada muestra se definió y evaluó el parámetro λ que representa el contenido relativo de lípidos/proteínas en las muestras. Este parámetro fue calculado entonces como se indicó en Métodos mediante la relación de las intensidades $\lambda = I_{2930} / I_{1654}$. La **Figura 11** muestra los espectros FTIR correspondientes a sobrenadantes de cultivo de embriones en los cuales se arrastraron distintas cantidades de aceite al tomar la muestra. En el caso de los espectros correspondientes al Embrión 2 del paciente 0001VQ (**Figura 11 (a)**) y al Embrión 3 del paciente 0003RC (**Figura 11 (b)**), los valores de λ obtenidos fueron de 0.49 y 0.42, respectivamente (ver sección Métodos). En la **Figura 11** se indica también el espectro FTIR correspondiente a un sobrenadante de cultivo para el cual no se había arrastrado aceite, mostrando un valor de λ de 0.11 (**Figura 11 (c)**). **Se determinó que de no poderse eliminar el aceite de los espectros por algún procedimiento matemático, los espectros que arrojaran un valor de $\lambda > 0.33$ serían descartados de la base de datos de referencia.**

Luego de evaluar todos los parámetros que incluye el QT se pudieron establecer los límites de aceptación del mismo (**Tabla 2**). A modo de ejemplo, en la **Figura 12** se indican los resultados de un test de calidad obtenido para un espectro. En la Tabla incluida en la figura se indican los valores máximos y mínimos admitidos por el test de calidad mencionados en la **Tabla 2** (*min* y *max*) y los valores medidos para el espectro analizado (*measured*).

El resultado de la evaluación del test de calidad puede ser $QT=0$, que indica que alguno de los parámetros no se ajusta a los requerimientos del test, o $QT=1$ que indica que el espectro ha cumplido con todos los requisitos de calidad.

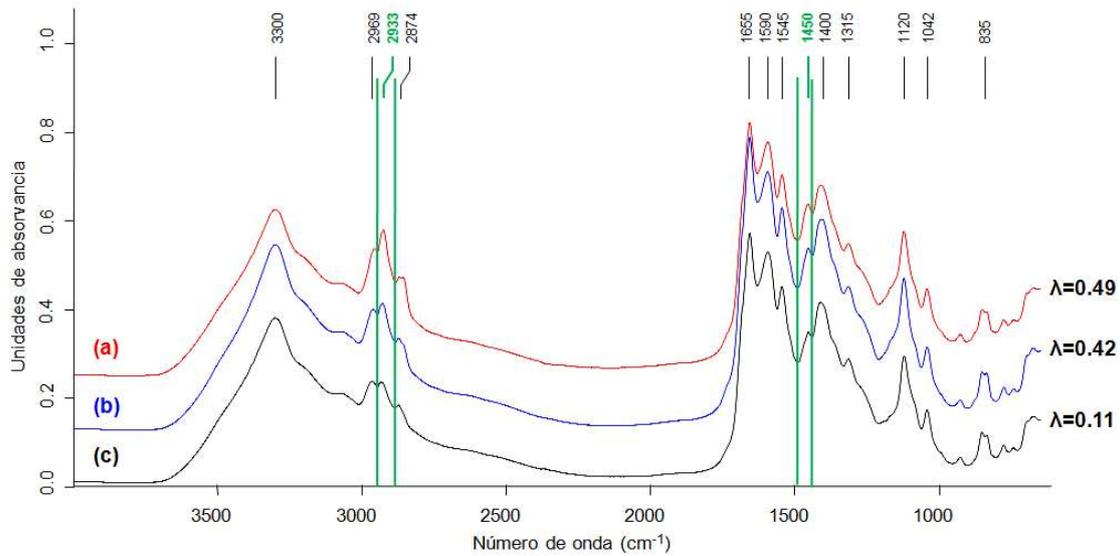


Figura 11. Espectros FTIR de sobrenadantes de cultivo de embriones humanos de 3 días de incubación. Se indica la interferencia en las zonas asignadas al estiramiento y balanceo del enlace C-H producida por el aceite –empleado para evitar la evaporación de los cultivos en las respectivas cámaras- en los espectros FTIR. λ es un parámetro cualitativo $\lambda = I_{2930}/I_{1654}$ donde I_{2930} representa la altura de las bandas de 2930 cm^{-1} e I_{1654} la altura de la banda de absorción a 1654 cm^{-1} .

Tabla 2. Parámetros establecidos para el QT aplicado a la evaluación de la calidad espectral de sobrenadantes de embriones de 3 días de cultivo.

Parámetro	1800-1600 Proteínas	1200-900 Carbohidratos	2100-2000	1847-1837	2200-2000	12930 /11654
ΔA mínima	0.125					
ΔA máxima	1.200					
Ruido máximo			0.00015			
Señal/ruido	250	170				
Vapor agua				0.0003		
Señal/Vapor agua	250	170				
Fringes					5×10^{-3}	
λ						<0.33

Quality Test Report		Values	
Test result ok/not ok [1/0]:		1	
Method file:	C:\OPUS_7.0.129\OpusLab\QT\QT PM3 .QT		
	min	max	measured
Absorption (X-Range 1):	0.125000	1.200000	0.550435
Noise (X-Range 4):		0.000150	0.000040
Signal/Noise (X-Range 2):	250.000000		446.278341
Signal/Noise (X-Range 3):	170.000000		217.193702
Water vapour (X-Range 5):		0.000300	0.000021
Signal/Water (X-Range 2):	250.000000		842.105492
Signal/Water (X-Range 3):	170.000000		409.833936
Fringes (X-Range 6):		0.000050	0.000039

Figura 12. Test de calidad espectral realizado por el software Bruker.

En base a la experiencia adquirida con las muestras de sobrenadantes de cultivo, podemos afirmar que los parámetros de mayor influencia sobre la calidad de los espectros y la reproducibilidad de los mismos son los relacionados con la recuperación de muestras libres de aceite y la obtención de un film homogéneo y transparente.

2.2 Normalización

El uso de espectroscopía IR en análisis de identificación y clasificación requiere algún tipo de normalización que permita una comparación efectiva a través del conjunto de muestras (Lasch., 2013). El método de normalización que resultó más efectivo de aplicar para este estudio es la normalización vectorial, por medio del cual se obtiene un espectro en el que la suma de todos los valores de absorbancia al cuadrado es igual a 1.

2.3 Aumento de resolución

A fin de aumentar el grado de resolución de los espectros y la capacidad de discriminación se calculó la derivada primera y segunda de los espectros las cuales fueron normalizadas vectorialmente en todo el rango espectral. Si bien la derivada primera es la que se suele usar en los análisis de muestras microbianas (Bosch y col., 2010; Rebbufo y col., 2008), al estudiar las características de las derivadas, se determinó que la derivada segunda fue aquella que brindaba mayor información a partir de los sobrenadante de

cultivo de embriones (**Figura 13**). El manejo de los datos a través de las segundas derivadas ofrece las siguientes ventajas: i) aumento de resolución ii) corrección de posibles modificaciones presentes en la línea de base, iii) resolución de las bandas que se solapan, iv) reducción de la variabilidad de replicación, v) amplificación de las variaciones de los espectros (Malek y col., 2014). Debido a lo descrito previamente no fue necesario realizar la corrección de línea de base antes de la aplicación de metodologías de pre-procesamiento.

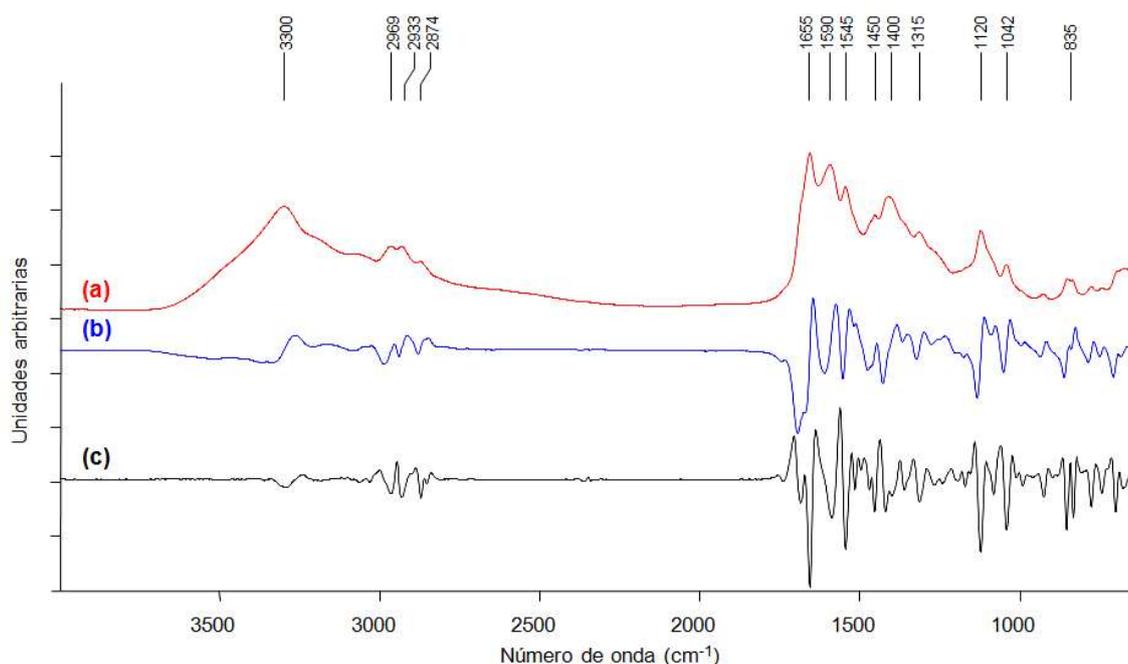


Figura 13. Espectro original (a), derivada primera (b) y segunda (c) normalizadas vectorialmente de un sobrenadante del cultivo de un embrión de 3 días de desarrollo.

2.4 Sustracción espectral

El procedimiento es relativamente sencillo ya que se realiza a través del software **Opus 7.0**, pero deben cumplirse algunos requisitos importantes. El primero es que las mediciones deben cumplir con la ley de Lambert y Beer. El segundo requisito es la independencia de las señales. Para dar un ejemplo, la eliminación de las bandas espectrales de los compuestos no deseados tendrá éxito sólo en los casos en que no haya interacción molecular entre los constituyentes de la muestra y el contaminante. En tercer

lugar, se requiere la ausencia de efectos ópticos distintos de absorción (dispersión). La sustracción espectral será válida únicamente en los casos en los cuales estos requisitos estén plenamente satisfechos.

Al analizar los espectros de diferentes lotes del aceite mineral puro empleado para cubrir los cultivos de embriones, se observó que éste presenta absorbancias IR en la región asociada a los enlaces -CH ($2953, 2922, 2854 \text{ cm}^{-1}$) y >CH_2 y >CH_3 de lípidos ($1460, 1376, 1304 \text{ cm}^{-1}$) y C-H del rocking del >CH_2 (722 cm^{-1}) (Naumann, 2000) (**Figura 14**). Dado que como se mencionó anteriormente existen ventanas espectrales donde los picos de absorción del aceite se superponían con los de absorción de los sobrenadantes de cultivo de embriones, se evaluó la posibilidad de restar el espectro del aceite al de los espectros de sobrenadante de cultivo, por medio de la sustracción espectral. Se ensayó dicha sustracción empleando el procedimiento indicado en la sección de Métodos pero los resultados no fueron satisfactorios. Los espectros obtenidos luego de la sustracción quedaban “deformados” en la región de Amida I, respecto a los espectros que no se había realizado dicha sustracción. Se llevaron a cabo entonces, ensayos sencillos de agregado de diferentes cantidades de aceite a medios de cultivo G1 Plus ($30 \mu\text{L}$ de medio + 1 gota de aceite) y se observaron los espectros obtenidos. Estos ensayos nos permitieron confirmar que la presencia de aceite en los medios de cultivo produce cambios en la región Amida I del espectro obtenido, mostrando que efectivamente el aceite podría estar causando una modificación conformacional de las proteínas del medio de cultivo alterando por tanto la región Amida I. **Se comprobó de este modo que la sustracción espectral no era un método válido para eliminar el aceite de los espectros de sobrenadantes de cultivo** ya que no cumplía uno de los requisitos para la aplicación de la sustracción como esta herramienta matemática.

Luego de ensayar diferentes operaciones matemáticas, finalmente concluimos que no iba a ser posible eliminar el espectro del aceite del espectro de sobrenadantes de cultivo. **De modo que se optó por evitar las ventanas de los lípidos en los análisis.** Si bien con esta solución se perdería información que podría ser interesante para analizar, consideramos prioritario eliminar regiones que podían causar variabilidad e interferencias. De modo que los estudios quemométricos se realizaron en las ventanas $1800\text{-}1600$ y $1280\text{-}730 \text{ cm}^{-1}$.

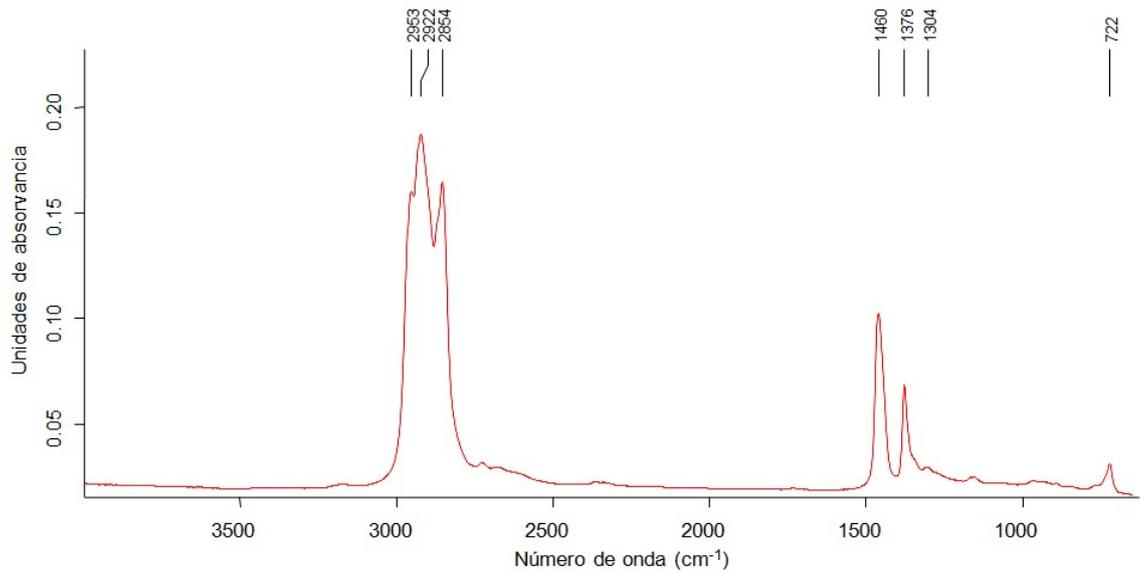


Figura 14. Espectro FTIR promedio del aceite empleado en la incubación de embriones (obtenido de 5 replicados).

Teniendo en cuenta las optimizaciones hasta aquí descritas, respecto a la toma de muestra y registro de espectros se elaboró un esquema que resume la metodología optimizada (**Figura 15**).

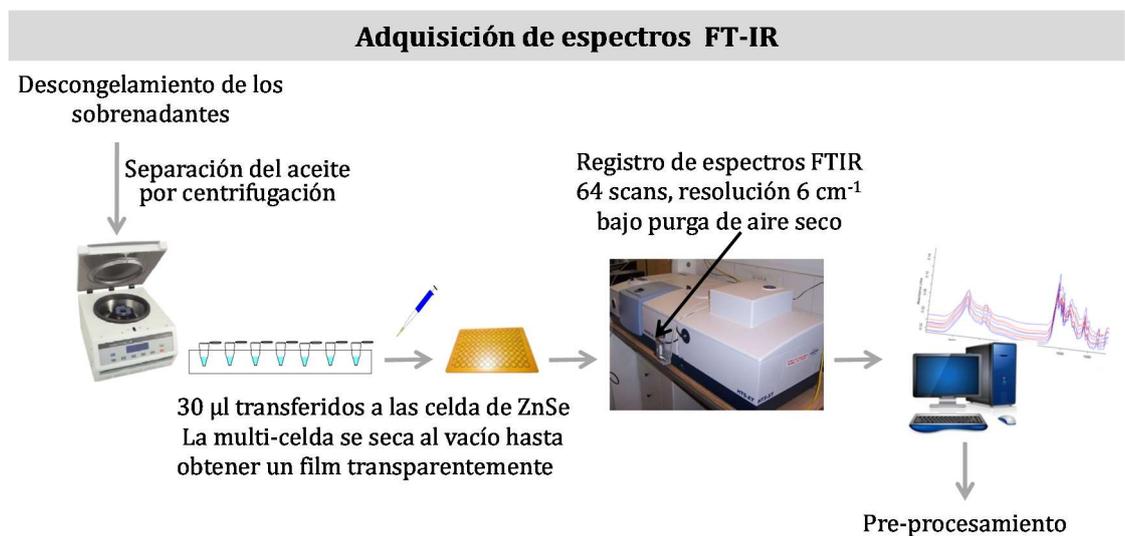


Figura 15. Esquema de los procedimientos realizados para la preparación de muestras y adquisición de espectros FTIR.

3 Construcción de la Librería o base de datos espectral

La base de datos FTIR contiene los espectros y sus correspondientes derivadas primeras y segundas normalizadas vectorialmente que superaron el QT. Antes de comenzar los análisis quemométricos los espectros incluidos en la librería fueron clasificados en grupos y clases (carpetas).

GRUPO A

Clase A: espectros de diferentes lotes de medio de cultivo G1 Plus. **59 espectros**

Clase B: espectros de diferentes lotes de medio de cultivo G2. **62 espectros**

Clase C: espectros de diferentes lotes de aceite. **30 espectros**

Clase D: espectros de medios de cultivo controles incubados bajo las mismas condiciones que los embriones (**Figura 16**). **90 espectros**

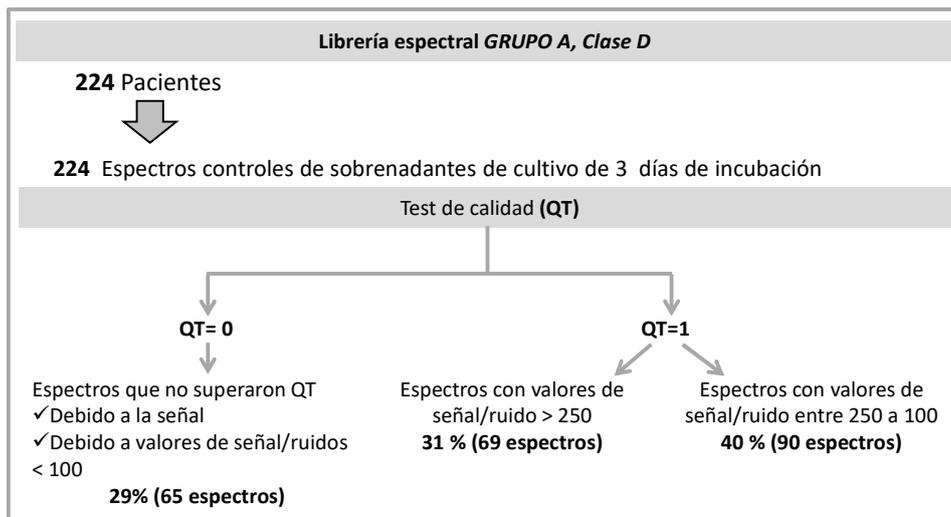


Figura 16. Esquema y organización de la Librería Espectral de sobrenadantes de cultivo de embriones *GRUPO A, Clase D*.

GRUPO B

Corresponde a los espectros de sobrenadante de cultivo de embriones desarrollados durante la totalidad del estudio, a partir de los cuales se generaron dos subgrupos.

GRUPO B1

Incluye los espectros de sobrenadante de cultivo de embriones que se transfirieron y los que no han sido transferidos, es decir aquellos que fueron o bien crio-preservados o transferidos a otro medio de cultivo para prolongar la incubación. Estos espectros se emplearon para realizar un estudio adicional que permitiría establecer si existe alguna asociación entre la MORFOLOGÍA de los embriones y la metabólica registrada a través de los espectros FTIR. Este grupo está dividido en 4 subgrupos o clases (I a IV) de acuerdo a la morfología registrada en el laboratorio PREGNA (Morfologías I a IV, respectivamente) (**Figura 17**).

Morfología I: **105 espectros**

Morfología II: **270 espectros**

Morfología III: **170 espectros**

Morfología IV: **40 espectros**

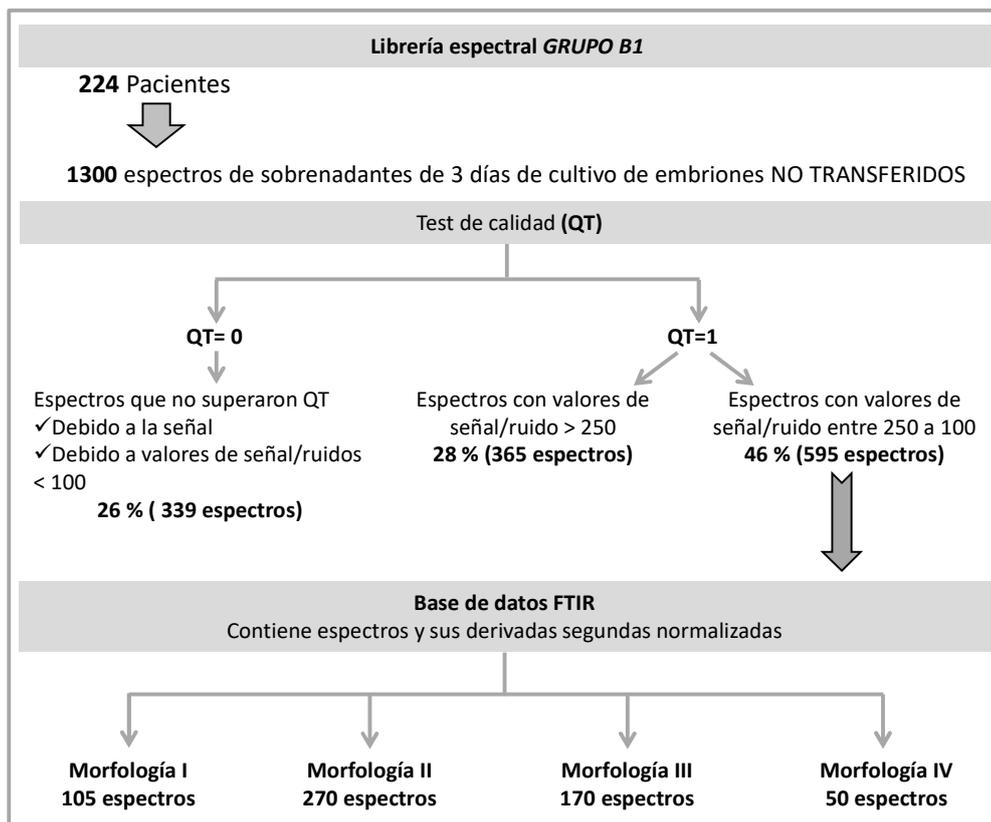


Figura 17. Esquema y organización de la Librería Espectral de sobrenadantes de cultivo de embriones *GRUPO B1*.

GRUPO B2 (**Figura 18**)

Clase I: Corresponde a los espectros de los sobrenadantes de cultivo de embriones que provienen de una transferencia en la que TODOS los embriones transferidos implantaron (**23 espectros**).

Clase II: Incluye los espectros de los sobrenadantes de cultivo de los embriones correspondientes a una transferencia en la que un embrion implantó y el otro no implantó (**15 pares, 30 espectros**).

Clase III: Corresponde a los espectros de sobrenadantes de cultivo de embriones que provienen de una transferencia en la que NINGUNO de los embriones transferidos implantaron (**111 espectros**).

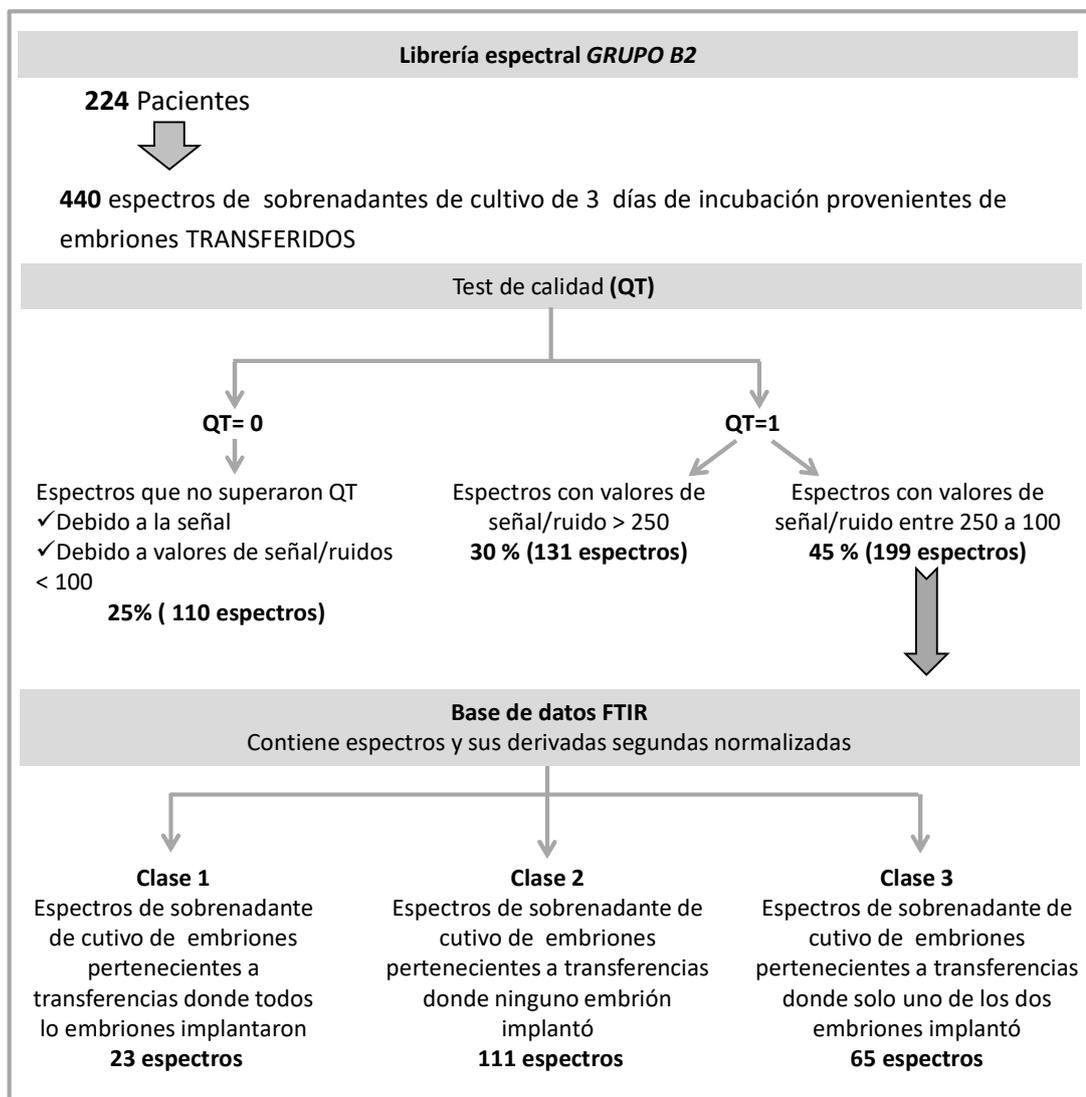


Figura 18. Esquema y organización de la Librería Espectral de sobrenadantes de cultivo de embriones.

4 Estudios de reproducibilidad o variabilidad

Se estudió la homogeneidad, o similitud dentro de cada grupo de muestras analizando la “distancia espectral (D)”. Un conjunto de espectros caracterizados por una distancia espectral media pequeña ($d < 25$) indica que es una población homogénea, con poca varianza o dispersión, mientras que un conjunto de espectros caracterizado por una distancia espectral grande indica que es un grupo heterogéneo, con gran diversidad. Estos criterios fueron establecidos en los años 90 cuando se comenzó con el análisis de discriminación de diferentes tipos de muestras biológicas (Naumann, 2000)

4.1 Análisis de variabilidad en los espectros registrados en los pocillos del plato de ZnSe

El registro de espectros de los 96 pocillos con los que cuenta el plato de ZnSe, registrados bajo condiciones estandarizadas tiene una duración de 1.3 h. A fin de analizar si durante el transcurso de la lectura entre la primera y última medida se produce algún efecto (resecado de las muestras, cambios eléctricos, desvío de las línea de base, cambio de vapor de agua en la cámara de lectura, etc.), se cargaron los 96 pocillos con medio de cultivo G1 Plus (la misma muestra e igual volumen en todos los pocillos) y se evaluaron los espectros obtenidos.

La reproducibilidad de los registros se calculó sobre las derivadas segunda de los espectros teniendo en cuenta la totalidad de las ventanas espectrales (3000-2800, 1800-1550, 1500-1250, 1200-900 cm^{-1}), según lo descrito en la sección de Materiales y Métodos (6.1.2.1.1 Análisis de cluster no supervisado). Brevemente, los cálculos se realizaron utilizando el método *Normal to replevel* (Software Opus 7.0) y los dendrogramas se construyeron mediante el algoritmo *Av. Linkage*.

El análisis de cluster muestra que la distancia espectral entre las medidas es menor a 14 y que no agrupan en orden de registro (en el primer cluster se agruparon el registro de la muestra 1 con la muestra 84), demostrando que los espectros no presentan características diferentes según el momento de medida o el sector del plato considerado. **(Figura 19).**

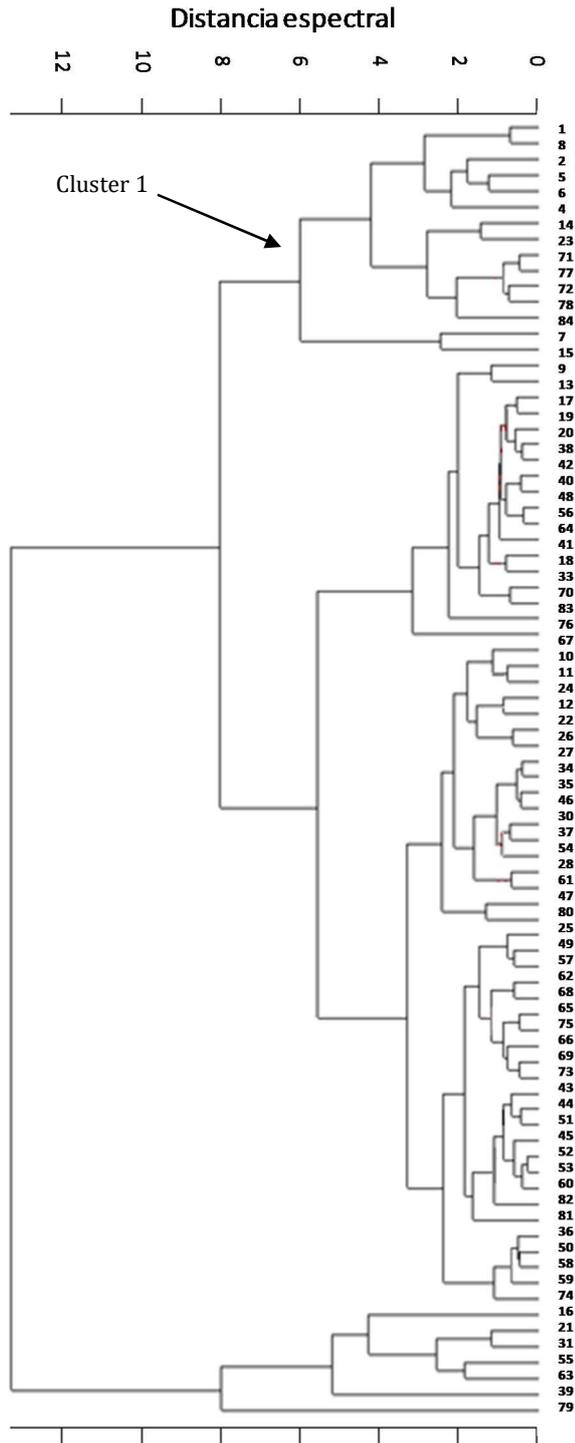


Figura 19. Análisis de cluster de las derivadas segundas de espectros de medio de cultivo G1 Plus registrados en una misma lectura de la celda de ZnSe. Las regiones espectrales consideradas fueron: 3000-2800, 1800-1550, 1500-1250, 1200-900 cm^{-1} , el método de cálculo fue *Normal to replevel* y el dendrograma se construyó aplicando el algoritmo *Av. Linkage*.

4.2 Análisis de la variabilidad del medio de cultivo proveniente de diferentes muestras y lotes

Un mismo lote de medio de cultivo puede estar abierto y mantenerse en condiciones óptimas en el laboratorio de fertilización por 15 días, es por ello que se analizó la variabilidad espectral en un mismo frasco abierto y mantenido en el laboratorio. Se evaluó si hubo cambios químicos globales sensibles a la espectroscopía FTIR en los diferentes lotes de medio que se compraron durante el transcurso del proyecto. Para tal fin se midió la reproducibilidad en todo el rango espectral a través de la distancia D , para las diferentes partidas de medio de cultivos adquiridos.

La reproducibilidad se calculó sobre las derivadas segunda de los espectros teniendo en cuenta la totalidad de las ventanas espectrales (3000-2800, 1800-1550, 1500-1250, 1200-900 cm^{-1}), según lo descrito en la sección de Materiales y Métodos (6.1.2.1.1 Análisis de cluster no supervisado).

4.2.1 Variabilidad espectral en un mismo lote de medio de cultivo G1 Plus

En el análisis de cluster realizado con las muestras tomadas de cada lote de medio de cultivo G1 Plus, el nivel de distancia espectral máxima encontrada fue de hasta 25 en los casos más extremos. En ningún caso se observa una separación según las fechas de toma de muestra. En la **Figura 20** se muestran los AC obtenidos para tres lotes de cultivos (A756, A808, B470).

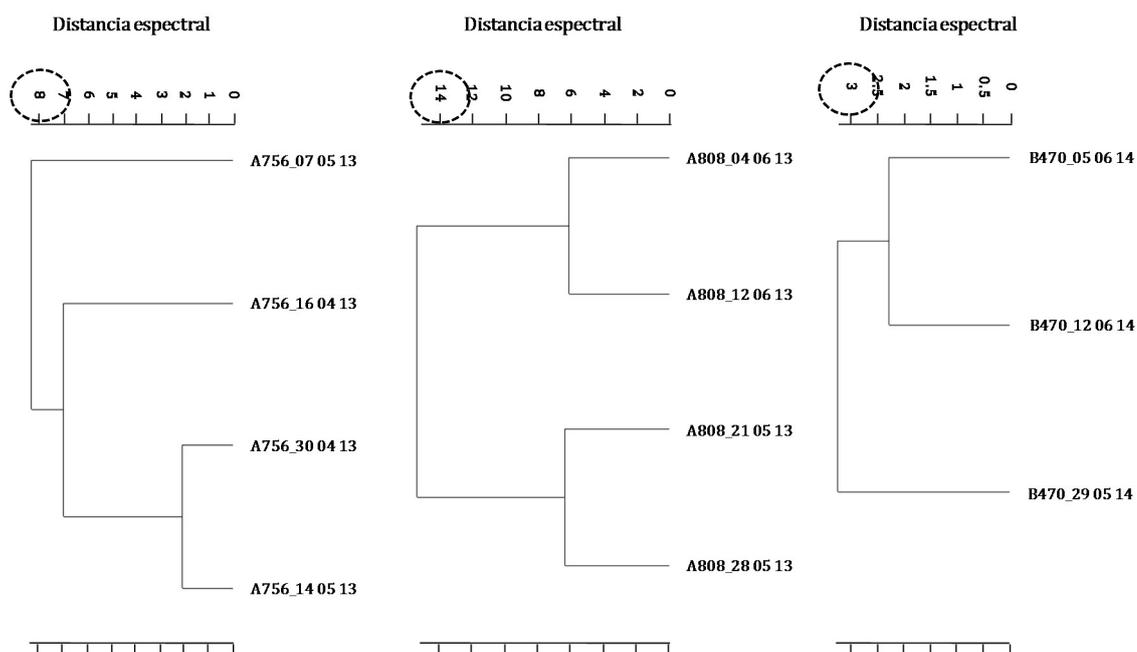


Figura 20. Análisis de cluster de 3 lotes de medio y cultivo G1 Plus (A756, B001, B470). Las regiones espectrales consideradas fueron: 3000-2800, 1800-1550, 1500-1250, 1200-900 cm^{-1} , el método de cálculo fue *Normal to replevel* y el dendrograma se construyó aplicando el algoritmo *Av. Linkage*. Las distancias espectrales máximas encontradas para estos lotes de medio de cultivo fueron de 8 (lote A756), 14 (lote A808) y 3 (lote B470) (se muestran encerradas en un círculo).

4.2.2 Variabilidad espectral entre diferentes lotes de medio de cultivo G1 Plus

Teniendo en cuenta que durante el transcurso de la investigación se emplearon varios lotes de medio de cultivo para embriones resultó necesario evaluar la variabilidad entre ellos a fin de determinar si las posibles varianzas entre los lotes de medio de cultivo podrían enmascarar las diferencias entre sobrenadaste de embriones.

La variabilidad entre la primera y última muestra tomada para los diferentes lotes de medio de cultivo se evaluó por análisis de cluster. A partir de los espectros se calculó la derivada segunda y teniendo en cuenta la totalidad de las ventanas espectrales (3000-2800, 1800-1550, 1500-1250, 1200-900 cm^{-1}), se realizaron los cálculos utilizando el método *Normal to replevel* (Software Opus 7.0) y los dendrogramas se construyeron mediante el algoritmo *Av. Linkage* (**Figura 21**).

Para el análisis de 79 espectros de diferentes lotes de medio de cultivo G1 Plus (muestras tomadas desde el 8.09.2012 primera extracción hasta 24.10.2014, última extracción, **Tabla 3**) se pasaron de formato *.0* (Software Opus) a *CSV* (Software

PyChem) y se ingresaron al software **PyChem**. El Análisis de Componente Principal se calculó sobre la derivada de los espectros en las regiones 3000-2800, 1800-1550, 1500-1250, 1200-900 cm^{-1} utilizando el método NIPALS (**Figura 22**).

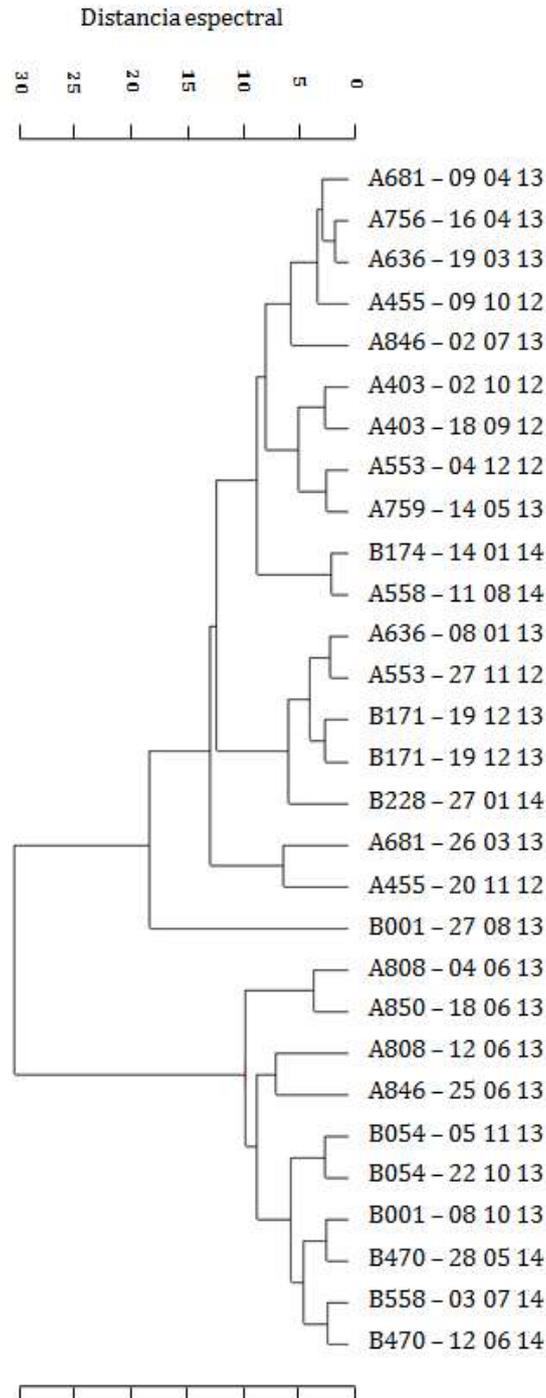


Figura 21. Análisis de cluster de 2 muestras de cada lote de medio (primera y última extracción) de cultivo G1 Plus. Las regiones espectrales consideradas fueron: 3000-2800, 1800-1550, 1500-1250, 1200-900 cm^{-1} , el método de cálculo fue *Normal to replevel* y el dendrograma se construyó aplicando el algoritmo *Av. Linkage*.

Tabla 3. Lotes de medio de cultivo utilizados a lo largo del ensayo que superaron el QT análisis.

LOTE	AÑO	Nº de muestras
A 403	2012	3
A 455	2012	10
A 553	2012	2
A 636	2013	12
A 681	2013	2
A 756	2013	3
A 808	2013	4
A 846	2013	2
A 850	2013	1
B 001	2013	3
B 054	2013	2
B 171	2013	3
B 174	2014	1
B 228	2014	1
B 470	2014	3
B 558	2014	7

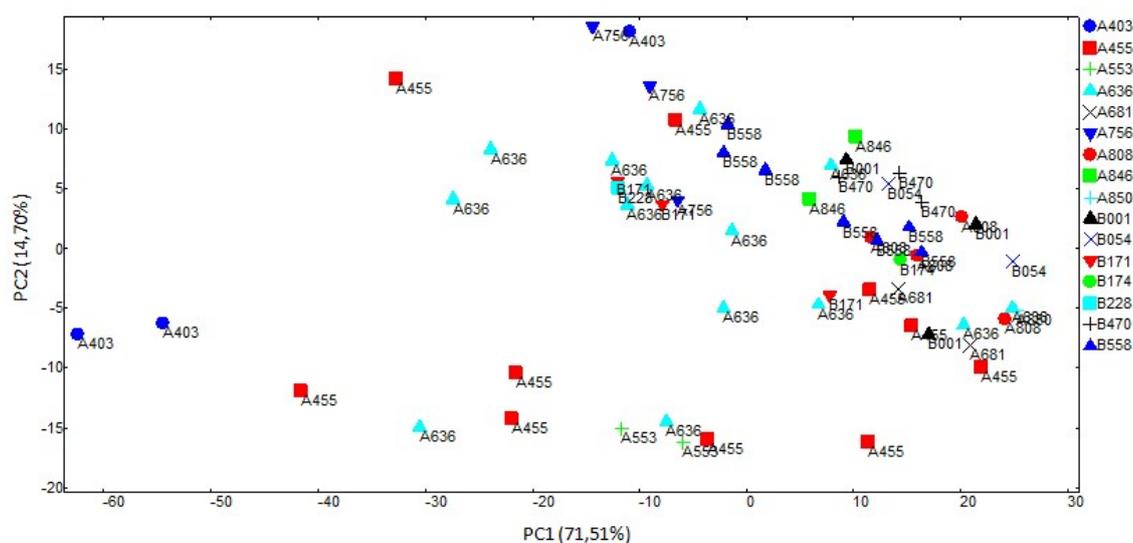


Figura 22. ACP Score plot (PC1 vs PC2) de los espectros de diferentes lotes de medio de cultivo, realizado en las regiones espectrales 3000-2800, 1800-1550, 1500-1250, 1200-900 cm^{-1} con los espectros derivados linealmente, normalizadas vectorialmente.

En el AC (**Figura 21**) las muestras no agrupan según el lote de medio de cultivo ni el momento de toma de muestra, en el ACP (**Figura 22**) en el cual todas las muestras de los diferente lotes de medio de cultivo fueron evaluadas la distribución de éstas es

levemente al azar, mientras que para algunas muestras de lotes hay un cierto acercamiento, en otros se observa lo contrario.

4.3 Análisis de heterogeneidad de los espectros dentro de cada clase

La variabilidad de los espectros de sobrenadantes de embriones que implantaron y los que no implantaron se evaluó por AC. A partir de los espectros se calculó la derivada segunda y teniendo en cuenta las ventanas espectrales donde la presencia de aceite no interfiere (1800-1600, 1280-730 cm^{-1}), se realizaron los cálculos utilizando el método *Normal to replevel* (Software Opus 7.0) y los dendrogramas se construyeron mediante el algoritmo *Av. Linkage*.

Los espectros de los sobrenadantes de cultivo de embriones que provienen de una transferencia en la que todos los embriones transferidos implantaron (Clase I) presentaron una varianza espectral de 11.70 ± 7.00 (**Figura 23**), mientras que los espectros de donde no implantaron mostraron una varianza de 21.98 ± 16.97 (**Figura 24**), indicando que ambas muestras son homogéneas. Esto muestra una relativa homogeneidad entre los espectros del medio de cultivo de los embriones que implantaron y una mayor diversidad dentro de los que no implantaron. Estos resultados podrían sugerir que los embriones que implantaron estarían respondiendo a una metabolómica determinada, bastante similar entre sí. Mientras que los que no implantaron tuvieron una metabolómica más dispersa, un *fingerprinting* metabólico muy diferente unos de otros, quizás por diferentes “alteraciones” que llevan a diferentes metabolómicas. Es decir que podría estar mostrando la gran diversidad de fenotipos o metabolómicas que llevan a la no implantación.

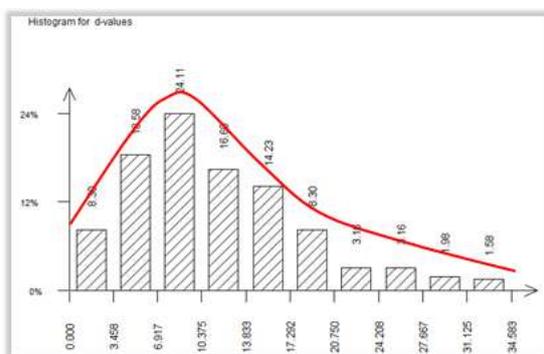


Figura 23. Distribución de valores de distancia espectral de los espectros de sobrenadantes de medio de cultivo del *Grupo B2*, Clase I (implantaron todos los embriones transferidos)

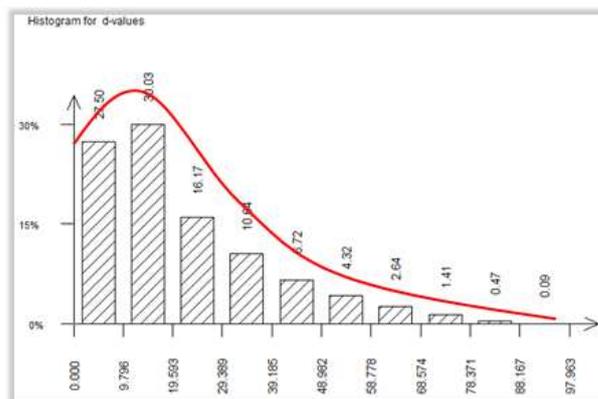


Figura 24. Distribución de valores de distancia espectral de los espectros de sobrenadantes de medio de cultivo del *Grupo B2*, Clase III (no implantó ninguno de los embriones transferidos).

5 Análisis espectral

Durante su crecimiento en medios de cultivo los embriones obtenidos por fertilización consumen sustratos y producen metabolitos que son liberados al medio de cultivo (Gardner y col., 2013). Nuestra hipótesis de trabajo es que los espectros IR registrados de los sobrenadantes del cultivo constituyen un *fingerprinting* metabólico que permitiría detectar la presencia de marcadores bioquímicos en los sobrenadante de cultivos de embriones asociados a su potencial de implantación

En los espectros registrados en este estudio los modos vibracionales de la región de 3400 cm^{-1} corresponden al estiramiento O-H del agua. Las principales características espectrales de la región W1 (entre $2800\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$), fueron las bandas detectadas en 2969 y 2874 cm^{-1} , asignadas a las vibraciones anti-simétrica y simétrica de estiramientos de $-\text{CH}_3$ y la banda 2933 cm^{-1} asignada a estiramientos anti-simétricos de $-\text{CH}_2$ (Naumann, 2000). Los espectros en la región asociada a proteínas (W₂) exhibieron bandas de Amida I y Amida II con picos en 1655 y 1545 cm^{-1} respectivamente. La región mixta de $1460\text{-}1110\text{ cm}^{-1}$, contiene la información de ácidos grasos, polisacáridos, ácidos nucleicos y proteínas. También en el intervalo entre $1200\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ se encuentran modos vibracionales de polisacáridos (**Figura 25**).

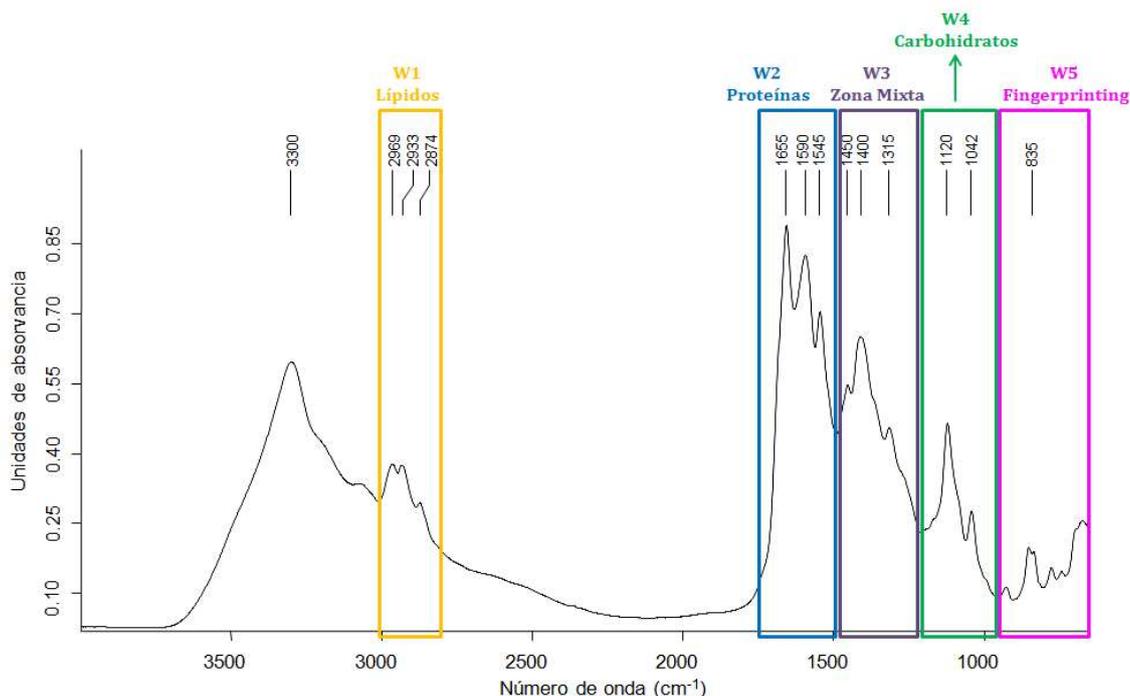


Figura 25. Espectro FTIR del sobrenadante de cultivo de embriones humanos de 3 días de incubación. Se indican las principales ventanas espectrales y las asignaciones de bandas de absorción correspondientes a los principales constituyentes moleculares en cada región.

5.2 Estudio de la asociación entre la morfología de los embriones de 3 días de incubación y la metabolómica

Desde el inicio de la aplicación de las técnicas de reproducción asistida, la morfología embrionaria ha sido el método de elección para determinar la “calidad” de los embriones, y por lo tanto el parámetro a tener en cuenta para seleccionar aquellos que serán transferidos a la madre. Como se indicó en la sección de Materiales y Métodos, en el año 2011 en el marco del Congreso Europeo de Reproducción Asistida realizado en la ciudad de Estambul los especialistas en fertilización *in vitro* establecieron un consenso mundial que permitió aunar los criterios de clasificación y selección de embriones previo a su transferencia. El laboratorio de embriología de la Clínica de Fertilización PREGNA, ha empleado estos criterios para la evaluación de los embriones previo a su transferencia a la madre. Teniendo en cuenta estos criterios fueron ingresados a la base de datos de **OpenClinica** las morfologías observadas por microscopía de todos los embriones, transferidos y no transferidos. Es decir de los 595 espectros de sobrenadante de cultivo

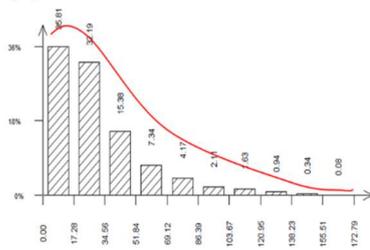
de embriones almacenados en la librería espectral se tienen registradas sus morfologías correspondientes.

Analizamos entonces si existe alguna correlación entre las características morfológicas de un embrión y su metaboloma analizado por FTIR. Para ello primeramente se analizó la heterogeneidad de los espectros de sobrenadantes de embriones agrupados según morfología (**Tabla 4, Figura 26**). Empleando las derivadas segundas normalizadas y teniendo en cuenta la totalidad de las ventanas espectrales donde la presencia de aceite no interfiere ($1800-1600$, $1280-730\text{ cm}^{-1}$), se realizaron los cálculos utilizando el método *Normal to replevel* (Software Opus 7.0). Como indica la **Figura 26**, las muestras incluidas en cada grupo según la morfología embrionaria presentaron una gran variabilidad.

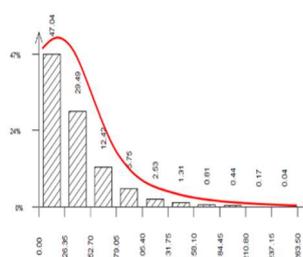
Tabla 4 Valores de distancia espectral de los espectros de sobrenadantes del cultivo de embriones agrupados según la morfología embrionaria.

Morfología	X-Means of D-Values
I	$76,23 \pm 48,66$
II	$71,16 \pm 50,87$
III	$78,73 \pm 54,28$
IV	$91,86 \pm 69,74$

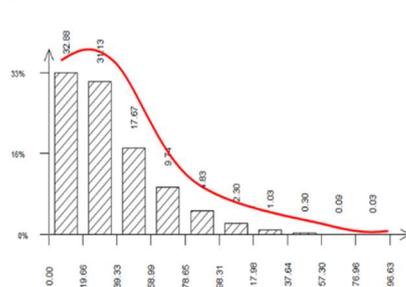
(a) M I



(b) M II



(c) M III



(d) M IV

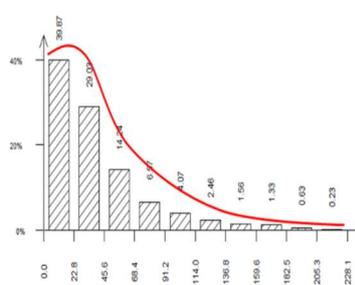


Figura 26. Histogramas del análisis de varianza de los diferentes grupos de morfología. (a) M I: Morfología 1, (b) M II: Morfología 2, (c) M III: Morfología 3, (d) M IV: Morfología 4.

Para estudiar si existen relaciones entre las características morfológicas de un embrión y su metaboloma se realizó un análisis factorial (AF) en las regiones espectrales 1800-1600 y 1280-730 cm^{-1} utilizando el software **Opus 7.0** (**Figura 27**).

Según los resultados obtenidos mediante el AF no fue posible hallar una asociación entre la morfología de los embriones registrada microscópicamente y la metabolómica observada a través de espectroscopía FTIR (**Figura 27**). Esto era de esperar dado la gran variabilidad o varianza encontrada en los grupos correspondientes a cada morfología. Estos resultados estarían indicando que la morfología no estaría asociada a la metabolómica. En otras palabras que embriones de morfología I, con sus células enteras, de tamaño acorde al estadio y sus núcleos intactos, no necesariamente tienen un metabolismo similar. Lo mismo sucede para los embriones de morfología II y III, indicando entonces que embriones de una misma morfología no responden a un patrón determinado de metabolismo. Es decir que **la morfología no parecería estar asociada a la metabolómica y por lo tanto a la probabilidad de implantación.**

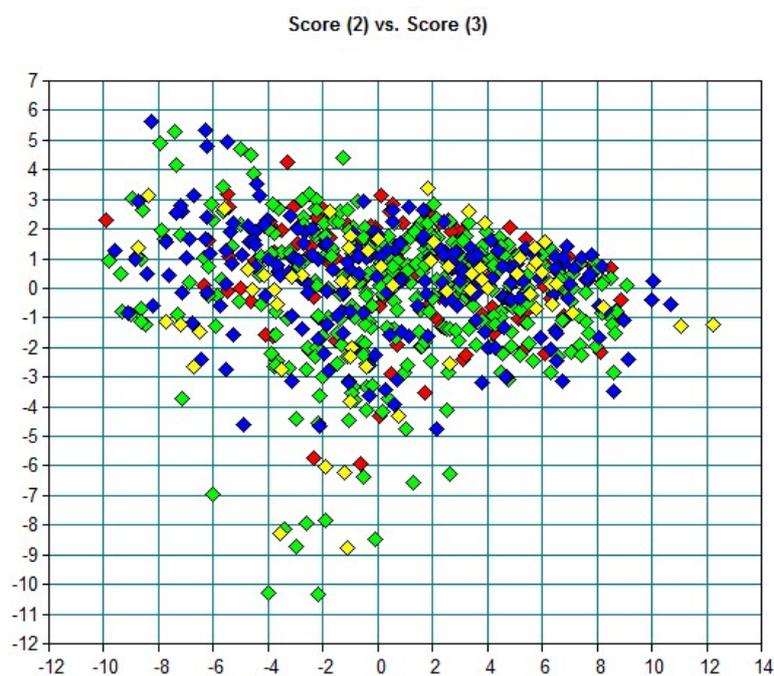


Figura 27. AF (Score 2 vs. Score 3) de espectros de sobrenadantes de cultivo de embriones según la morfología descrita durante su desarrollo. El análisis se realizó con la derivada segunda normalizada de los espectros en las regiones espectrales 1800-1600, 1280-730 cm^{-1} , por medio del método de factorización (Software Opus 7.0).

Referencias: Morfología I (rojo), Morfología II (verde), Morfología III (azul), Morfología IV (amarillo).

Estos resultados coinciden con lo expresado por Seli y col. (2009) que validan el concepto de que un metabolismo diferente es evidente en embriones viables y no viables y que embriones de la misma morfología pueden diferir en su actividad metabólica medida a través de los espectros NIR de los sobrenadantes de cultivo.

Esto también fue confirmado a través de diferentes estudios realizados por Vergouw y col. (2012) y Sfontouris y col. (2013) y un meta-análisis realizado también por Vergouw y col. (2014), quienes mostraron que el estudio de la viabilidad embrionaria combinando datos morfológicos y perfiles metabólicos de medio de cultivo obtenido mediante la técnica de espectroscopía NIR no permite incrementar las tasas de embarazos en los ciclos de FIV. Incluso en un estudio realizado por Hardarson y col. (2012) llegan a las mismas conclusiones.

Lo expresado anteriormente cobra mayor relevancia al considerar lo reportado por Magli y col. (2000), quienes informaron que embriones de 3 días de desarrollo que presentaban morfología “normal” pueden ser cromosómicamente anormales (Magli y col., 2000). Inclusive más recientemente en un interesante estudio realizado en 2013 por Mertzaniidou y col., donde se analizó el genoma completo de embriones, se presentó evidencia de que alrededor del 70% de los embriones de buena calidad portan anomalías cromosómicas, incluyendo aberraciones estructurales.

El método tradicional de selección de embriones por criterios morfológicos y tasa de división se ha convertido en un tema de debate entre expertos. La preocupación principal es la dependencia exclusiva de algunas evaluaciones predeterminadas de morfología estática y el considerable grado de variabilidad intra e inter-observador en la clasificación de embriones entre embriólogos con experiencia (Baxter Bendus y col., 2006; Paternot y col., 2009). La incapacidad de la evaluación morfológica para predecir con exactitud el potencial reproductivo de un embrión individual es lo que ha llevado a la búsqueda de nuevas herramientas de selección de embriones.

5.3. Desarrollo de métodos basados en FTIR para determinar el potencial de implantación de embriones

Con la finalidad de extraer la información contenida en los espectros vibracionales a fin de establecer asociaciones e inferencias o discriminaciones entre las muestras de sobrenadantes de cultivos de 3 días se emplearon métodos sencillos de búsqueda de picos y bandas asociadas a metabolitos y métodos estadísticos multivariados sofisticados. Se

emplearon técnicas estadísticas supervisadas, conocidas por proporcionar índices de clasificación/identificación o cuantificación a un gran conjunto de muestras y/o variables de respuesta (Berrueta y col., 2007) no supervisadas, conocidas como técnicas exploratorias multivariadas (Correia y Ferreira, 2007)

5.3.1 Desarrollo de métodos de discriminación basados en la presencia de marcadores espectrales asociados a la implantación

Las vías metabólicas en las células captan ciertas sustancias del ambiente y liberan productos al espacio extracelular donde son cultivados. Por lo tanto, la recuperación y estudio de los medios de cultivo debería proporcionar información que refleje las actividades celulares y el potencial de desarrollo general durante el período de cultivo. La relación entre la viabilidad del embrión y la actividad metabólica se informó por primera vez en 1980 por Renard y col. (1980). La gama de metabolitos que se han ensayado por diferentes técnicas cromatográficas fue amplia. En estudios **metabólicos dirigidos** se han reportado que los principales metabolitos relacionados a la viabilidad embrionaria son los sustratos asociados a energía, tales como glucosa y piruvato, y la formación de lactato y amonio como subproductos del metabolismo en sobrenadantes de cultivo de embriones que implantaron y que no implantaron (Brison y col., 2004; Brison y col., 2007; Gardner y col., 2011; Gardner y col., 2013; Houghton y col., 2002; Leese, 1987).

Consideramos entonces los espectros de los sobrenadantes de cultivo de los embriones transferidos que implantaron (Clase I de la base de datos espectral) y los espectros de sobrenadantes de cultivo de embriones que no implantaron (Clase III de la base de datos espectral). Tomamos los espectros y sus derivadas segundas normalizadas. A simple vista pare el ojo del operador ni los espectros crudos ni sus derivadas presentaban diferencias en ninguna ventana espectral (**Figura 28**).

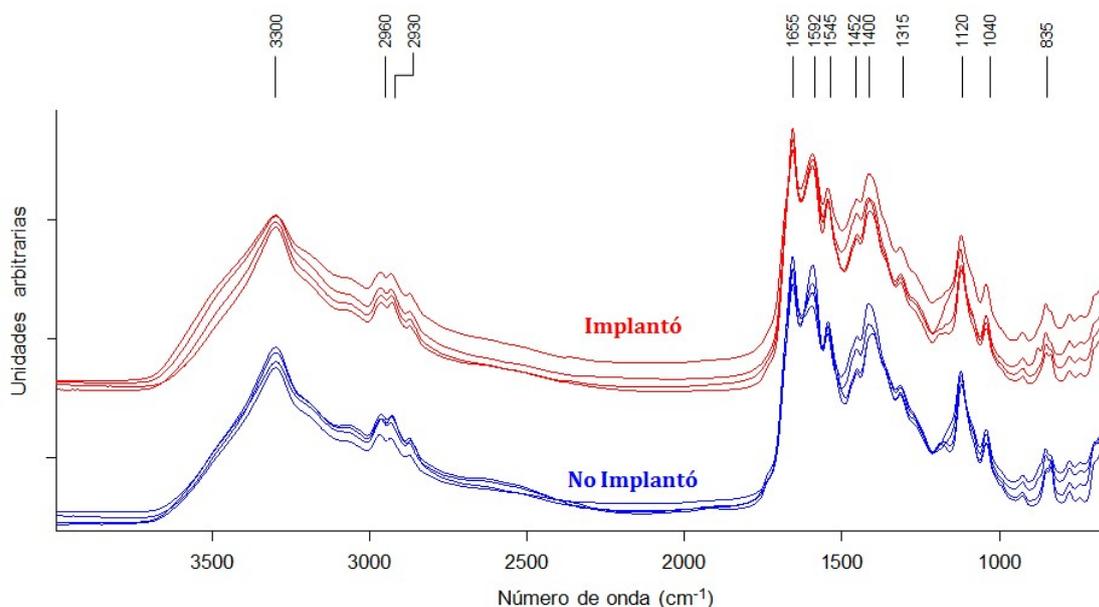


Figura 28. Espectros de sobrenadantes de cultivo de embriones que implantaron y no implantaron. Espectros FTIR rojos: corresponden a sobrenadante de cultivo de embriones que implantaron; espectros FTIR azules: corresponden a espectro de sobrenadante de cultivo de embriones que no implantaron.

Se aplicó entonces el análisis de cluster supervisado (ACS) como una primera aproximación para la discriminación espectral supervisada, orientando el análisis a las ventanas donde absorben los principales compuestos asociados al metabolismo activo de los embriones. Para ello se elaboró una reseña de los modos vibracionales correspondientes a carbohidratos, piruvato, lactato y aminoácidos (**Tablas 5 y 6**). También se ha descrito que los lípidos (ácidos palmíticos, oleico y linoleico) podrían participar en esta diferenciación pero dado que las ventanas de lípidos las hemos ignorado en nuestro análisis por la interferencia del aceite mineral, estas no fueron consideradas. En las **Tablas 6 y 7** se indican los picos asignados a los diferentes compuestos y las referencias de donde se tomaron.

Tabla 5. Carbohidratos y otros metabolitos liberados por el embrión al medio de cultivo y sus respectivas asignaciones de modos vibracionales en infrarrojo medio.

CARBOHIDRATOS y otros metabolitos	Picos FTIR (cm^{-1})	Asignación	Referencias
Piruvato	1730 1350 1210 1150 1020 980		Extraídos de un espectro de piruvato
Lactato	1211(1297-1163) 1127 (1163-1107) 1097 (1107-1065) 1046 (1065-1006)	C-O est.	Petibois y col.,1999
Glucosa	1033 (1062-997) 1080 (1100-1065)	C-O est.	

Teniendo en cuenta los modos vibracionales correspondientes a los diferentes metabolitos se elaboraron distintos análisis de cluster. Se fueron seleccionando distintas ventanas en base a las absorciones de las **Tablas 5 y 6**. Se ensayaron entre ellas las ventanas $(1800-1700) \text{ cm}^{-1}$, $(1500-1400) \text{ cm}^{-1}$, $(1490-1300) \text{ cm}^{-1}$, $(1200-900) \text{ cm}^{-1}$, solas y combinadas de a pares o de a tres. Se realizaron los cálculos de las distancias por *Scaling to 1st range* (Coeficiente de correlación de *Pearson*). Los resultados sin embargo no mostraban discriminación entre los espectros de Clase I y Clase III. La **Figura 29** muestra 2 ejemplos de análisis de cluster realizados en ventanas espectrales y procedimientos de cálculo diferentes. En ambos ejemplos se observan que los grupos discriminados indicado como el grupo 1 y 2, **no están asociados a la implantación**.

Tabla 6. Aminoácidos liberados por el embrión al medio de cultivo y sus respectivas asignaciones de modos vibracionales en infrarrojo.

AMINOACIDOS	Stuart; 1997		Barth y Zscherp; 2002	
	Picos FTIR	Asignación	Picos FTIR	Asignación
Alanina (Ala)	1465	CH ₂ bal.		
Valina (Val)	1450	CH ₃ bal. asim.		
Leucina (Leu)	1375			
Serina (Ser)	1350-1250	O-H defor.	1420-1181 1030 983	COH o CO ² H bal., CO est. C-O est. CO Est., CO ² H bal.
Asparagina (Asn)	1650	C=O est.	1677-1678 1622- 1612	C=O est. NH ₂ bal.
Arginina (Arg)			1695-1625 1663- 1614	CN ₃ H ₅ ⁺ est. asim. CN ₃ H ₅ ⁺ est. sim.
Glutamina (Gln)	1615	NH ₂ bal.	1410 1610-1586 1668- 1687	CN est. NH ₂ bal. C=O est.
Lisina (Lys)	1640-1610; 1550-1485 1160-1100	NH ₃ ⁺ defor. NH ₃ ⁺ rocking	1629-1626 1527- 1526	NH ₃ ⁺ bal. as. NH ₃ ⁺ bal. sim.
Aspartato (Asp)	1720 (ac. aspártico)	C=O est.	1716 1579-1574 1402	C=O est. COO ⁻ est. as. COO ⁻ est. sim.
Glicina (Gly)	1670 1410			
Glutamato (Glu)	1560 1415 (ac. glutámico)	CO ₂ ⁻ est. asim CO ₂ ⁻ est. sim.	1712 1560-1556 1404	C=O est. COO ⁻ est. as. COO ⁻ est. sim.
Asp + Glu			1450-1264 1253- 1160	C-O est.

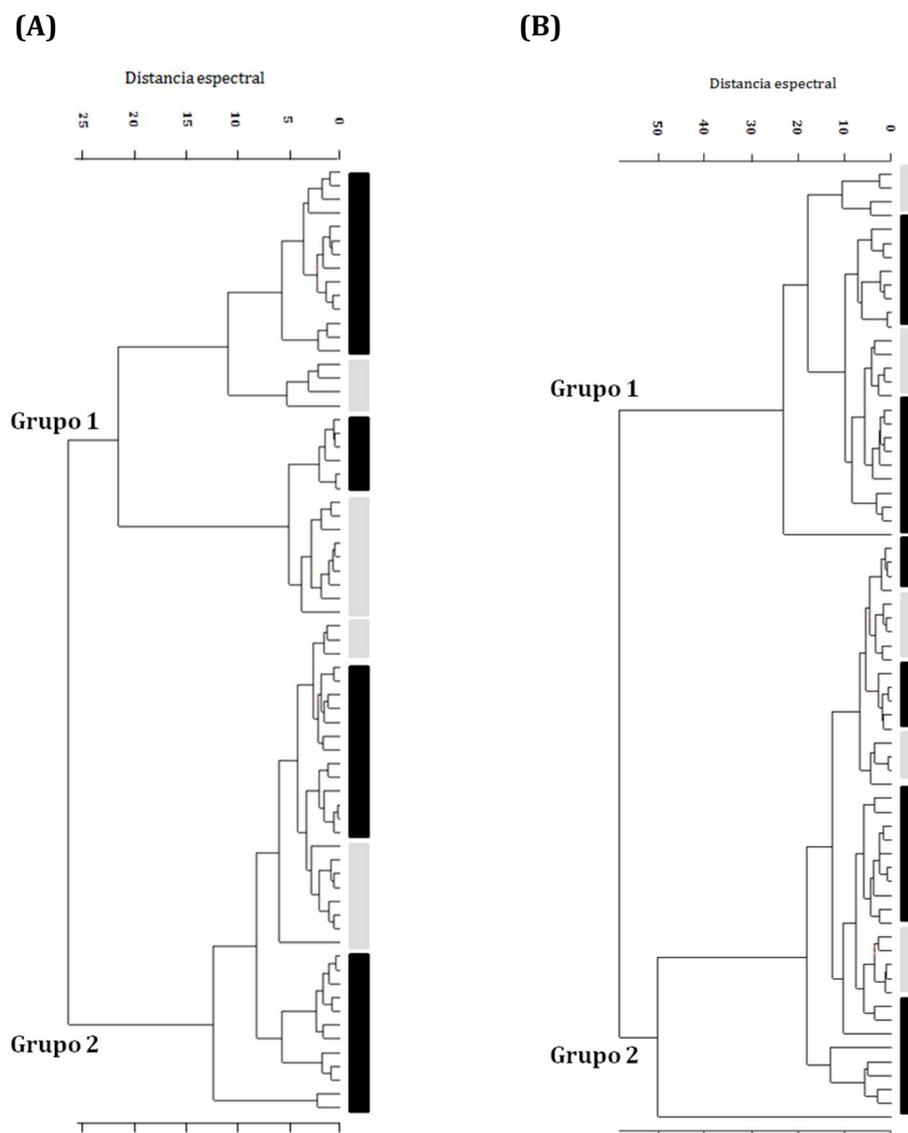


Figure 29. Análisis de cluster supervisado de espectros de sobrenadante de cultivo de embriones de Clase I (implantaron: gris) y Clase III (no implantaron: negro). **(A)** La región espectral considerada es la asociada a aminoácidos: $1750-1600\text{ cm}^{-1}$, el método de cálculo fue *Normal to reprolevel* y el dendrograma se construyó aplicando el algoritmo *Av. Linkage*. **(B)** La región espectral considerada es la asociada a carbohidratos: $1250-900\text{ cm}^{-1}$, el método de cálculo fue *Scaling to 1st range* y el dendrograma se construyó aplicando el algoritmo *Av. Linkage*.

Se ensayaron ventanas espectrales más pequeñas por ejemplo las asociadas a piruvato, o la glucosa ($1700-1730\text{ cm}^{-1}$) con ($100-950\text{ cm}^{-1}$) pero los cálculos de distancias espectrales por *Scaling to 1st range*, *Normal to repro level* producían artificios matemáticos otorgando resultados erróneos.

Por lo tanto, en este contexto no fue posible encontrar ventanas espectrales compatibles con el análisis de cluster que permitieran discriminar los espectros según los principales metabolitos asociados al catabolismo y anabolismo.

Posteriormente, en lugar de analizar toda la población de espectros de las carpetas de Clase I y Clase III, se estudiaron cada cohorte de embriones de diferentes paciente de manera independiente. Empleamos la misma estrategia de selección de ventanas asociadas a metabolitos para la discriminación y seleccionamos las cohortes de espectros de sobrenadantes de cultivo de embriones por pacientes con su respectivo control. Se eligieron pacientes que tuvieron dentro de una cohorte variable de embriones (entre 4 y 14) 2 embriones transferidos y ambos implantados. A modo de ejemplo se muestra en la **Figura 30** los resultados de 3 pacientes. Se realizó el ACS analizando diferentes regiones al igual que el caso anterior. La discriminación que arrojó mejores resultados fue la que consideró la ventana ($1200-900\text{ cm}^{-1}$), con *Normal to replevel* como método de cálculo (**Figura 30**).

De las cohortes de embriones disponibles para realizar el análisis en el 53,33 % de éstas se pudo observar que los sobrenadantes de embriones transferidos se separan de las muestras control, y de alguno de los otros sobrenadantes de embriones que no han sido transferidos.

Estos resultados sugerían cierta tendencia que podría estar indicando que la metabolómica embrionaria estudiada por medio de espectroscopía FTIR podría ser capaz de detectar las diferencias entre los embriones que habían implantado de aquellos que no. Dado que los resultados fueron muy dispares, se recurrió a otro sistema de discriminación supervisada más sofisticado y robusto como las redes neuronales artificiales.

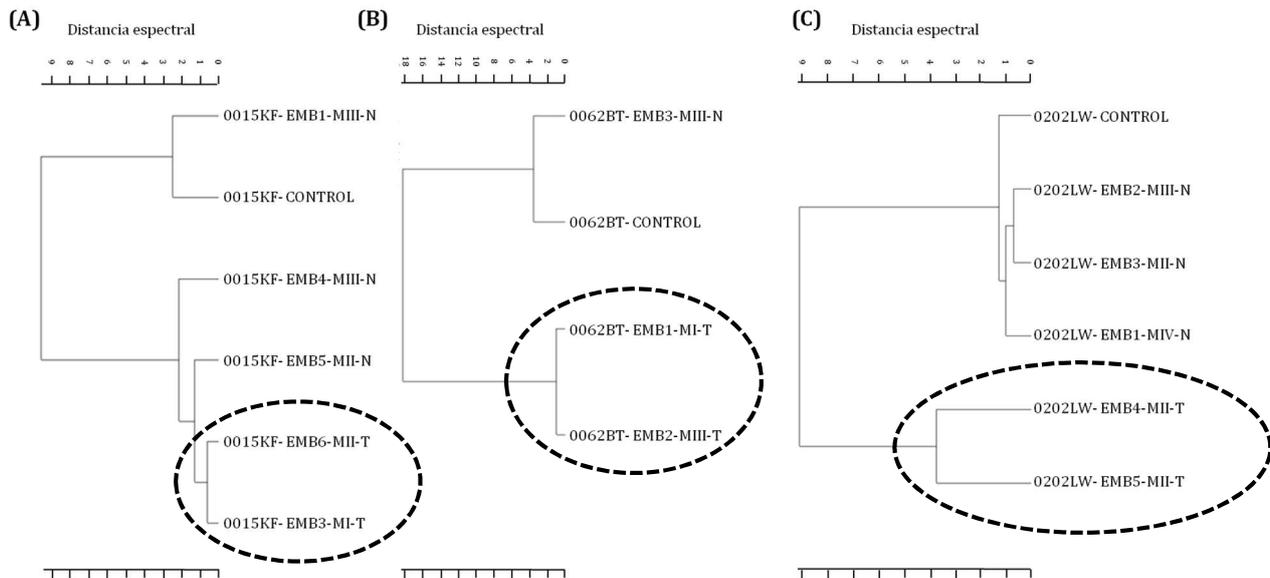


Figura 30. Análisis de cluster supervisado de diferentes cohortes de espectros de sobrenadantes de cultivo embriones de pacientes donde todos los embriones transferidos implantaron. El análisis se realizó con la derivada segunda en la región espectral asignada a hidratos de carbono ($1200-900\text{ cm}^{-1}$), el método de cálculo fue *Normal to replevel* y el dendrograma se construyó aplicando el algoritmo *Av. Linkage*. (A) Cohorte de embriones del paciente 0015KF, (b) Cohorte de embriones del paciente 0062BT, (C) Cohorte de embriones del paciente 0202LW. Referencias: EMB: embrión, M: morfología, T: transferido, N: no transferido. Se marcan en un círculo los espectros de sobrenadante de embriones transferidos.

5.3.2 Desarrollo de un modelo basado en Redes Neuronales Artificiales (RNAs) para predecir el potencial de implantación de embriones

Como segundo enfoque en la búsqueda de un modelo de discriminación de los espectros de Clase I (implantación) y III (no implantación), fue la búsqueda de un modelo basado en redes neuronales artificiales. En la **Figura 31** se describen los pasos involucrados en la elaboración de este tipo de modelos aplicando el software *NeuroDeveloper*®

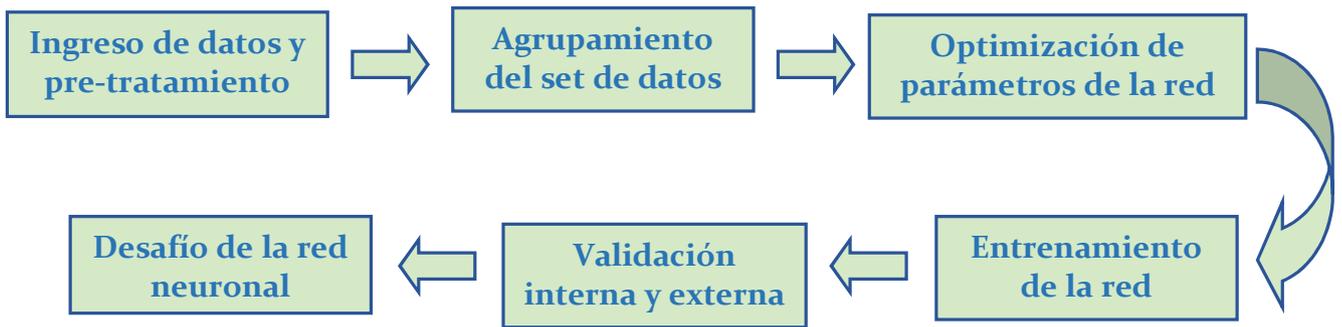


Figura 31. El esquema de trabajo para el entrenamiento y validación de Redes Neuronales Artificiales.

Al momento de encarar este análisis se contaba **con 20 espectros de sobrenadantes de cultivo de embriones de Clase I y 90 espectros de sobrenadantes de cultivo de embriones de Clase III**. Como se indicó en la sección de métodos los espectros de cada clase se agruparon como se indica en la **Figura 32**: 50% de los espectros para entrenamiento; 20% de espectros para validación interna, previamente un 30% de espectros se ha dejado para la validación externa. El primer conjunto se utilizó para crear el modelo (set de entrenamiento), el segundo (set validación interna) para verificar el sistema desarrollado, y el tercer grupo (no se utilizó para el entrenamiento ni la validación) para realizar la validación externa.

Se ensayaron diversas combinaciones en búsqueda del mejor modelo de discriminación:

- se intercambiaron los set de datos, entre los espectros considerados para entrenamiento y validación.

- se modificaron las ventanas espectrales de donde se seleccionan los número de onda para analizar las características espectrales.

- se modificó el número de *inputs* para ser evaluados por la red neuronal (se desarrollaron redes considerando desde solo 7 números de onda hasta 50 para realizar la discriminación),

- el número de capas internas (1 a 3).

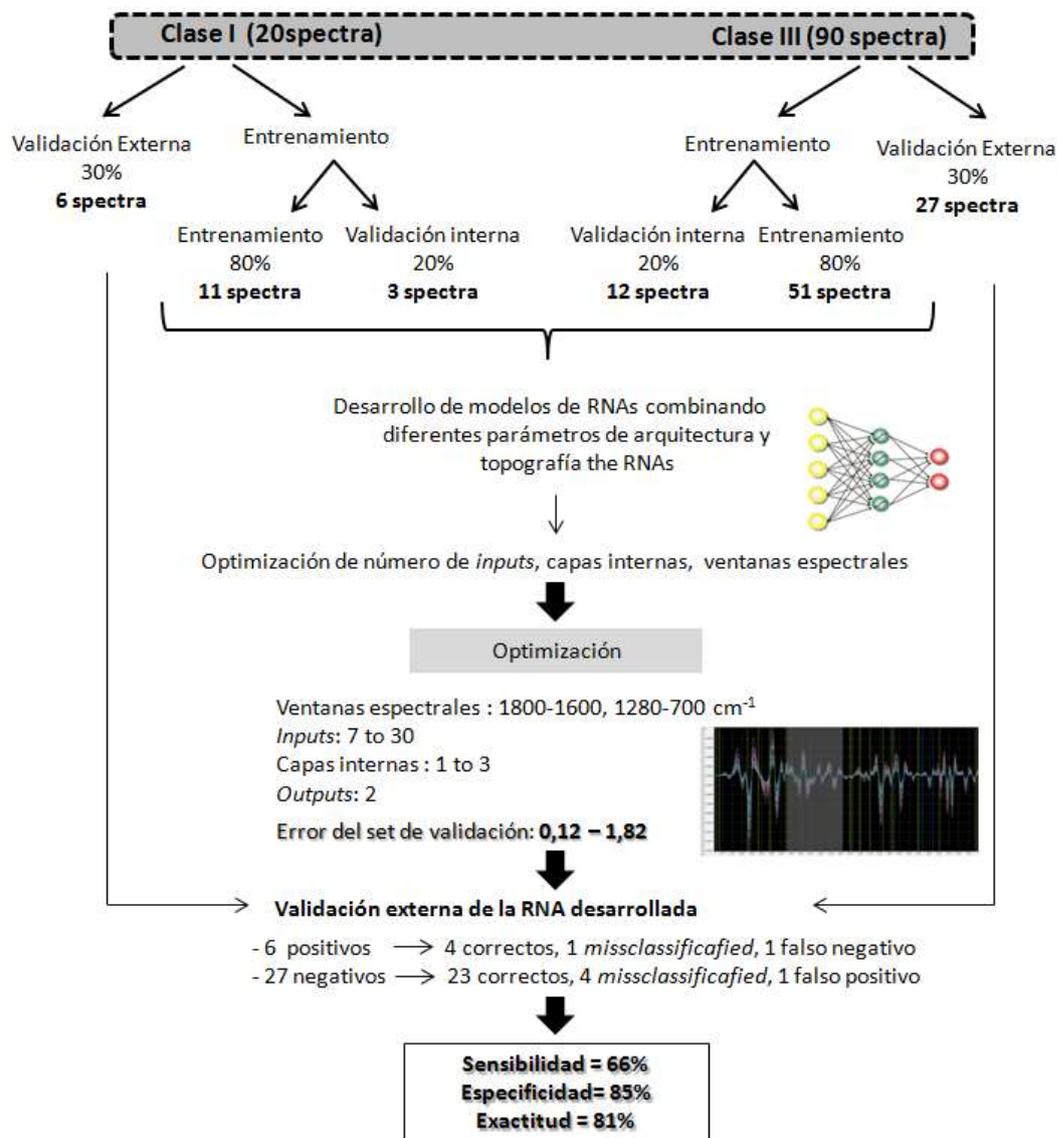


Figure 32. Optimización y desarrollo de RNA basadas en espectros FTIR de sobrenadante de embriones.

Una de las ventajas que tienen las RNAs es que las variables a ser consideradas para la clasificación no son ventanas espectrales, sino número de ondas espectrales (**Figura 33**). Para ello en las regiones espectrales de interés definidas por el operador el software busca un número de longitud de onda donde las diferencias entre los grupos son las máximas. Las longitudes de onda más significativas se destacan con barras de color que van desde el amarillo (mayor significancia) hasta el azul (menor significancia). Es interesante observar que los números de onda de mayor discriminación entre los dos grupos encontrados por el software eran los asociados a la absorción de piruvato, lactato,

glucosa, glutamina y serina. De modo que lo que no fue posible realizar en el estudio por análisis de cluster supervisado lo pudimos resolver con las redes neuronales.

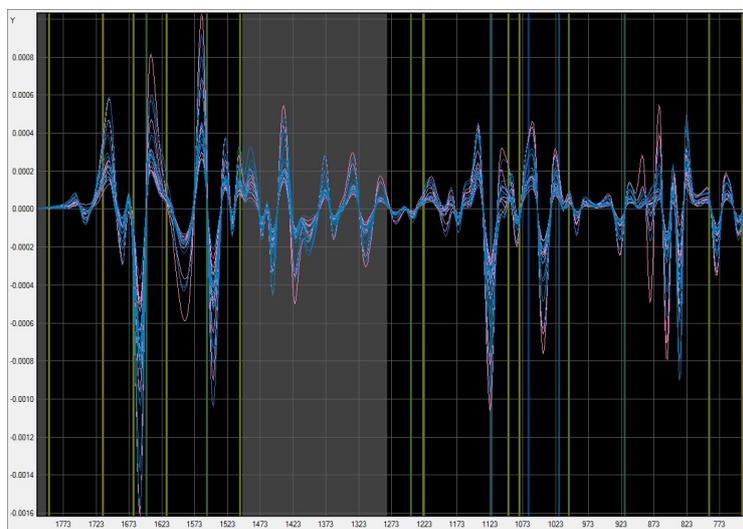


Figura 33. Selección de longitudes de onda diferenciales en las regiones 1800-1600, 1280-730 cm^{-1} en derivadas segundas normalizadas entre espectros de las Clase I (rosa) y la Clase II (celeste). Las líneas de color que van desde el amarillo (mayor significado) hasta el azul (menor significado) son los números de onda en los cuales el Software encontró las mayores diferencias entre las clases.

Todos los modelos ensayados se desarrollaron con una significancia del 85 a 95%. **Para todos los casos, se calculó el error de validación, sensibilidad, especificidad y exactitud.** La **Figura 32** muestra la RNA para la cual se encontró la mejor combinación de parámetros (16 valores de inputs y 3 capas internas, la cual denominamos *IRlife1*). En este caso al testear la red con los 33 espectros empleados para la validación externa, 6 correspondientes a sobrenadante de embriones que implantaron (positivos) y 27 a sobrenadantes de embriones que no implantaron (negativos), se obtuvo que dentro de los 6 positivos 4 fueron clasificados como positivos y 2 como negativos, y entre los 27 negativos, 22 fueron clasificados correctamente y 5 fueron mal clasificados o no clasificados

Estos resultados están indicando que mediante la red *IRlife1* podría ser posible discriminar espectros pertenecientes a sobrenadantes de embriones que implantan de los que no implantan con valores de sensibilidad del 66%, especificidad del 85% y de exactitud del 81%.

De modo que este modelo propone que en un tratamiento FIV, en el cual se dispone luego de 3 días de cultivo de una corte de embriones (por ejemplo de 9 embriones). Al momento de tener que seleccionar qué embrión transferir, se toman los sobrenadantes de cultivo de los 9 embriones, se mide los correspondientes espectros FTIR, se los introduce en el programa *NeuroDeveloper*®, se desafían en el modelo desarrollado *IRlife1* y se obtiene el resultado. Por ejemplo un resultado podría ser, de los 9 embriones, 3 con resultado positivo (implantación) y los restantes negativos (no implantación) o no clasificados (no son reconocidos por la red). Ante este resultado sugeriríamos en menos de 1 hora qué embriones podrían ser transferidos con una exactitud del 81 % (**Figura 34**).

Dentro de las metodologías de selección de embriones en tratamientos IFV, como se mencionó anteriormente, están aquellas que se fundamentan en la morfología (estudiada por microscopía óptica), morfo-cinética (Time-lapse) y genética (Preimplantation Genetic Screening-PGS). En relación a la selección por morfología, como ya se dijo, poseen una baja eficiencia, menor al 35%. Las técnicas de tipo Time-lapse por su parte son más precisas, tiene la ventaja no requerir la manipulación de los embriones fuera de la incubadora, pero poseen la desventaja de involucrar equipos de muy alto costo. Finalmente, las técnicas genéticas presentan la gran desventaja de ser invasivas, el último protocolo de PGS desarrollado es aquel que evalúa el estado genético en blastocistos, su principal desventaja es que los resultados se obtienen en 24 a 48 horas, por lo que generalmente se deben congelar los blastocistos. Asimismo, su beneficio sobre la posibilidad de incrementar las tasas de embarazo han dado resultados inconclusos (Gleicher y col., 2014).

Los tratamientos de Fertilización asistida son tecnologías muy caras que recién en los últimos tiempos se intenta que cubran las obras sociales. A los costos directos que derivan de la aplicación del tratamiento en sí, se le debe sumar los costos indirectos que incluyen la demanda de tiempos que normalmente son laborables para la pareja, gastos de traslados a centros especializados, los que son difíciles de estimar. En ocasiones la falla durante un ciclo de FIV conlleva a que las mujeres estén expuestas a una mayor probabilidad de ser víctimas de violencia doméstica y a sufrir diversas formas de abuso verbal y emocional, lo cual se incrementa en entornos donde la paternidad es socialmente obligatoria.

Si bien, hoy en día se cuenta con una ley que protege a las familias donde gran parte de la responsabilidad económica radica en las obras sociales y el Estado, no todas

las parejas cuentan con dicha cobertura. Por lo tanto, cualquier aumento en la probabilidad de éxito durante los ciclos de FIV permitirá a aquellas parejas de recursos limitados lograr una reducción importante de costos de tratamiento. Esta mejora en los procedimientos también disminuiría el gasto público generado en hospitales que brindan dicho servicio.

En este escenario la aplicación de esta nueva metodología además de incrementar la exactitud en la selección de los embriones, representaría una herramienta de diagnóstico no invasiva, rápida, simple, confiable. Asimismo si bien es necesaria una inversión inicial para adquirir el espectrómetro FTIR, el hecho de no requerir insumos, la transforma además en una técnica de bajo costo. Esto sería una ventaja adicional para ser aceptada por las clínicas y obras sociales, ya que aumenta la certeza del tratamiento sin incrementar el valor total del mismo.

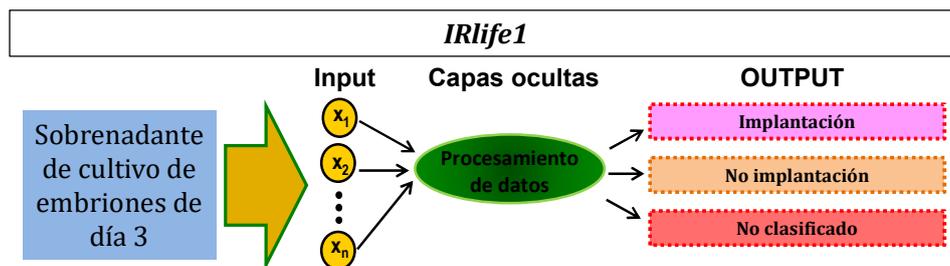


Figura 34. Esquema de procedimientos involucrados en la evaluación por la RNA *IRLife1* de sobrenadantes de medio de cultivo de embriones. Los parámetros de la red desarrollada incluyen 16 inputs y 3 capas ocultas

Si bien los resultados obtenidos fueron alentadores y el modelo neuronal desarrollado mostraba significativas posibilidades de ser aplicado ofreciendo mejores resultados, no fue posible incrementar los valores de sensibilidad, exactitud y especificidad.

A pesar de haber avanzado significativamente en el desarrollo de nuevas tecnologías no quedaba aún claro por qué este modelo no podía ser mejorado y era tan variable el resultado según qué set de espectros se tomaran como entrenamiento o validación.

Luego de un análisis cuidadoso observamos que este modelo no puede ser mejorado porque en los métodos de RNAs se entrenan las redes “enseñándoles” que los espectros que tiene una metabolómica asociada a la implantación son los que están en la Clase I, lo cual no ofrece mayores objeciones. Pero se les “enseña” también que los espectros que están en la Clase III tiene una metabolómica negativa para la implantación. Esta afirmación no es del todo cierta, ya que dentro de ese pool de espectros de Clase III (negativos) hay una fracción que efectivamente tiene una metabolómica no favorable, pero hay otros que quizás tienen una metabolómica favorable y la no implantación se dio por otras causas ajenas al metabolismo. Esto nos llevó a “confundir” el entrenamiento. Algunos de los espectros del set de muestras que se tomaron como de metabolómica desfavorable (Clase III) podrían haber sido favorables.

Esto nos llevó a pensar que cualquier **método supervisado** donde a priori tuviéramos que separar entre implantados y no implantados, dentro de los negativos podría haber embriones con “buena metabolómica” que no implantaron por razones ajenas al metabolismo. Esto nos llevaría a conclusiones erróneas. Por lo que decidimos ensayar modelos sofisticados pero no supervisados, donde no tuviéramos que separarlos previamente en clases.

Recurrimos con estos cuestionamientos al grupo de trabajo del **Prof. Dr. Achim Kohler** del Departamento de Ciencias Matemáticas y Tecnológicas de la Universidad de Ciencias de la Vida de Noruega. Este grupo es referente a nivel mundial en quemometría aplicada al análisis de espectros de muestras de origen biológico. Este laboratorio cuenta con un gran número de especialistas en biología, química y matemáticas, quienes han desarrollado los códigos necesarios para aplicar sobre muestras espectrales análisis de componente principal (ACP), mínimos cuadrados parciales (PLS), entre otros. Emprendimos un trabajo en cooperación a través del cual se realizó una visita a su laboratorio donde pudimos entender y aprender la aplicación de sus modelos no supervisados.

5.3.3 Desarrollo de un modelo matemático no supervisado para la estimación del potencial de implantación de embriones

Como se mencionó en materiales y métodos El Análisis Factorial y Análisis de Componente Principal son algoritmos matemáticos que reducen la dimensión del problema que se está tratando. En otras palabras, en lugar de usar muchas variables, la

variabilidad de los datos es descripta por sólo unos pocos Factores o componentes principales (CPs). La reducción se logra encontrando la correlación entre las variables (Zwielly y col., 2010).

Durante el desarrollo del trabajo se ensayaron diferentes herramientas a medida que se iban incorporando nuevos software al estudio.

Primeramente, se contaba con el método de factorización que ofrece el software **Opus 7.0** (Figura 35) que permite realizar un AF. Para este análisis tomamos todos los espectros de las carpetas de Clase I y Clase III sin ninguna clasificación previa, re realizó el AF sin seleccionar ventanas espectrales (solamente eliminamos las ventanas asociadas a la absorción de lípidos), posteriormente se obtuvo diagrama de scores correspondiente (Figura 35).

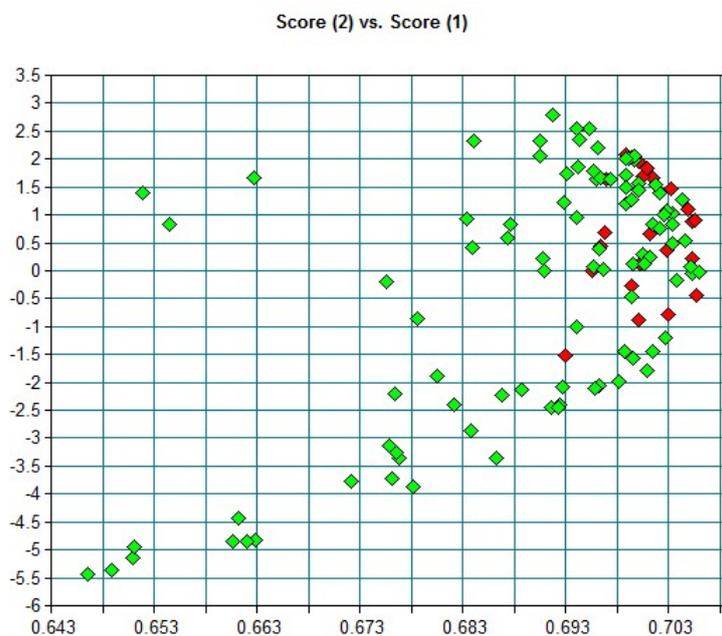


Figura 35. AF (Score 2 vs. Score 3) de espectros de sobrenadantes de embriones de Clase I (rojo) y Clase III (verde). El análisis se realizó con la derivada segunda normalizada vectorialmente de los espectros en las regiones espectrales 1800-1600, 1280-730 cm^{-1} , por medio del método de factorización (Software **Opus 7.0**).

Referencias: rojo: espectros de sobrenadantes de cultivo de embriones que implantaron, verde: espectros de sobrenadantes de cultivo de embriones que no implantaron.

Se ensayaron de igual manera análisis de componente principal (Figuras 36 y 37) utilizando diferentes software y algoritmos. Se adquirió el software **PyChem** de acceso

libre que tiene disponible los modelos matemáticos SVS y NIPALS para realizar ACP (Baker y col., 2014). Por último se obtuvo el software **MATLAB**, otorgado por el grupo dirigido por el *Prof. Dr. Achim Kohler* del Departamento de Ciencias Matemáticas y Tecnológicas de la Universidad de Ciencias de la Vida de Noruega. Además, de los códigos desarrollados para el uso de MATLAB han desarrollado técnicas de pre-procesamiento basadas en métodos de modelado de tipo Corrección Multiplicativa de la Señal Extendida (EMSC).

Por medio de éstos análisis es posible determinar que aquellos espectros de embriones que se encuentran alejados de la nube de positivos no deberían haberse transferido, ya que su espectro no es similar al de los embriones que implantaron, es decir que alrededor del 40% de los embriones transferidos no hubieran sido seleccionados para iniciar un ciclo de FIV si se hiciera el análisis por FTIR, disminuyendo así el porcentaje de ciclos no exitosos. La posibilidad de incrementar el éxito en los ciclos de FIV permitiría a su vez disminuir las transferencias múltiples de embriones, disminuyendo así la incidencia de embarazos múltiples.

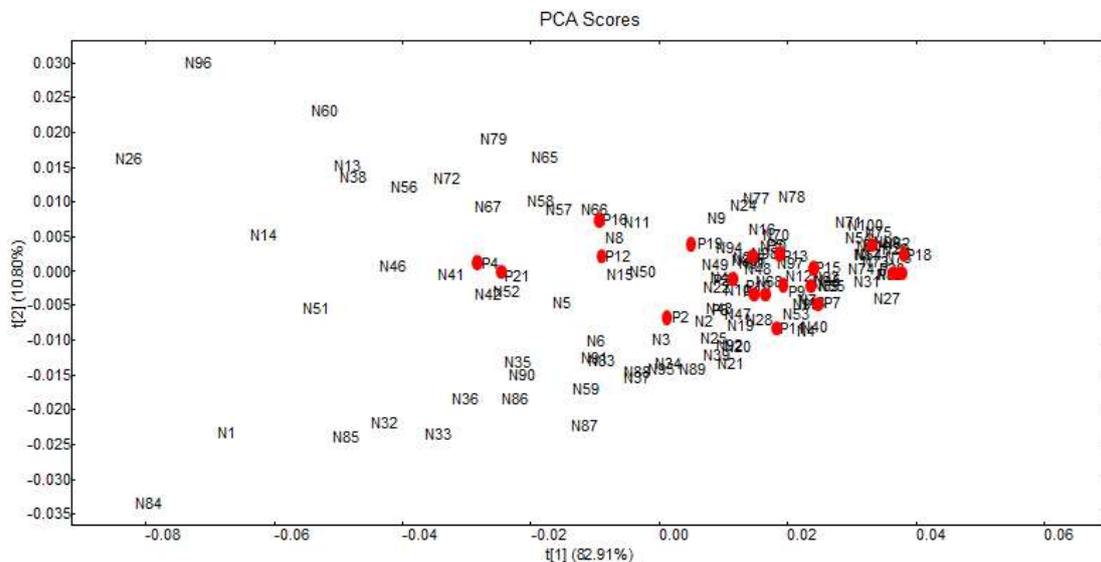


Figura 36. PCA Score Plot, (t_1 vs. t_2) de espectros de sobrenadantes de cultivo de embriones de Clase I y Clase III. El análisis se realizó en las regiones espectrales 1800-1600, 1280-730 cm^{-1} , sobre los espectros pre-procesados por derivación lineal y un filtro de 9 puntos, por medio del método de SVS (PyChem).

Referencias: en rojo se indican los espectros de sobrenadante cultivo de embriones que implantaron.

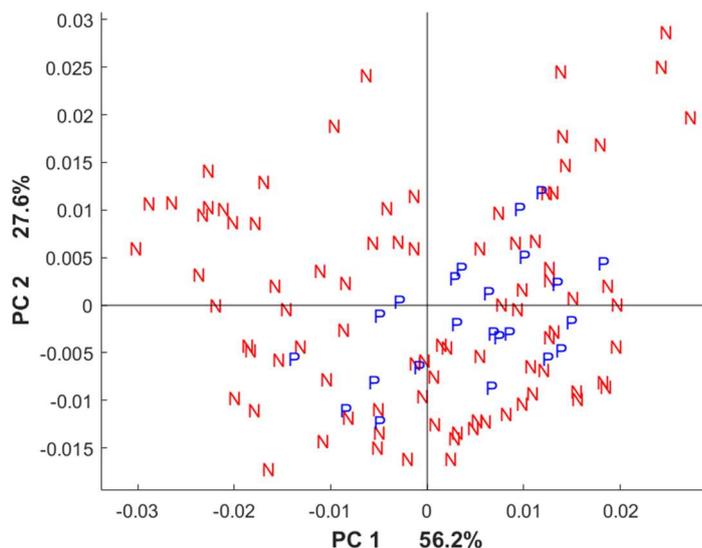


Figura 37. PCA Score Plot (PC1 vs PC2) de espectros de sobrenadantes de cultivo de embriones de Clase I y Clase II. El análisis se realizó sobre los espectros pre-procesados por derivación segunda normalizada vectorialmente y EMSC análisis en las regiones espectrales 1800-1600, 1280-730 cm^{-1} , por medio del método NIPALS (**MATLAB**). Referencias: P: espectros de sobrenadantes de cultivo de embriones que implantaron, N: espectros de sobrenadantes de cultivo de embriones que no implantaron.

Como ya se mencionó anteriormente son numerosos los estudios que han demostrado que los sobrenadantes de cultivo de embriones que resultan en embarazo tienen un perfil metabolómico diferente en comparación con los embriones que no implantan (Gardner y col., 2013; Katz-Jaffe y col., 2009; Katz-Jaffe y col., 2013; Nyalwidhe y col., 2013).

La investigación del metaboloma de los medios de cultivo de embriones, utilizando análisis espectroscópico y bioinformática ha sido empleado por diversos grupos de estudio. Sakkas y colaboradores fueron los primeros en publicar reportes del empleo de espectroscopía NIR para el análisis de espectros de sobrenadantes de embriones (Ahlström y col., 2011; Seli y col., 2007; Seli y col., 2009; Seli y col., 2011; Vergouw y col., 2008). En un principio los modelos obtenidos, los cuales habían sido desarrollados con tamaños muestrales de entre 69 a 304 sobrenadantes de cultivo de embriones, dieron resultados que parecían prometedores. Esto los alentó a desarrollar un prototipo comercial del modelo (Molecular Biometrics Inc., ViaMetrics). Sin embargo,

varios estudios clínicos mostraron n resultados inconsistentes (Hardarson y col., 2012; Sfontouris y col., 2013). Uno de los problemas subyacentes encontrados en el sistema basado en espectroscopía NIR era que el umbral de la señal que distinguía entre un embrión viable y no viable era altamente sensible al ruido de la señal. Por lo tanto, cuando se aplicó en ensayos clínicos rigurosos, no ha mejorado la posibilidad de seleccionar un solo embrión viable, esta tecnología NIR parece necesitar un mayor desarrollo antes de ser utilizada como un modelo objetivo de la viabilidad del embrión (Sakkas, 2014).

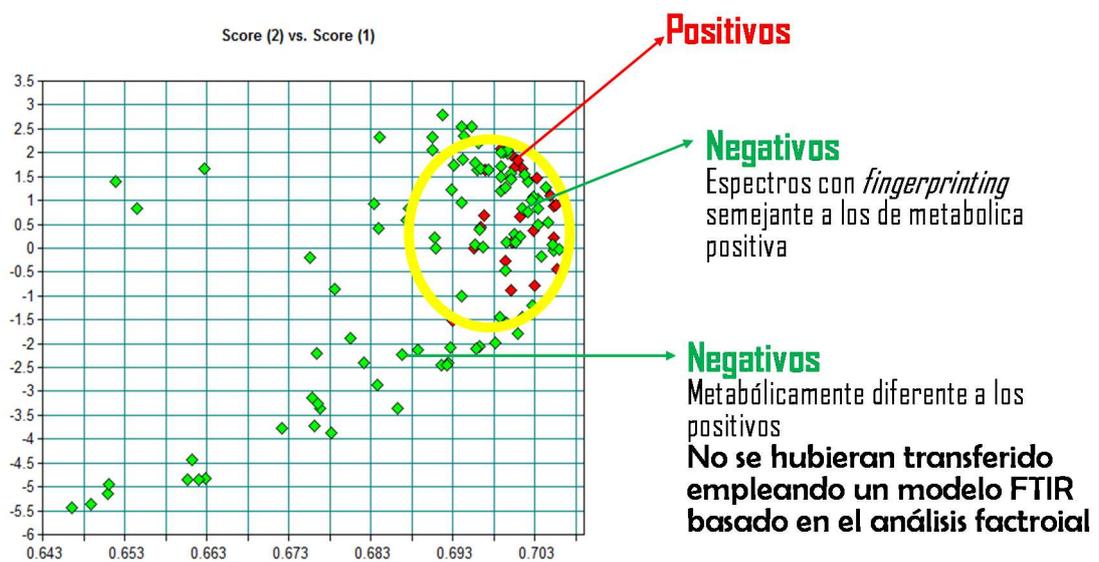


Figura 38. AF (Score 2 vs. Score 3) de espectros de sobrenadantes de cultivo de embriones de Clase I (rojo) y Clase III (verde). El análisis se realizó con la derivada segunda normalizada vectorialmente de los espectros en las regiones espectrales 1800-1600, 1280-730 cm^{-1} , por medio del método de factorización (Software **Opus 7.0**).

Se indica con un círculo amarillo los espectros de Clase III que se encuentran cercanos a los Clase I.

Referencias: rojo: espectros de embriones que implantaron, verde: espectros de sobrenadantes de cultivo de embriones que no implantaron.

Además de la desventaja de las bajas señales espectrales que se obtienen por medio de espectroscopía NIR, como se describió en Introducción, NIR solo registra los estados vibracionales de los enlaces O-H, C-H, y N-H, mientras que por FTIR se obtienen espectros que contienen información de los modos vibracionales del material biológico (C-H, C=O, C-O, O-H, N-H, C-N, etc.) global. Es probable que los resultados

desalentadores obtenidos por el grupo de Sakkas se deban en parte a la falta de información que otorgan los espectros NIR. Asimismo, la espectroscopía FTIR permite obtener espectros más rápidamente y tiene un mayor rendimiento (*throughput*).

El análisis preliminar de medios de cultivo de embriones cultivados durante 26 horas realizado por Brison y col. (2007), es el único disponible que aplica espectroscopía FTIR. En él incluyeron espectros de sobrenadantes de embriones que dieron embarazo clínico (dos muestras de un mismo paciente), espectros de sobrenadantes de embriones que dieron embarazo bioquímico pero que no lograron embarazo clínico (dos muestras de un mismo paciente) y espectros de sobrenadantes de embriones que no dieron embarazo (tres muestras de tres pacientes). Si bien observaron que cada grupo de muestras se distribuye con cierta tendencia en cuanto a su resultado de implantación indicando el potencial que tendría la técnica, en el estudio se utiliza un número de muestras muy pequeño lo cual implica que lo observado debe ser tomado con cautela. Lamentablemente, no han hecho nuevos reportes donde se incluya un mayor tamaño de muestra. Aunque emplean el mismo tipo de espectroscopía que nosotros existen diferencias en el tiempo de desarrollo de los embriones y el modo de preparación de las muestras.

Es importante destacar que todos los estudios mencionados arriba donde se emplean técnicas espectroscópicas como posibles herramientas para la evaluación no-invasiva del potencial de implantación embrionaria utilizaron métodos de análisis supervisados, donde el set de sobrenadantes tomados como negativos (no implantación) puede estar incluyendo embriones que son metabólicamente no viables y también embriones que no han implantado por razones ajenas a la metabólica.

Como mencionamos anteriormente existe una gran cantidad de factores que pueden afectar la implantación ya que los tratamientos de fertilización asistida son procesos multifactoriales. Diversos estudios han observado cómo en mayor o menor medida estos tratamientos pueden verse afectados por diferentes hábitos tales como el tabaquismo, estatus socioeconómico, consumo de alcohol entre otros (Wright y col., 2006), por lo cual no dependería solo del estado metabólico del embrión.

Teniendo en cuenta lo antes expresado es posible que los espectros de embriones que no implantaron que se encuentran en la nube de embriones que implantaron tengan una metabólica similar a estos últimos, y que el resultado negativo del ciclo se deba a otros factores que influyeron de manera negativa (**Figura 38**). Se decidió ir más allá en estos estudios metabólicos y estudiar la posibilidad de tener en cuenta otros factores

que pueden influenciar los tratamientos de FIV, con el fin de incrementar los resultados observados.

5.3.4 Construcción de un modelo basado en análisis PLS que combine datos espectrales con otro tipo de datos

Los análisis de tipo PLS permiten realizar modelos que combinan datos de dos matrices X e Y , donde la matriz X suele tener un dominio (espectros FTIR asociados a la metabolómica) e Y (otro conjunto de datos). Para la aplicación de éste tipo de métodos se empleó el modelo matemático PLS por medio del software **MATLAB**. En este sentido se analizó si al combinar la base de datos de espectros FTIR construida con los espectros de sobrenadantes de cultivo (matriz X) y los datos almacenados en la plataforma **OpenClinica** (matriz Y) permitían mejorar los resultados obtenidos.

Los factores considerados incluyeron: morfología embrionaria, edad de la madre, índice de masa corporal materna (BMI) y tabaquismo. Para poder incluir éstos factores, la información incorporada en **OpenClinica** debió ser recuperada. En los casos de la edad de la madre, índice de masa corporal materna y tabaquismo, debido a que son variables continuas se debieron transformar en variables categóricas.

Las edades maternas se separaron en 3 grupos, aquellas que tenían entre 27 a 34,9 años pertenecían al grupo 1, las que tenían entre 35 a 39,9 años al grupo 2 y las mujeres mayores a 40 años eran incluidas en el grupo 3.

Los datos BMI se calcularon para cada caso y se separaron en 4 categorías, donde mujeres con un BMI entre 18-20 (peso normal) corresponderían a la primera categoría, BMI menores a 18 (bajo peso) a la categoría 2, BMI entre 21-26.9 (sobre peso) a la categoría 3 y BMI superiores a 27 (obesidad) a la categoría 4.

Teniendo en cuenta los valores informados sobre tabaquismo se generaron 5 categorías. El grupo que será identificado como cero contenía mujeres que nunca habían fumado, en el grupo 1 se incluyeron ex-fumadoras que consumían menos de 10 cigarrillos por día, en la segunda categoría ex-fumadoras que consumían más de 10 cigarrillos por día, fumadoras activas de al menos 9 cigarrillos al día pertenecían al grupo 3, en el grupo 4 se incluyeron aquellas que eran fumadoras activas de entre 10 y 19 cigarrillos por día y en el último grupo se incorporaron mujeres que consumían más de 20 cigarrillos por día. También se tuvo en cuenta el tabaquismo del padre, los datos se

separaron en 2 categorías, padres que nunca fumaron pertenecían al grupo 0, mientras que el grupo 1 estaba formado por aquellos que eran ex-fumadores.

Los datos se transformaron y se incluyeron en un estudio de tipo PLS. En cuanto a la matriz X de datos espectrales se seleccionaron para el análisis las regiones espectrales 1800-1600, 1280-730 cm^{-1} , el pre-procesamiento incluyó una corrección de tipo Corrección Multiplicativa de la Señal Extendida (EMSC) y la segunda derivada noramlizada vectorialmente.

Por otro lado, con datos colectados en la base **OpenClinica** que fueron re-categorizados como se explicó anteriormente se construyó una matriz Y . Se evaluaron los resultados incluyendo los factores considerados, y diferentes combinaciones de ellos (**Figura 39**).

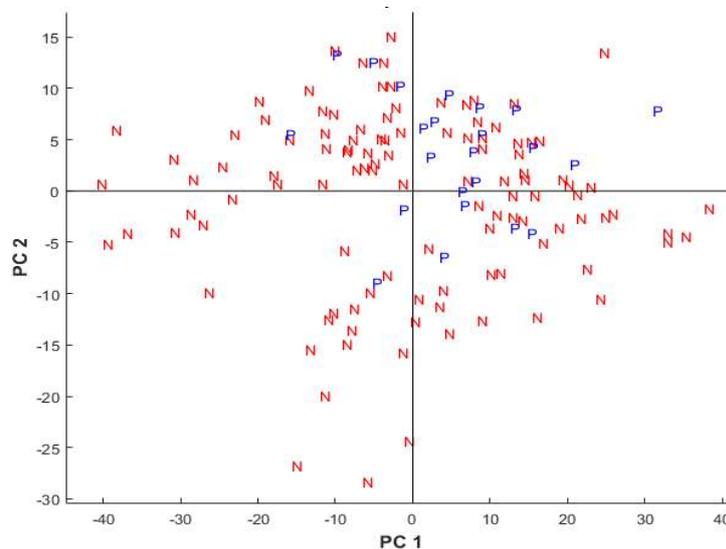


Figura 39. PLS-AD Plot (PC1 vs PC2) de espectros de sobrenadantes de embriones de Clase I y Clase III combinados con los datos colectados en la base **OpenClinica**. El análisis se realizó sobre los espectros pre-procesados por la derivada segunda y EMSC análisis en las regiones espectrales 1800-1500, 1280-730 cm^{-1} , por el método NIPALS (MATLAB), y los datos relacionados a la morfología embrionaria, edad de la madre, índice de masa corporal (BMI) materna y tabaquismo.

Referencias: P: espectros de sobrenadantes de cultivo de embriones que implantaron, N: espectros de sobrenadantes de cultivo de embriones que no implantaron.

La incorporación de otros factores que podrían estar influenciando los ciclos de TRA al análisis otorga resultados similares a los anteriores, donde los espectros de

sobrenadantes de cultivo de embriones que implantaron forman una nube en la cual muestras de sobrenadantes de cultivo de embriones que no implantaron se superponen con aquellas que si lo hicieron.

Al analizar las características de los sobrenadantes de cultivo de embriones pertenecientes a la Clase III, que se encuentran alejados de la nube de Clase I, los mismos presentaban uno o más factor desfavorables (**Tabla 7, Figura 40**), mientras que las muestras de Clase III, cercanas los espectros de Clase I, tienen características más “saludables”. Las razones por las cuales un ciclo de TRA no es exitoso no están del todo esclarecidas. Por un lado, se observan fallas de ciclos en transferencias de embriones de buena calidad, lo cual podría estar apoyado en el hecho de la falta de exactitud de valoración morfológica. Asimismo, como se describió anteriormente se han propuestos otros factores que podrían afectar los ciclos, sin embargo no se tiene certeza de su influencia. Esto conlleva a que se desconozcan las causas de la falla del ciclo en el grupo de muestras de espectros correspondientes a embriones que no lograron implantar. Consecuentemente desarrollar métodos de comparación entre muestras que implantan o no lo hacen se debe hacer con suma cautela ya que el grupo de no implantados podría estar enmascarando embriones con buena metabolómica pero que en realidad tenga otro factor que le impidió concluir exitosamente.

Tabla 7. Determinación de las características de los espectros de sobrenadante embriones que no implantaron y se encuentran alejados de la nube de espectro de sobrenadantes de cultivo de embriones que implantaron.

	Clase III cercanos a Clase I					Clase III alejados a Clase I						
	1	2	3	4		1	2	3	4			
Morfología embrionaria	29%	45%	25,8%			25,9%	51,8%	22,2%				
Edad materna	1	2	3			1	2	3				
	51,6%	35,4%	12,9%			14,8%	40%	44%				
BMI	1	2	3	4		1	2	3	4			
	80,6%		19,3%			74%	3,7%	7,4%	14,8%			
Tabaquismo materno	0	1	2	3	4	5	0	1	2	3	4	5
	74,1%	6,4%	6,4%	12,9%			44%	18,5%	14,8%		14,8%	7,4%
Tabaquismo paterno	0	1	2				0	1	2			
	77,3%	9,6%	6,4%				48%	33,3%	18,5%			

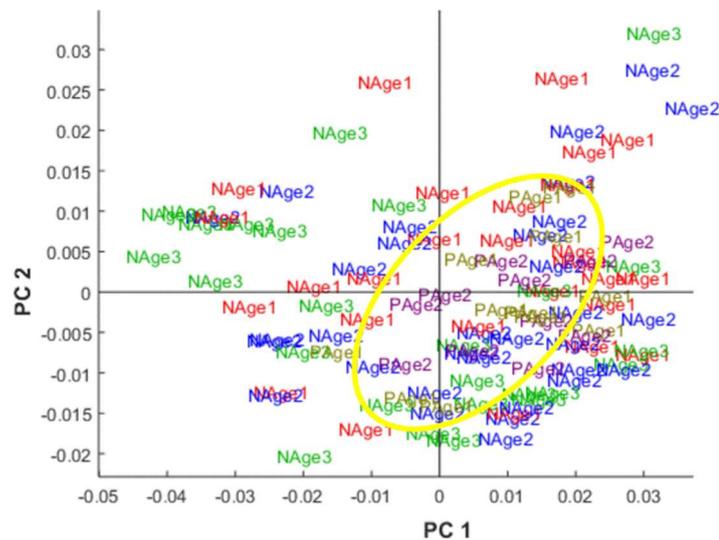


Figura 40. PLS-AD Plot (PC1 vs PC2) de espectros de sobrenadantes de cultivo embriones de Clase I y Clase III combinados con los datos colectados en la base **OpenClinica**. En este gráfico se muestra el resultado del análisis y se grafica indicando las edades maternas. El análisis se realizó sobre los espectros pre-procesados por la derivada segunda y EMSC análisis en las regiones espectrales 1800-1500, 1280-730 cm^{-1} , por el método NIPALS (MATLAB), y los datos relacionados a la morfología embrionaria, edad de la madre, índice de masa corporal (BMI) materna y tabaquismo.

Referencias: P: espectros de sobrenadante de cultivo embriones que implantaron; N: espectros de embriones que no implantaron; Age1: mujeres menores a 34,9 años; Age2: mujeres entre 35 a 39,9 años; Age2: mujeres mayores a 40 años.

Se marca con un círculo amarillo la zona donde se encuentran los espectros de embriones que implantaron.

Nuestros resultados confirman que a pesar de que la metabolómica embrionaria tiene un papel clave en el proceso de implantación del embrión, ésta representa un evento multifactorial. Por lo tanto, el desarrollo de modelos capaces de estimar el potencial reproductivo de embriones individuales dentro de una cohorte no serán lo suficientemente robustos si se basan únicamente en los resultados de metabolómica.

Por otro lado, al igual que lo reportado por Freour y col. (2008) la falta de contundencia en los resultados pudo deberse a que se contó con un número limitado de muestras. En un principio se especuló que se iba a disponer de un gran número de pacientes, alrededor de 1000, sin embargo no fue posible alcanzar esta cantidad debido por un lado a que las parejas se encontraban a la espera de que la Ley de *Reproducción Medicamente Asistida* (Ley N° 26862) se aplicara e instrumentara, asimismo

posteriormente debido a las restricciones en la importaciones no fue posible adquirir el medio de cultivo utilizado hasta el momento.

Se debe tener en cuenta que el estudio de la influencia de factores relacionados a los hábitos de vida de los pacientes requiere la incorporación de un número muy grande de muestras para poder observar preponderancia. Es así que los trabajos que abordan el análisis de factores más predictivos para el nacimiento vivo después de la fecundación *in vitro* tales como el tabaquismo, fumadores pasivos, alcoholismo, grosor del endometrio, nivel socioeconómico, entre otros, incluyen a veces hasta 7000 casos (Aleman y col., 2016; Schliep y col., 2015; Vaegter y col., 2017), inclusive en un trabajo realizado por Domar y col. (2015) realizado en EEUU con el objetivo de analizar la prevalencia de comportamientos negativos de estilo de vida, el impacto de la región y la cobertura de seguros médicos fue realizado en base a la información de 12800 pacientes de diferentes clínicas.

Durante la realización de la investigación se trabajó en conjunto con los especialistas de IECS, institución que se dedica a promover la utilización de la evidencia científica para acortar la brecha existente entre el conocimiento disponible y la toma de decisiones. En cuanto al estudio de la influencia de factores sobre los resultados de los tratamientos de TRA, se consultó a los especialistas quienes cuentan con una vasta experiencia en conducir y promover proyectos de investigación que involucran a miles de personas a nivel global, ellos advirtieron la posibilidad de la obtención de resultados no concluyentes debido la necesidad de contar con un número de muestra del orden de los miles.

Asimismo, también se trabajó en colaboración con el grupo de especialistas en espectroscopía y desarrollo de modelos matemáticos del Departamento de Ciencias Matemáticas y Tecnológicas de la Universidad de Ciencias de la Vida de Noruega (NMBU). Si bien ellos advirtieron que el número de muestras podría no ser el ideal para el desarrollo de modelos donde se desean combinar bloques de datos, nos alentaron a estudiar la influencia de las características de los pacientes en combinación con la metabólica estudiada por espectroscopía FTIR.

Las investigaciones dirigidas a determinar la influencia de hábitos de vida sobre el éxito de los tratamientos de reproducción asistida son numerosas, así como aquellos tendientes a desarrollar nuevas tecnologías no-invasivas para la selección de embriones. Sin embargo, hasta el momento no se han reportado ensayos donde se combinen ambas temáticas. Por lo tanto, esta investigación es la primera en proponer un abordaje

abarcativo que permite evaluar el/los embriones a transferir durante ciclos de FIV. No obstante, futuros trabajos tendientes a obtener resultados más concluyentes deberán involucrar mayor cantidad de pacientes, pacientes de diferentes centros de fertilización y deberán evaluar exhaustivamente la inclusión de factores asociados a la falla en la implantación

Las metodologías aplicadas en este estudio otorgan las bases necesarias para su aplicación en futuros estudios donde se desee estudiar la distribución y ponderar la influencia de factores que están afectando un mismo proceso. Incluso su relevancia radica en la posibilidad de combinar datos epidemiológicos y espectrales, un área de estudio que se encuentra en amplio desarrollo a nivel mundial y que no tiene referentes en nuestro país.

Conclusiones

1 Conclusión general

Este trabajo de Tesis doctoral, se ha llevado a cabo en el marco de un proyecto de innovación en el que participaron el sector científico y productivo. A través de este proyecto multidisciplinario en el que intervino el Laboratorio de Biospectroscopía del CINDEFI, PREGNA Medicina Reproductiva, el Instituto de Efectividad Clínica y Sanitaria (IECS), Synthon Analytics (Heidelberg, Alemania), y el Departamento de Matemáticas y Tecnología de la Universidad de Ås (Noruega), se ha podido realizar un valioso aporte para mejorar las técnicas de elección de embriones a ser transferidos en las prácticas de fertilización asistida (FA).

Se ha demostrado por primera vez el potencial que tiene la espectroscopía FTIR combinada con análisis multivariante, para analizar la metabolómica embrionaria a partir del estudio de sobrenadantes de cultivo de embriones de 3 días de incubación. Se desarrolló un método bioinformático basado en redes neuronales artificiales que permite estimar el potencial de implantación de embriones previa a su transferencia en tratamientos de fertilización asistida con una certeza mayor a la obtenida con los métodos de selección actuales basados en la morfología embrionaria. La nueva metodología de diagnóstico desarrollada resulta no invasiva, rápida, simple, confiable y se independiza de interpretaciones subjetivas del operador. Asimismo, estas tecnologías en combinación con otros métodos multivariantes no supervisados permitieron analizar aspectos importantes asociados a la fertilización asistida. Esta investigación constituye un aporte significativo en el área de fertilización asistida ya que optimiza la elección de embriones a través del uso de una técnica inédita, que permitiría disminuir los riesgos que conlleva los embarazos múltiples y mejorar la efectividad de estos tratamientos, donde la conclusión no exitosa de los mismos genera graves consecuencias en los pacientes.

1.1 Conclusiones particulares

Módulo A Obtención de embriones y sobrenadantes de cultivos de embriones *in vitro* y
Módulo B Construcción de una plataforma para almacenar, extraer y utilizar la
información generada

En base al estudio realizado de acuerdo al *trial clínico*, que se llevó a cabo sobre una población de 414 pacientes, restringida a pacientes menores a 42 años, que presentaban infertilidad de más de 1 año de duración, con no más de 2 tratamientos de fertilización previos, se obtuvieron las siguientes conclusiones:

- La utilización del **OpenClinica** como plataforma informática para la recopilación y administración de datos en *trial clínicos*, donde intervienen varias instituciones y pacientes, mostró ser una herramienta versátil y eficaz por las posibilidades que brinda tanto en la verificación de inconsistencias, como en la aplicación de "Buenas Prácticas en Manejo de Datos para Investigación". Para este trabajo de Tesis ajustarnos a este procedimiento si bien al principio resultó muy tedioso, con el tiempo demostró ser esencial para el racional manejo de toda la información que se fue recopilando en una temática que es multifacética.
- La mayor causa de infertilidad dentro de las parejas de la población estudiada, se debió al factor masculino.
- Se comprobó una relación indirecta entre la edad de la mujer y la probabilidad de éxito de los Tratamientos de Fertilización Asistida. Las mujeres menores de 39 años tuvieron la mayor tasa de éxito. En mujeres mayores de 40 años la tasa de embarazo fue menor al 10%.
- Este estudio mostró una prevalencia de mujeres de edad más avanzada (mayor a 40 años), dentro de las que recurren a los tratamientos de fertilización asistida. En este sentido, se observó la mayor incidencia en mujeres entre 34 a 40 años, aunque seguramente si el estudio hubiera incluido pacientes mayores de 42 años esta tendencia se habría profundizado.
- En la población analizada se vio una relación entre la morfología embrionaria y la probabilidad de implantación. Las pacientes que mostraron doble implantación fueron transferidas con embriones de morfología I y II.
- A pesar que la mayoría de los pacientes incluidos en este estudio eran no fumadores, se puede ver una disminución de la tasa de embarazo clínico en fumadoras activas durante la realización del tratamiento.

Módulo C Análisis de sobrenadantes de cultivo de embriones por FTIR

- El espectrómetro FTIR VERTEX 70 acoplado al módulo externo HTS-XT de alta performance y la implementación del software OPUS/LAB resultaron herramientas muy apropiadas para el desarrollo de este tipo de estudios, por su gran sensibilidad y reproducibilidad en la respuesta a lo largo del tiempo.
- La estandarización de la toma de muestra y registro de espectros en los análisis de espectroscopía IR son un paso fundamental para lograr una buena reproducibilidad entre las medidas.
- El pre-procesamiento de los espectros adquiridos demostró ser un paso indispensable para eliminar de manera sencilla y eficaz los espectros *outliers* y desarrollar modelos de predicción robustos y estables, mejorando la interpretabilidad de los resultados.
- La comprobación de la baja variabilidad espectral de los medios de cultivo a lo largo del tiempo en que se llevó a cabo este trabajo y entre los distintos lotes, aseguraron la posibilidad de poder desarrollar un método de evaluación del potencial de implantación basado en el estudio de la metabolómica en los sobrenadantes de cultivo de embriones.
- Este estudio demuestra por primera vez el potencial que tiene la aplicación de espectroscopía FTIR empleando la técnica del film seco, para analizar la metabolómica embrionaria a partir de sobrenadantes de cultivo de embriones de 3 días de incubación.
- La morfología embrionaria estudiada a través de microscopía óptica pareciera no guardar relación con la metabolómica embrionaria estudiada por medio de espectroscopía FTIR.
- Se desarrolló un sistema basado en **Redes Neuronales Artificiales**, al que denominamos *IRlife1* que permite predecir el potencial de implantación de embriones previo a su transferencia en un tratamiento de fertilización (66% de sensibilidad, 85% de especificidad y 81% de exactitud). La nueva metodología de diagnóstico es no invasiva, rápida, simple, confiable y se independiza de interpretaciones subjetivas del operador.
- La aplicación de modelos matemáticos basados en Análisis Factorial (AF) o Análisis de Componente Principal (ACP), realizado a través del software MATLAB, permitieron estudiar la variabilidad y heterogeneidad de los espectros, y confirmaron que si bien los espectros de sobrenadantes de cultivo que provienen de embriones que implantaron poseen baja heterogeneidad, los que provienen de embriones que no implantaron son sumamente heterogéneos.

- Los análisis de tipo Mínimos Cuadrados Parciales (PLS) que combinaron datos de espectros FTIR asociados a la metabolómica y el conjunto de datos de los pacientes y embriones confirmaron que la metabolómica embrionaria tiene un papel clave en el proceso de implantación del embrión, sin embargo ésta representa un evento multifactorial.

A partir de estas investigaciones se han generado nuevos conocimientos en esta temática que sientan precedentes importantes para continuar con el desarrollo de futuros ensayos basados en FTIR combinados con métodos multivariantes con el fin último de desarrollar una metodología que permite transferir la menor cantidad de embriones con la mayor probabilidad de éxito de implantación.

Anexos

Anexo I



757

Comité de Ética en Investigación
Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas "Norberto Quirno"

FORMULARIO DE APROBACIÓN

Buenos Aires, 23 de julio de 2012

Investigador Principal: Dr. Horton

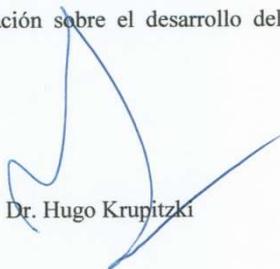
EN REFERENCIA A:

Título del protocolo: "Development of a non-invasive method for selection of human embryos with high implantation potencial based on Fourier Transform Infrared (FT-IR) spectroscopy and artificial neuronal networks"

El Comité de Ética en Investigación del CEMIC resolvió aprobar el protocolo de referencia y su consentimiento informado.

El Comité requerirá, cuando lo crea oportuno, información sobre el desarrollo del presente estudio y podrá reconsiderar su valoración inicial.

Saluda a Ud. atte.


Dr. Hugo Krupitzki

Miembros del Comité:

Enrique Gadow – Académico, Presidente
Hugo Krupitzki - Prof. IUC, Efectividad Clínica
Roberto Lede – Médico, Investigador CONICET, Asesor externo
Ana María Martirena - Lego
Julio Ravioli - Médico Legista
Juan Carlos Tealdi - Médico, Bioeticista
José Molina – Enfermero
Analía López – Médica, Efectividad Clínica
Sebastián Lipina – Psicólogo, Investigador CONICET
María Eufemia Juárez – Lego

Consultores:

Roberto Arana - Académico
Jorge López Camelo - Investigador CONICET

Calificaciones Internacionales:

Department of Health and Human Services (HHS) IRB00001745 - IORG 0001315

Anexo II

**Consentimiento
Informado
PROTOCOLO
METABOLÓMICA**

Consentimiento para participar en un estudio de investigación clínica y autorización para divulgar información médica

Título del estudio

Desarrollo de un método no invasivo para selección embrionaria mediante el análisis espectroscópico del medio de cultivo en Fertilización In Vitro.

Lugar de realización

- PREGNA Medicina Reproductiva, JUNCAL 3490 (C1425AYV)
- CINDEFI, (CONICET) Universidad Nacional de La Plata Calle 115 y 47



Por favor, lea atentamente la siguiente información y no dude en realizar cualquier consulta a su médico, quien responderá cualquier pregunta que tenga acerca de la misma. Su participación en el estudio no perjudicará en ningún caso su tratamiento de Fertilización Asistida, no afectará sus resultados, ni tampoco le ocasionará gastos adicionales.

Objetivo Principal

Poder crear un método no invasivo de evaluación embrionaria, que permita en el futuro seleccionar con mayor precisión el/los embriones con mayor potencial de implantación.

Fundamento Teórico

Un problema que se presenta frecuentemente al realizar una fertilización asistida (FIV o ICSI) es determinar cuáles son los embriones que tienen mayor probabilidad de implantar y generar un embarazo. Actualmente esto se realiza mediante una evaluación morfológica del embrión, es decir, los biólogos en el laboratorio miran los embriones con el microscopio y evalúan la morfología de las células de los embriones dándoles un puntaje.

Los embriones se colocan en un líquido (medio de cultivo) especialmente diseñado que permite su crecimiento y desarrollo. Luego de realizar la transferencia de los embriones al útero, este líquido habitualmente es descartado.

Estudios recientes han demostrado que los embriones eliminan ciertas sustancias al medio de cultivo que los rodea, y en algunos Centros mundiales se están realizando estudios sobre ese líquido para tratar de determinar qué sustancias son las que produce y elimina el embrión al medio de cultivo. La finalidad de esto es realizar una mejor selección embrionaria para aumentar las probabilidades de embarazo sin aumentar el riesgo de embarazo múltiple y sin perjudicar al embrión.

Procedimientos

Se incluirán aquellas pacientes de hasta 42 años que requieran una Fertilización in Vitro para el tratamiento de su infertilidad. El momento de la transferencia embrionaria (día 3 o día 5 de desarrollo) dependerá de lo determinado en conjunto con su médico de cabecera y en ningún caso se verá afectado por este estudio. Asimismo, la selección de embriones para transferir se hará siguiendo los criterios actuales, descriptos anteriormente, según la morfología del embrión.

www.pregna.com.ar

Consentimiento Informado

PROTOCOLO METABOLÓMICA

Una vez realizado el tratamiento de FIV según las pautas clínicas habituales de PREGNA, y transferidos el/los embriones al útero, el biólogo tomará una muestra del medio de cultivo en el cual estuvo desarrollando el embrión, y esa muestra se criopreservará para enviar en forma diferida al CINDEFI de La Plata para su posterior análisis.

Efectos adversos posibles

El estudio no tiene complicaciones ya que utiliza un material que normalmente se descarta (medio de cultivo donde se encontraba el embrión), luego de que se transfirió el mismo al útero.

Información de contacto

Podrá realizar preguntas acerca de este formulario o del estudio en todo momento y su médico tratante podrá aclarar cualquier duda al respecto. Si Ud tiene preguntas adicionales durante el curso del estudio podrá dirigirlas a su médico de cabecera, o eventualmente a los coordinadores del Proyecto, Dres. Marcelo Garcea, Ignacio de Zuñiga, o Marcos Horton en Pregna, con dirección en JUNCAL 3490 (C1425AYV), Argentina, Tel. (5411) 4831-5900

En caso de duda sobre sus derechos de cómo participar de un estudio de investigación puede comunicarse con el Comité de Ética de CEMIC al 4546-8228.

Participación voluntaria/Procedimientos para el fin de su participación

La participación en este estudio es completamente voluntaria. Podrá/n negarse a participar o discontinuar la participación en cualquier momento durante el estudio. El negarse a participar del estudio no influirá de ningún modo en los tratamientos o seguimientos que debe/n recibir.

Confidencialidad y autorización de acceso y uso de la información médica

La información recabada durante el presente estudio será conservada en forma confidencial en la medida de lo dispuesto por las leyes nacionales (Ley de Habeas Data 25.326 y Ley de Derechos del Paciente 26529). Solo se utilizará un número como identificación. No habrá identificación personal en ningún informe o publicación que pudiera resultar de este estudio de investigación.

La firma del presente formulario implica su aceptación para participar en este estudio y que autoriza a PREGNA Medicina Reproductiva a utilizar la información descripta anteriormente para llevar a cabo el objeto del estudio de investigación.

Tiene/n derecho a ver y copiar la información médica recabada durante el curso de la investigación.

Declaración de consentimiento y autorización del paciente

He/hemos leído y comprendido las declaraciones contenidas en el presente consentimiento informado. He/mos tenido la oportunidad de realizar preguntas que han sido respondidas y explicadas a mi entera satisfacción durante el proceso de consentimiento. Acepto/amos voluntariamente participar en el estudio, autorizando el uso de la información relacionada con el estudio. Comprendo que recibiré/recibiremos una copia firmada del presente formulario de consentimiento y autorización.

www.pregna.com.ar

de

Consentimiento Informado
PROTOCOLO METABOLÓMICA

Anexo III

Pregna	Desarrollo de un método no invasivo para la selección de embriones humanos con alto potencial de implantación basado en la espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (FT-IR) y redes artificiales neuronales	
Versión 2.1 21/09/12	Formulario 00: Evaluación de Elegibilidad	Página 1 de 1

Evaluación de los criterios de elegibilidad

	Si	No
Paciente con indicación de FIV/ICSI		
3 o menos ciclos previos de FIV/ICSI		
Edad menor a 42 años		
Endocrinopatía no tratada o no controlada		
Aborto recurrente		
Hydrosalpinx no tratado		
Miomas submucosos		
Miomas intramurales > 5 cm		
Adenomiosis confirmada por laparoscopia o biopsia		
Pólipos endometriales		
Hiperplasia endometrial		
Anomalías müllerianas conocidas		
Trombofilias previamente diagnosticadas		
Enfermedades crónicas que el médico tratante considere que pueden impactar en el resultado reproductivo		
Factor masculino severo que requiere tratamiento con biopsia testicular		

Consentimiento otorgado por la mujer:

1. Si
 2. No

→ Razón por la cual no consiente:

Fecha: ___/___/___

Si la mujer consiente, complete y pegue etiqueta

Nombre y Apellido de la mujer	Pegue etiqueta
	<div data-bbox="986 300 1251 398" style="border: 1px solid black; border-radius: 10px; padding: 5px; text-align: center;">Pegar etiqueta con número de estudio</div>

Nombre del médico: _____

Firma: _

Pregna	Desarrollo de un método no invasivo para la selección de embriones humanos con alto potencial de implantación basado en la espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (FT-IR) y redes artificiales neuronales	Pegar etiqueta con número de paciente
Versión 2.1 21/09/12	Formulario 01: Admisión	Página 1 de 2

A. DATOS DE LA MUJER

1. Fecha de nacimiento: ___/___/___

2. Fumadora

1. Si → CONTINUE EN PREGUNTA 4
2. Ex - fumador
3. Nunca fumo → CONTINUE EN PREGUNTA 6
4. No disponible en HC → CONTINUE EN PREGUNTA 6

3. Edad en que dejo de fumar: _____ años No disponible en HC

4. N° de cigarrillos diarios que fuma/fumaba: _____ No disponible en HC

5. Edad que comenzó a fumar: _____ años No disponible en HC

6. Infertilidad primaria:

1. Si → CONTINUE EN PREGUNTA 7
2. No

6.1. N° de gestas: _____ No disponible en HC

6.2. N° de partos o cesáreas: _____ No disponible en HC

6.3. N° de abortos: _____ No disponible en HC

6.4. N° de embarazos ectópicos: _____ No disponible en HC

7. N° de ciclos previos de trat. de alta complejidad: _____ No disponible en HC

8. Factor femenino:

1. Si
2. No → CONTINUE EN PREGUNTA 10
3. No disponible en HC

9. Tipo de Causa ovulatoria/No ovulatoria

- 1. PCO
- 2. Baja respuesta
- 3. Edad reproductiva avanzada
- 4. EDT
- 5. Tubo-peritoneal
- 6. Otro_____
- 7. No disponible en HC

Pregna	Desarrollo de un método no invasivo para la selección de embriones humanos con alto potencial de implantación basado en la espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (FT-IR) y redes artificiales neuronales	Pegar etiqueta con número de paciente
Versión 2.1 21/09/12	Formulario 01: Admisión	Página 2 de 2

10. FSH Previa (último valor): _____ UI/mL No disponible en HC

11. AMH: _____ ng/mL No disponible en HC

12. RFA (Folículos totales en ambos ovarios)

- 12.1. Cantidad menor o igual a 6 _____ No disponible en HC
- 12.2. Cantidad entre 7 y 12: _____ No disponible en HC
- 12.3. Cantidad mayor o igual a 12 _____ No disponible en HC

B. DATOS DE LA PAREJA (completar solo si se utilizará semen autólogo para el ciclo)

13. Factor masculino que requiere ICSI:

1. Si
2. No
3. No disponible en HC

14. Fecha de nacimiento: ____/____/____ No disponible en HC

15. Semen autólogo:

1. Si
2. No
3. No disponible en HC

16. Fumador

1. Si
2. Ex-fumador
3. Nunca fumo
4. No disponible en HC

17. Fecha en que se completo el formulario: ____/____/____

18. Persona que completó el formulario: _____

Firma: _____

Pregna	Desarrollo de un método no invasivo para la selección de embriones humanos con alto potencial de implantación basado en la espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (FT-IR) y redes artificiales neuronales	Pegar etiqueta con número de paciente
Versión 2.1 21/09/12	Formulario 02: Datos del tratamiento	Página 1 de 2

1. Peso al comenzar el estímulo: _____ kg No disponible en HC

2. Talla: _____ cm No disponible en HC

3. Pretratamiento (tratamiento previo a comenzar el estímulo)

- 1. Si
- 2. No → CONTINUE EN PREGUNTA 5
- 3. No disponible en HC

4. Tipo de Pretratamiento

- 1. ACOS
- 2. Noresteroides
- 3. Nosteroides/estradiol
- 4. Estradiol
- 5. No disponible en HC

5. Fecha de última menstruación: ____/____/____ No disponible en HC

6. Dosajes hormonales del Ciclo de tratamiento

- 6.1. Estradiol: _____ pg/ml No disponible en HC
- 6.2. FSH: _____ U/l No disponible en HC
- 6.3. LH: _____ U/l No disponible en HC
- 6.4. Progesterona: _____ ng/ml No disponible en HC

7. Fecha de inicio de la estimulación

con gonadotrofinas: ____/____/____ No disponible en HC

8. Protocolo de estimulación

- 1. Antagonistas
- 2. Agonistas
- 3. Otros
- 4. No disponible en HC

9. Recibió estimulación con LH:

- 1. Si
- 2. No
- 3. No disponible en HC

10. Dosis total de gonadotrofinas (FSH + LH): _____ ui No disponible en HC

11. Días totales de estímulo: _____ No disponible en HC

2. Ciclo continúa hacia punción folicular

- 1. Si
- 2. No → Especifique
- razón: _____

3. No disponible en HC

**Si responde No o la información no está disponible en HC → CICLO CANCELADO. Fin de formulario.
Firme y feche el formulario**

13. Descarga de ovulación

- 1. hCG
- 2. GnRHα
- 3. No disponible en HC

14. Grosor endometrial día de descarga: _____ mm No disponible en HC

15. Tipo de endometrio día de descarga: No disponible en HC

- 1. Tipo I (Trilaminar)
- 2. Tipo II (Homogeneo)
- 3. No disponible en HC

16. Estradiol día de la descarga de la ovulación: _____ pg/ml No disponible en HC

17. Progesterona día de la descarga de la ovulación: _____ ng/ml No disponible en HC

18. Punción folicular realizada

- 1. Si
- 2. No

Si responde No → Fin de formulario. Firme y feche el formulario. No complete el resto de los formularios para esta participante

19. Fecha en que se completo el formulario: ____/____/____

20. Persona que completó el formulario: _____

21. Observaciones: _____

Firma: _____

<p>Pregna</p>	<p>Desarrollo de un método no invasivo para la selección de embriones humanos con alto potencial de implantación basado en la espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (FT-IR) y redes artificiales neuronales</p>	<p>Pegar etiqueta con número de paciente</p>
<p>Versión 2.1 21/09/12</p>	<p>Formulario 03: Datos recolectados durante la Fertilizacion in vitro</p>	<p>Página 7 de 7</p>

1. Fecha de la punción folicular: _____ / _____ / _____

Dato no disponible

2. Volumen inicial: _____ ml

Dato no disponible

3. Concentración inicial: _____ x10⁶/ml

Dato no disponible

4. Motilidad Progresiva a+b inicial: _____ %

Dato no disponible

5. Volumen final: _____ ml

Dato no disponible

6. Concentración final: _____ x10⁶/ml

Dato no disponible

7. Motilidad Progresiva a+b final: _____ %

Dato no disponible

8. Morfología espermática: _____

Dato no disponible

9. Fecha de la morfología: _____ / _____ / _____

Dato no disponible

DIA 0:

10. N° de ovocitos totales: _____

Dato no disponible

11. N° de ovocitos M2: _____ Dato no

disponible

12. Tipo de tratamiento:

1. FIV → N° de ovocitos inseminados: _____ Dato no
disponible

2. ICSI → N° de ovocitos inyectados: _____
Dato no disponible

3. Dato no disponible

Datos del medio de cultivo (G1)

13. Lote Número G1: _____ Dato no

disponible

14. Fecha de vencimiento G1: ____/____/____ Dato no

disponible

15. Fecha apertura del frasco G1: ____/____/____ Dato no

disponible

Datos del aceite (G1)

16. Lote Número Aceite G1: _____

Dato no disponible

17. Fecha de vencimiento Aceite G1: ____/____/____

Dato no disponible

18. Fecha apertura del frasco Aceite G1: ____/____/____

Dato no disponible

DIA 1

19. Cantidad de embriones

	<i>0PN</i>	<i>1PN</i>	<i>2PN</i>	<i>3PN</i>	<i>4PN</i>	<i>Lisados</i>
Cantidad de embriones						
No disponible en HC	<input type="checkbox"/>					

20. Clivaje temprano de embriones

Número de embrión	Clivaje temprano	Dato no disponible
01	1. Si <input type="checkbox"/> 2. No <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
02	1. Si <input type="checkbox"/> 2. No <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
03	1. Si <input type="checkbox"/> 2. No <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
04	1. Si <input type="checkbox"/> 2. No <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
05	1. Si <input type="checkbox"/> 2. No <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
06	1. Si <input type="checkbox"/> 2. No <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

21. Horas de incubación pre clivaje temprano: _____hs

DIA 2

22. Transferencia embrionaria realizada en día 2

- 1. Si
- 2. No → CONTINUE EN PREGUNTA 24
- 3. Dato no disponible → CONTINUE EN PREGUNTA 24

23. Fecha de transferencia : _____/_____/_____

Dato no disponible

Si es respondió si → Fin de formulario. Firme y feche el formulario

Datos del medio de cultivo (G2)

24. Lote Número G2: _____

Dato no disponible

25. Fecha de vencimiento G2: ____/____/____

Dato no disponible

26. Fecha apertura del frasco G2: ____/____/____

Dato no disponible

Datos del aceite (G2)

27. Lote Número Aceite G2: _____

Dato no disponible

28. Fecha de vencimiento Aceite G2: ____/____/____

Dato no disponible

29. Fecha apertura del frasco Aceite G2: ____/____/____

Dato no disponible

DIA 3

30. Transferencia embrionaria realizada en día 3

- 1. Si
- 2. No → CONTINUE EN PREGUNTA 37
- 3. Dato no disponible → CONTINUE EN PREGUNTA 37

31. Fecha de transferencia : ____/____/____

Dato no disponible

Pegar etiqueta con número de estudio

32. ID del blanco G1:

33. Información de los embriones

Número de embrión	Calidad	Número de blastomeras	Blastómeras desparejas	Destino	ID del líquido	Fecha de envío a la Plata
01					Pegar etiqueta con número de estudio	
02					Pegar etiqueta con número de estudio	

03					Pegar etiqueta con número de estudio	
04					Pegar etiqueta con número de estudio	
05					Pegar etiqueta con número de estudio	
06					Pegar etiqueta con número de estudio	
07					Pegar etiqueta con número de estudio	
08					Pegar etiqueta con número de estudio	
09					Pegar etiqueta con número de estudio	
10					Pegar etiqueta con número de estudio	
11					Pegar etiqueta con número de estudio	
12					Pegar etiqueta con número de estudio	

34. Horas de incubación pre-transferencia: _____

Dato no disponible

35. Calidad de la transferencia:

1. A
2. B
3. C
4. D
5. Dato no disponible

36. Hubo embriones para cultivo prolongado:

1. Si
2. No
3. Dato no disponible

Si responde No o la información no está disponible → Fin de formulario. Firme y feche el formulario

DIA 5

37. Transferencia embrionaria realizada en día 5

1. Si
2. No
3. Dato no disponible

Si responde No o la información no está disponible → Fin de formulario. Firme y feche el formulario

38. Fecha de transferencia : _____ / _____ / _____

Dato no disponible

39. ID del blanco G2:

Pegar etiqueta con número de estudio

40. Información de los blastocistos

Número de embrión	Estadio de desarrollo	Calidad MCI	Calidad Trofoectodermo	Destino	ID del líquido	Fecha de envío a la Plata
01					Pegar etiqueta con número de estudio	
02					Pegar etiqueta con número de estudio	
03					Pegar etiqueta con número de estudio	
04					Pegar etiqueta con número de estudio	
05					Pegar etiqueta con número de estudio	
06					Pegar etiqueta con número de estudio	
07					Pegar etiqueta con número de estudio	
08					Pegar etiqueta con número de estudio	
09					Pegar etiqueta con número de estudio	
10					Pegar etiqueta con número de estudio	

41. Horas de incubación pre-transferencia: _____
disponible

Dato no

42. Calidad de la transferencia:

- 1. A
- 2. B
- 3. C
- 4. D
- 5. Dato no disponible

43. Fecha en que se completó el formulario: _____ / _____ / _____

44. Persona que completo el formulario: _____

Firma: _____

Pregna	Desarrollo de un método no invasivo para la selección de embriones humanos con alto potencial de implantación basado en la espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (FT-IR) y redes artificiales neuronales	Pegar etiqueta con número de paciente
Versión 2.1 21/09/12	Formulario 04: Envío de muestras de medio de cultivos	Página 1 de 2

Información de los embriones enviados

Número de embrión	Calidad	Destino <i>0: no transf.</i> <i>1:transf.</i>	ID del líquido	Fecha de envío a la Plata	Fecha de recepción	Fecha de procesamiento	Test de calidad 0/1	Observaciones
01			Pegar etiqueta con número de estudio					
02			Pegar etiqueta con número de estudio					
03			Pegar etiqueta con número de estudio					
04			Pegar etiqueta con número de estudio					
05			Pegar etiqueta con número de estudio					
06			Pegar etiqueta con número de estudio					
07			Pegar etiqueta con número de estudio					
08			Pegar etiqueta con número de estudio					
09			Pegar etiqueta con número de estudio					
10			Pegar etiqueta con número de estudio					
11			Pegar etiqueta con número de estudio					
12			Pegar etiqueta con número de estudio					

Pregna	Desarrollo de un método no invasivo para la selección de embriones humanos con alto potencial de implantación basado en la espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (FT-IR) y redes artificiales neuronales	Pegar etiqueta con número de paciente
Versión 2.1 21/09/12	Formulario 04: Envío de muestras de medio de cultivos	Página 2 de 2

Pegar etiqueta con número de estudio

ID del blanco G1:

Información de los blastocistos

Número de embrión	Calidad	Destino <i>0: no transf.</i> <i>1:transf.</i>	ID del líquido	Fecha de envío a la Plata	Fecha de recepción	Fecha de procesamiento	Test de calidad 0/1	Observaciones
01			Pegar etiqueta con número de estudio					
02			Pegar etiqueta con número de estudio					
03			Pegar etiqueta con número de estudio					
04			Pegar etiqueta con número de estudio					
05			Pegar etiqueta con número de estudio					
06			Pegar etiqueta con número de estudio					
07			Pegar etiqueta con número de estudio					
08			Pegar etiqueta con número de estudio					
09			Pegar etiqueta con número de estudio					
10			Pegar etiqueta con número de estudio					

Pregna	Desarrollo de un método no invasivo para la selección de embriones humanos con alto potencial de implantación basado en la espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (FT-IR) y redes artificiales neuronales	Pegar etiqueta con número de paciente
Versión 2.1 21/09/12	Formulario 05: Datos del embarazo	Página 1 de 1

1. Sub-beta positiva

1. Si
 2. No
 3. No disponible en HC

Si responde No o la información no está disponible en HC → Fin de formulario. Firme y feche el formulario

2. Evolución del embarazo

1. Bioquímico
 2. Aborto clínico
 3. Embarazo Ectópico
 4. Embarazo clínico
 5. No disponible en HC

Si responde bioquímico, aborto clínico o embarazo ectópico o la información no está disponible en HC → Fin de formulario. Firme y feche el formulario

3. Tipo de embarazo:

1. Único
 2. Múltiple
 3. No disponible en HC

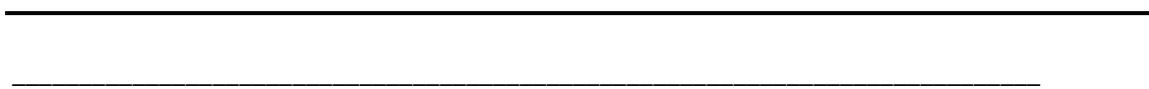
4. Fecha en que se completó el formulario: ____/____/____

5. Persona que completo el formulario: _____

Firma: _____

Pregna	Desarrollo de un método no invasivo para la selección de embriones humanos con alto potencial de implantación basado en la espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (FT-IR) y redes artificiales neuronales	Pegar etiqueta con número de paciente
Versión 2.1 21/09/12	Formulario 06: Datos del recién nacido	Página 1 de 1

1. Complicaciones durante el embarazo: _____



2. Fecha de parto: ____/____/____

Dato no disponible

3. Recién nacido:

- 1. Vivo
- 2. Muerto (Feto muerto)
- 3. Dato no disponible

4. Edad gestacional: _____

Dato no disponible

5. Sexo

- 1. Femenino
- 2. Masculino
- 3. Dato no disponible

6. Peso al nacer: |__|__|__|__| gramos

Dato no disponible

7. Si el embarazo es múltiple, complete la información del 2do gemelar:

7.1 Recién nacido 2°:

- 1. Vivo
- 2. Muerto (Feto muerto)
- 3. Dato no disponible

7.2 Edad gestacional 2° Recién Nacido: _____

Dato no disponible

7.3 Sexo 2° Recién Nacido:

- 1. Femenino
- 2. Masculino
- 3. Dato no disponible

8. Fecha en que se completó el formulario: ____/____/____

9. Persona que completo el formulario: _____

Firma: _____

Anexo IV

Procedimiento para la recolección, carga y archivo de datos

OBJETIVOS:

Instructivo para el personal involucrado para el manejo de la recolección y manejo de datos, los formularios relacionados y su correcto archivo.

ALCANCE:

Este procedimiento alcanza a todo el personal responsable en el manejo de datos del proyecto “Desarrollo de un método no invasivo para la selección de embriones humanos con alto potencial de implantación basado en la espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (FT-IR) y redes artificiales neuronales”

LISTA DE RESPONSABLES:

- IECS: IECS estará a cargo del Manejo de Datos del Proyecto

Data Manager: Luz Gibbons

Asistente de Data Manager: Mabel Berrueta

- PREGNA

Investigador Principal (PI): Marcos Horton - -Osvaldo Yantorno

Investigador/Coordinador (IN):- Marcelo Garcea

ANEXOS

- A. Formularios
- B. Planilla Excel - Envío de muestras Aceite-Cultivo
- C. Flujograma de manejo de datos **DOCUMENTOS RELACIONADOS**

Manual de Operaciones del Estudio

Manual de Manejo, Conservación y Envío de muestras biológicas

Manual de Manejo de Datos en Open Clínica

CONSULTA PRE FIV
Determinar elegibilidad, invitar a participar y completar FORMULARIO 00,01 Y 02
Responsables: Médico-Fellow

1. Tomar un set de formularios 00,01 y 02 y consentimiento informado de la Carpeta Amarilla que estará disponible en cada consultorio.
2. Al llegar la mujer a la consulta pre FIV, verificar los criterios de elegibilidad listados en el formulario 00. En los casos que los criterios se cumplan, invitarla a participar en el estudio.
3. Si la mujer acepta a participar en el estudio, pedir que firme el consentimiento informado.
4. Escribir el Nombre de la mujer y el número de HC en el formulario 00, con lápiz.
5. Asignar y pegar una Etiqueta consecutiva con el número de estudio (ID de la participante) en el consentimiento y set de formularios formulario 00, 01 y 02.
6. Colocar el ID de la participante con “color rojo” en el texto de la evolución en la HC informatizada.
7. Guardar el resto de las Etiquetas en Carpeta de Etiquetas
8. Si la mujer no consiente participar, marcar la opción “no consiente” en el formulario 00 y cerrarlo.
9. Revisar que todos los datos posibles estén completos en los formularios 00, 01,02.
10. Archivar

i) Consentimiento: en Carpeta para Consentimientos

ii) Formulario 00: separarlo del set y guardarlo en Carpeta para Formularios 00/división

CONSIENTEN ó división NO

CONSIENTEN iii) Formulario 01 y 02:

(1) Si TODOS LOS DATOS ESTAN COMPLETOS: guardar en Carpeta Formularios 01/02 División LISTOS PARA CARGAR

(2) Si FALTAN COMPLETAR DATOS: guardar en Carpeta Formularios 01/02 División PARA COMPLETAR

TRATAMIENTO
Completar datos del Tratamiento
Responsables: Médico-Fellow

11. En el momento que se Programa el Tratamiento, el médico a cargo deberá enviar un mail a los Recolectores datos (Fellows) y Biólogos con la fecha programada del procedimiento, nombre de la paciente y número de ID de la participante (Agregar en OBSERVACIONES el ID de la participante en el estudio).
12. Completar los datos del Formulario 01 y Formulario 02.
13. Archivar Formulario 01 y 02 en la Carpeta de Formularios 01 y 02 , División LISTOS PARA CARGAR

LABORATORIO PREGNA – LA PLATA
Responsables: Biólogos

14. Laboratorio Pregna: Tomar una muestra de ACEITE todos los martes, asignarle un ID (fecha de toma de muestra + letra que identifica el medio) , completar los datos en *Planilla Excel-Envío de muestras Aceite-Cultivo* (ver anexo), enviar muestra al Laboratorio de La Plata con copia de la *Planilla Excel-Envío de muestras Aceite-Cultivo* con frecuencia a determinar (ejemplo: mensual).
15. Laboratorio Pregna: Tomar una muestra de cada MEDIO DE CULTIVO todos los martes, asignarle un ID (fecha de toma de muestra + letra que identifica el medio) , completar los datos en *Planilla Excel-Envío de muestras Aceite-Cultivo* (ver anexo), enviar muestra al Laboratorio de La Plata con copia de la *Planilla Excel-Envío de muestras Aceite-Cultivo* con frecuencia a determinar (ejemplo: mensual).
16. Laboratorio Pregna-La Plata-IECS: compartirán *Planilla Excel-Envío de muestras Aceite-Cultivo* en Google Doc.
17. Laboratorio Pregna: Asignar ID de muestras embriones día 3 y día 5 a cada muestra de la participante y colocar Etiquetas sucesivas a cada tubo de muestra de embriones (EMBRIONES DIA 3, Y SI CORRESPONDE EMBRIONES DIA 5)
18. Laboratorio Pregna: Colocar etiqueta con ID de la participante en el formulario 04 en papel y completar datos y etiquetas de Muestras Blanco y Muestras Embriones día 3 y día 5 en el Formulario 04.

19. Laboratorio Pregna: Enviar Formulario 04 junto a las muestras de blancos y embriones al Laboratorio de La Plata.
20. Laboratorio Pregna: Colocar Etiqueta con ID de la participante en la Ficha del laboratorio de Pregna.
21. Laboratorio Pregna: Abrir Formulario 03 con el ID de la participante en Open Clinica y cargar los datos correspondientes.
22. Laboratorio Pregna: Todos aquellos datos que no figuren en la historia clínica y/o registros de Laboratorio correspondientes al Formulario 03 deberán marcarse como No disponibles. Si más tarde el dato es registrado en la historia clínica y/o registros de laboratorio se podrá recuperar el dato y cargar en el sistema.
23. Laboratorio Pregna: Enviar muestras de ACEITE, MEDIO DE CULTIVO, BLANCOS, EMBRIONES DIA 3 Y EMBRIONES DIA 5 a laboratorio de La Plata según procedimiento descrito en Manual Operativo de Manejo de Muestras junto a copia de *Planilla Excel-Envío de muestras AceiteCultivo* y Formulario 04 completo.
24. Laboratorio La Plata: Recibe las muestras y completa Formulario 04 en papel, las columnas: Fecha de recepción, Fecha de procesamiento, Test de calidad y Observaciones del formulario 04.
25. Laboratorio La Plata: Carga estos datos en Open Clínica

CONTROL DE LA MUJER POST TRATAMIENTO

Responsables: Médico-Fellow

26. Médico en control Post tratamiento: Completar en la Historia Clínica los datos necesarios para completar el Formulario 05 y en forma alejada el formulario 06.
27. Enviar aviso por mail a Recolectores de Datos (Fellows) para que puedan abrir el formulario 05 y más tarde el formulario 06 en Open Clínica.

DATA ENTRESTA/RECOLECTOR DE DATOS

Responsable: Fellow

28. Todos los días Revisar la Carpeta Formularios 01 y 02 PARA COMPLETAR

29. Buscar la historia clínica de esa mujer (en Formulario 00 está el nombre y ID de la participante, y en la HC está también el ID del estudio cargado, chequear ambos datos para estar seguro que está tomando los datos de la mujer correcta)
30. Completar los datos faltantes en Formularios 01 y 02, una vez completos pasarlos a Carpeta LISTOS PARA CARGAR
31. Todos los días Revisar la Carpeta Formularios 01 y 02 LISTOS PARA CARGAR
32. Cargar en OpenClinica el Formulario 01 de admisión y el Formulario 02 , de los datos del tratamiento
33. Verificar si recibió mail de *datos post tratamiento completos* en HC para abrir formularios 05 y 06.
34. Una vez por semana verificar en el Excel enviado por IECS los formularios 05 y 06 faltantes, abrirlos y completarlos con los datos de la Historia Clínica, si corresponde en el tiempo transcurrido post-tratamiento.
35. Una vez por semana verificar en el Excel enviado por IECS los formularios faltantes, abrirlos y completarlos con los datos de la Historia Clínica o del Laboratorio.
36. Todos aquellos datos que no figuren en la historia clínica y/o registros de Laboratorio deberán marcarse como No disponibles. Si más tarde el dato es registrado en la historia clínica se podrá recuperar el dato.

CONTROL DE CALIDAD DE LOS DATOS/IECS
Responsables: Luz-Mabel

37. Producción de reportes de Inconsistencias: Se suministrarán a Pregna reportes quincenales de inconsistencias que deberán ser resueltos en Pregna.
38. Producción de reportes periódicos de monitoreo de los datos: Se harán reportes mensuales sobre el estado de los participantes, el porcentaje de datos faltantes de las diferentes variables para evaluar la carga de los datos y los formularios faltantes por participante.
39. Preparación de las bases de datos para extracciones durante el estudio: Se armarán los formatos de las bases de datos en Open Clínica para que puedan ser extraídas por Pregna cuando sea necesario.

40. Extracción de datos de Open Clínica para el Laboratorio de La Plata , en forma mensual

CONTROL DE CALIDAD DE LOS DATOS/PREGNA

41. Verificar que los CRF en papel estén completos al momento de cargarlos (Formulario 01 y 02)
42. Verificar tener todos los datos para completar el CRF electrónico (Formulario 03, 05 y 06) antes de abrir el formulario en Open Clinica, y antes de cerrarlo.
43. Corregir y Cerrar inconsistencias en el sistema

ETIQUETAS

44. Etiquetas ID de la participante

i) Consentimiento ii)

Formulario 00 iii)

Formulario 01 (dos

páginas) iv) Formulario 02

(dos páginas)

v) Ficha de Laboratorio vi)

Formulario 04 (dos

páginas) vii) Otros

45. Etiquetas para muestras biológicas (ID de las muestras)

EMB0001_DIA03 al EMB4500_DIA03

EMB0001_DIA05 al EMB0560_DIA05

BL0001_DIA03 al BL0560_DIA03 (560)

BL0001_DIA05 al BL0120_DIA05 (560*0.20=~120)

46. Las mismas etiquetas que se hacen para las muestras biológicas se hacen en papel autoadhesivas para ser usadas para enviarlas a la Plata.

FORMULARIOS

Número	Tipo	Nombre	En quien se completa	Quien lo completa
Formulario 00	papel	Evaluación de Elegibilidad	Todas las mujeres pre FIV	Médico a cargo
Formulario 01	papel	Admisión	Todas las mujeres pre FIV elegibles	Médico a cargo- Completa Fellow
Formulario 02	papel	Datos del Tratamiento	Todas las mujeres pre FIV elegibles	Médico a cargo- Completa Fellow
Formulario 03	electrónico	Datos recolectados durante la Fertilización in vitro	Mujeres que se realiza punción e inician tratamiento	Biólogos
Formulario 04	papel	Envío de muestras de medio de cultivos EMBRIONES	Mujeres que obtuvieron embriones Día 3 y Día 5	Biólogos
Formulario 05	electrónico	Datos del Embarazo	Mujeres que se realizó transferencia	Fellow (toma datos de HC)
Formulario 06	electrónico	Datos del Recién Nacido	Mujeres que lograron embarazo clínico	Fellow (toma datos de HC)
Excel envío Aceite- Cultivo	Papel- Google Doc.	Excel	Muestras semanales de Aceite y Medios de Cultivo	Bióloga

CARPETAS PARA ARCHIVO

47. Carpetas con Etiquetas

i) Para Formularios ii) Para Muestras biológicas iii) Para
Formulario 04 (iguales números que para Muestras
Biológicas)

48. Carpeta Amarilla con Formularios 00/01/02 en Blanco y Consentimientos en cada consultorio

49. Carpeta para archivar CONSENTIMIENTOS

50. Carpeta Formularios 00 , división CONSIENTEN/división NO CONSIENTEN

51. Carpeta Formularios 01/02 división LISTOS PARA CARGAR/ división PARA COMPLETAR/ división CARGADOS

52. Carpeta Formulario 04 y planilla EXCEL de envío de muestras de Aceite y Cultivo a La Plata
(Laboratorio)

LISTA DE LOS RESPONSABLES EN EL ESTUDIO Y SUS ROLES
--

Nombre del Staff	Rol	Funciones	email
MARCOS HORTON	P Investigator PREGNA	Coordinación gral, responsable ante sponsor	mhorton@pregna.com.ar
MARCELO GARCEA	Study Coordinator	Coordinación y control de data entry /clínica/nexo con LP	mgarcea@pregna.com.ar
IGNACIO DE ZUÑIGA	Director Científico PREGNA	Control interno/monitoreo PREGNA	idezuniga@pregna.com.ar
MARIANA GOMEZ PEÑA	Bióloga	Coordinación gral lab, data entry lab preгна/logística muestras	mgomezpena@pregna.com.ar
CLAUDIO BISIOLI	Jefe Laboratorio PREGNA	Responsable laboratorio PREGNA	cbisioli@pregna.com.ar
NORA BOUZAS	Bióloga		nbouzas@pregna.com.ar

		Data entry lab pregna	
CLAUDIA SANJURJO	Bióloga	Data entry lab pregna	csanjurjo@pregna.com.ar
ALEJANDRA BOSCH		Data entry lab LA PLATA y análisis espectral LP	bosch@quimica.unlp.edu.ar
OSVALDO YANTORNO	P Investigator LP	Análisis espectral LP	yantorno@quimica.unlp.edu.ar
MARIANA AVACA	Médica	Data entry clínica/control consentimientos	mavaca@pregna.com.ar
MA.EUGENIA ALVAREZ PLETA	Médica	Data entry clínica/control consentimientos	ealvarezpleta@pregna.com.ar
HERNAN PETTOROSI	Médico	Data entry clínica/control consentimientos	hpettorossi@pregna.com.ar
LUZ GIBBONS	Estadística	Data Manager IECS	luzgibbons@gmail.com
MABEL BERRUETA	Médica	Asistente Data Manager IECS	mberrueta@iecs.org.ar

Bibliografía

Abrams, Ch. B. 1993. IR Tutor. [V 1.0] USA, Columbia University in collaboration with Perkin Elmer

Adamson, G.D. (2009). Global cultural and socioeconomic factors that influence access to assisted reproductive technologies. *Womens Health*, 5,351–358

Afseth, N. K., & Kohler, A. (2012). Extended multiplicative signal correction in vibrational spectroscopy, a tutorial. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 117, 92–99

Agarwal, A., Makker, K., Sharma, R., (2008). Clinical Relevance of Oxidative Stress in Male Factor Infertility: An Update. *American Journal of Reproductive Immunology*, 59, 2-11.

Ahlström, A., Wikland, M., Rogberg, L., Barnett, J.S., Tucker, M., Hardarson, T. (2011). Cross-validation and predictive value of near-infrared spectroscopy algorithms for day-5 blastocyst transfer. *Reproductive BioMedicine Online*, 22,477–484

Alemán, A., Morello, P., Colomar, M., Llambi, L., Berrueta, M., Gibbons, L., et al. (2016). Brief Counseling on Secondhand Smoke Exposure in Pregnant Women in Argentina and Uruguay. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(1), 28.

Alfarawati, S., Fragouli, E., Colls, P., Stevens, J., Gutierrez-Mateo, C., Schoolcraft, W.B., et al. (2011). The relationship between blastocyst morphology, chromosomal abnormality, and embryo gender. *Fertility and Sterility*, 95(2), 520-4

Al-Inany, H.G., Youssef, M.A., Ayeleke, R.O., Brown, J., Lam, W.S, (2016). Gonadotrophin-releasing hormone antagonists for assisted reproductive technology. *The Cochrane Collaboration*. Published by John Wiley & Sons, Ltd.

Andersen, A. N., Goossens, V., Ferraretti, A.P., Bhattacharya, S., Felberbaum, R., de Mouzon, J., Nygren, K.G. (2008). Assisted reproductive technology in Europe, 2004: results generated from European registers by ESHRE. *Human Reproduction*, 23(4), 756–771

Anifandis, G., Bounartzi, T., Messini, C., Dafopoulos, K., Sotiriou, S., Messinis, I. (2014). The impact of cigarette smoking and alcohol consumption on sperm parameters and sperm DNA fragmentation (SDF) measured by Halosperm®. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 290(4), 777–82

Aune, D., Saugstad, O.D., Henriksen, T., Tonstad, S. (2014). Maternal body mass index and the risk of fetal death, stillbirth, and infant death: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*, 311, 1536–46

Baker, M. J., Trevisan, J., Bassan, P., Bhargava, R., Butler, H. J., Dorling, K. M., et al. (2014). Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials. *Nature Protocols*, 9(8), 1771–91

Balaban, B., Brison, D., Calderón, G., Catt, J., Conaghan, J., Cowan, L., et al. (2011). The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Human Reproduction*, 26(6), 1270-1283

Barros San Cristóbal, M.J. (2014). Agonistas versus antagonistas: resultados en FIV e ICSI. URI: <http://hdl.handle.net/10651/29230>

Barth, A., & Zscherp, C. (2002). What vibrations tell about proteins. *Quarterly reviews of biophysics*, 35(04), 369-430.

Basten, S., Sobotka, T., Zeman, K., (2013). Future fertility in low fertility countries (No. 5/2013). Vienna Institute of Demography Working Papers countries. VID Aworking paper 5/2013.

Baxter Bendus, A.E., Mayer, J.F., Shipley, S.K., Catherino, W.H. (2006). Inter observer and intra observer variation in day 3 embryo grading. *Fertility and Sterility*, 86, 1608–1615

Benagiano, G., Bastianelli, C., Farris, M. (2006). Infertility: a global perspective. *Minerva Ginecologica*, 58: 445-457

Berrueta, L.A., Alonso-Salces, R.M., Heberger, K. (2007). Supervised pattern recognition in food analysis. *Journal of Chromatography A*, 1158, 196–214

Boivin, J., Bunting, I., Collins, J.A., Nygren, K.G. (2007). International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Human Reproduction*, 22, 1506–1512

Bold, J. (2016) Chapter 4 Introduction to female factors in infertility and pregnancy loss. *Integrated approaches to infertility, IVF and recurrent miscarriage*. Bold J., Bedford S. (Ed.) Published by Singing Dragon

Bolton, V.N., Hawes S.M., Taylor, C.T. (1989). Development of spare human preimplantation embryos in vitro: an analysis of the correlations among gross morphology, cleavage rates, and development to the blastocyst. *Journal of in Vitro Fertilization and Embryo Transfer*, 6, 30-5.

Bosch, A., Miñán, A., Vescina, C., Degrossi, J., Gatti, B., Montanaro, P., Messina, M, Franco, M., Vay,C., Schmitt, J., Naumann, D., Yantorno, O. (2008). Fourier transform infrared spectroscopy for rapid identification of nonfermenting gram-negative bacteria isolated from sputum samples from cystic fibrosis patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(8), 2535–2546

Bosch, A., Prieto, C., Serra, D. O., Martina, P., Stämmbler, M., Naumann, D., Schmitt, J., Yantorno, O. (2010). Type-IV pili spectroscopic markers: applications in the quantification of piliation levels in *Moraxella bovis* cells by a FT-IR ANN-based model. *Journal of Biophotonics*, 3(8–9), 522–33

Botros, L., Sakkas, D., Seli, E. (2008). Metabolomics and its application for non-invasive embryo assessment in IVF. *Molecular Human Reproduction*, 14(12), 679–690

Brewer, C.J., Balen, A.H. (2010). The adverse effects of obesity on conception and implantation. *Reproduction*, 140,347–64

Brison, D. R., Hollywood, K., Arnesen, R., Goodacre, R. (2007). Predicting human embryo viability: the road to non-invasive analysis of the secretome using metabolic footprinting. *Reproductive Biomedicine Online*, 15(3), 296–302

Brison, D.R., Houghton, F.D. (2004). Identification of viable embryos in IVF by on-invasive measurement of amino acid turnover. *Human Reproduction*, 19, 2319–2324

Bruker Optik. (2011). GmbH, Rudolf-Plank-Straße 27, D-76275 Ettlingen, www.brukeroptics.com

Calhaz-Jorge, C., de Geyter, C., Kupka, M. S., de Mouzon, J., Erb, K., Mocanu, E., et al. (2016). Assisted reproductive technology in Europe, 2012: results generated from European registers by ESHRE. *Human Reproduction*, 31(8), 1638-1652

Chavarro, J.E., Ehrlich, S., Colaci, D.S., Wright, D.L., Toth, T.L., Petrozza, J.C., et al. (2012). Body mass index and short-term weight change in relation to treatment outcomes in women undergoing assisted reproduction. *Fertility and Sterility*, 98,109–16

Choi, B., Bosch, E., Lannon, B.M., Leveille, M.C., Wong, W.H., Leader, A., et al. (2013). Personalized prediction of first-cycle in vitro fertilization success. *Fertility and Sterility*, 99, 1905–11

Cinar, O., Dilbaz, S., Terzioglu, F., Karahalil, B., Yücel, C., Turk, R., Taskin, L., Kose, S.K. (2014). Does cigarette smoking really have detrimental effects on outcomes of IVF? *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology*, 174(1), 106–110

Collins, J.A. (2002). An international survey of the health economics of IVF and ICSI. *Human Reproduction Update*, 8, 265–277

Correia, P.R.M., Ferreira, M.M.C. (2007). Non-supervised pattern recognition methods: exploring chemometrical procedures for evaluating analytical data. *Química Nova*, 30:481–7

Cuadras, Carles M. 2014. “Análisis de Componentes Principales.” In *Nuevos Métodos de Análisis Multivariante*, 08023 Barcelona, Spain.

Dawson, K.J., Conaghan, J., Oстера, G.R., Robert, M.L., Winston, K.H. (1995), Delaying transfer to the third day post-insemination, to select non-arrested embryos, increases development to the fetal heart stage. *Human Reproduction*, 10, 177–182.

Dayhoff, J.E., DeLeo, J.M. (2001). Artificial neural networks. Opening the black box. *Cancer* 91, 1615-1635

de Jong, S. (1993). Simpls: an alternative approach to partial least squares regression. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 18, 251–263.

Domar, A. D., Rooney, K. L., Milstein, M., & Conboy, L. (2015). Lifestyle habits of 12,800 IVF patients: Prevalence of negative lifestyle behaviors, and impact of region and insurance coverage. *Human Fertility*, 18(4), 253-257.

Ellis, D. I., Broadhurst, D., Kell, D., Rowland, J., Goodacre, R. (2002). Rapid and Quantitative detection of the microbial spoilage of meat by FT-IR and machine learning. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(6), 2822-2828.

Ellis, D. I., Broadhurst, Goodacre, R. (2004). Rapid and quantitative detection of the microbial spoilage of beef by Fourier transform infrared spectroscopy and machine learning. *Analytica Chimica Acta* 514, 193–201

ESHRE Capri Workshop Group. Social determinants of human reproduction. (2001). *Human Reproduction*, 16:1518 –1526

Fabian, H., and Mäntele, W. (2002). Infrared Spectroscopy of Proteins. In: Chalmers JM, Griffiths PR, editors. *Handbook of Vibrational Spectroscopy*. John Wiley and Sons Ltd.p 3399-3425

Farhi, J., Ben-Haroush, A., Andrawus, N., Pinkas, H., Sapir, O., Fisch, B., et al. (2010). High serum oestradiol concentrations in IVF cycles increase the risk of pregnancy complications related to abnormal placentation. *Reproductive BioMedicine Online*, 21, 331–7

Feng, H. (2003). Molecular biology of male infertility. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 49, 19-27

Ferrer-Vaquero, A., Hadjantonakis, A.K. (2013). Birth Defects Associated with Perturbations in Pre-implantation, Gastrulation & Axis Extension: from Conjoined Twinning to Caudal Dysgenesis. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 2(4), 427–442.

Firns, S., Cruzat, V. F., Keane, K. N., Joesbury, K. A., Lee, A. H., Newsholme, P., Yovich, J. L. (2015). The effect of cigarette smoking, alcohol consumption and fruit and vegetable consumption on IVF outcomes: a review and presentation of original data. *Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E*, 13(1), 134

Freour, T., Masson, D., Mirallie, S., Jean, M., Bach, K., Dejoie, T., Barriere, P. (2008). Active smoking compromises IVF outcome and affects ovarian reserve. *Reproductive Biomedicine Online*, 16(1), 96–102

Freour, T., Masson, D., Dessolle, L., Allaoua, D., Dejoie, T., Mirallie, S. (2012). Ovarian reserve and in vitro fertilization cycles outcome according to women smoking status and stimulation regimen. *Archives Gynecology Obstetrics*, 285(4), 1177–82

Gardner, D.K., Lane, M., Stevens, J., Schoolcraft, W.B. (2001). Noninvasive assessment of human embryo nutrient consumption as a measure of development potential. *Fertility and Sterility*, 71, 1175-80

Gaur, D.S., Talekar, M.S., Pathak, V. (2010). Alcohol intake and cigarette smoking: impact of two major lifestyle factors on male fertility. *Indian Journal of Pathology and Microbiology*, 53(1), 35

Gardner, D.K., Wale, P.L., Collins, R., Lane, M. (2011). Glucose consumption of single post-compaction human embryos is predictive of embryo sex and live birth outcome. *Human Reproduction*, 26, 1981–1986.

Gardner, D. K., Phil, D., Wale, P. L. (2013). Analysis of metabolism to select viable human embryos for transfer. *Fertility and Sterility*, 99(4), 1062–1072 <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.12.004>

Gleicher, N., Kushnir, A., Barad, D.H. 2014. Preimplantation genetic screening (PGS) still in search of a clinical application: a systematic review. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 12 (22)

Glujovsky, D., Farquhar, C., (2016). Cleavage-stage or blastocyst transfer: what are the benefits and harms? *Fertility and Sterility*, 106 (2)

Gnoth, C., Godehardt, E., Frank-Herrmann, P., Friol, K., Tigges, J., Freundl, G. (2005). Definition and prevalence of subfertility and infertility. *Human Reproduction*, 20, 1144-1147

Goodacre, R., Shann, B., Gilbert, R. J., Timmins, E. M., McGovern, A. C., Alsberg, B. K., Kell, D. B., and Logan, N. A. 2000. Detection of the dipicolinic acid biomarker in *Bacillus* spores using Curie-point pyrolysis mass spectrometry and Fourier transform infrared spectroscopy. *Analytical Chemistry*, 72(1) 119-127

Gori, J., Lorusso, A. (2005). *Ginecología de Gori* (2º edición). Buenos Aires: Ed. El ateneo,

Gromski, P.S., Muhamadali, H., Ellis, D.I., Xu, Y., Correa, E., Turner, M.L., Goodacre R. (2015). Metabolomics and partial least squares-discriminant analysis – a marriage of convenience or a shotgun wedding. *Analytica Chimica Acta*, 879, 10-23

Grunert, T., Wenning, M., Barbagelata, M. S., Fricker, M., Sordelli, D. O., Buzzola, F. R., Ehling-Schulz, M. (2013). Rapid and reliable identification of *Staphylococcus aureus* capsular serotypes by means of artificial neural network-assisted fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(7), 2261–2266

Guh, D.P., Zhang, W., Bansback, N., Amarsi, Z., Birmingham, C.L., Anis, A.H. (2009). The incidence of co-morbidities related to obesity and overweight: a systematic review and meta-analysis. *BMC Public Health*, 9, 88

Gupta, N. (2013). Artificial Neural Network. *Network and Complex Systems*, 3(1), 24–28

- Haggarty, P., Wood, M., Ferguson, E., Hoad, G., Srikantharajah, A., Milne, E., Hamilton, M., Battacharya, S. (2006). Fatty acid metabolism in human preimplantation embryos. *Human reproduction*, 21(3), 766-773
- Hardarson, T., Ahlström, A., Rogberg, L., Botros, L., Hillensjö, T., Westlander, G., Sakkas, D., Wkland, M. (2012). Non-invasive metabolomic profiling of day 2 and 5 embryo culture medium: a prospective randomized trial. *Human reproduction*, 27(1), 89-96
- Haslam, D.W., James, W.P. (2005). Obesity. *The Lancet*, 366, 1197–209
- Havlik, I., Lindner, P., Scheper, T., Reardon, K.F. (2013). On-line monitoring of large cultivations of microalgae and cyanobacteria. *Trends in Biotechnology*, 31(7), 406–414
- Hayatbakhsh, M.R., Clavarino, A., Williams, G.M., Sina, M., Najman, J.M. (2012). Cigarette smoking and age of menopause: a large prospective study. *Maturitas*, 72(4), 346–52
- Helm, D., Labischinski, H., Naumann, D. (1991). Elaboration of a procedure for identification of bacteria using Fourier-transform IR spectral libraries: a stepwise correlation approach. *Journal of Microbiological Methods* 14,127–142
- Helm, D., Naumann, D. (1995). Identification of some bacterial cell components by FT-IR spectroscopy. *FEMS Microbiology Letters*, 126(1), 75–79
- Heraud, P., Wood B.R., Beardall J., McNaughton D. (2006). Effects of pre-processing of Raman spectra on in vivo classification of nutrient status of microalgal cells, *Journal of Chemometrics*, 20,193–197
- Hertig, A.T., Rock, J., Adams, E.C., Mulligan, W.J. (1954). On the preimplantation stages of the human ovum—a description of four normal and four abnormal specimens ranging from the second to the fifth day of development. *Contributions to Embryology Carnegie Institution*, 35,199–220
- Hill, I. R., Levin, I. W. (1979). Vibrational spectra and carbon–hydrogen stretching mode assignments for a series of n-alkyl carboxylic acids. *The Journal of Chemical Physics*, 70(2), 842-851.
- Hollywood, K., Brison, D. R., Goodacre, R. (2006). Metabolomics: Current technologies and future trends. *Proteomics*, 6(17), 4716–4723
- Houghton, F.D., Hawkhead, J.A. (2002). Noninvasive amino acid turnover predicts human embryo developmental capacity. *Human Reproduction*, 17, 999–1005
- Jessmon, P., Leach, R.E., Armant, D.R. (2009). Diverse Functions of HBEGF During Pregnancy *Molecular Reproduction and Development*, 76(12), 1116–1127
- Jones, H.W., Cohen, J., Cooke, I., Kempers, R. (2007) IFFS Surveillance 07. *Fertility and Sterility*, 87 (1), S1–S67

Jones, H.W., Cooke, I., Kempers, R., Brinsden, P., Saunders, D. (2010). International Federation of Fertility Societies: Surveillance 2010. www.iffsreproduction.org/documents/IFFS_Surveillance_2010.pdf (21 January 2015, date last accessed)

Jungwirth, A., Giwercman A., Tournaye H., Diemer T., Kopa Z., Dohle G., Krausz, C. (2012). European Association of Urology guidelines on Male Infertility: the 2012 update. *European Urology*, 62, 324-332

Katz-Jaffe, M. G., McReynolds, S., Gardner, D. K., & Schoolcraft, W. B. (2009). The role of proteomics in defining the human embryonic secretome. *Molecular Human Reproduction*, 15(5), 271–277

Katz-jaffe, M. G., McReynolds, S. (2013). Embryology in the era of proteomics. *Fertility and Sterility*, 99(4), 1073–1077. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.12.038>

Kaur, P., Swarankar, M. L., Maheshwari, M., Acharya, V. (2014). A comparative study between cleavage stage embryo transfer at day 3 and blastocyst stage transfer at day 5 in in-vitro fertilization/intra-cytoplasmic sperm injection on clinical pregnancy rates. *Journal of human reproductive sciences*, 7(3), 194–198

Kelly-Weeder, S., Cox, C.L. (2006). The impact of lifestyle risk factors on female infertility. *Women Health*, 44(4), 1-23

Kocourková, J., Konečná, H., Burcin, B., & Kučera, T. (2015). How old is too old? A contribution to the discussion on age limits for assisted reproduction technique access. *Reproductive biomedicine online*, 30(5), 482-492

Kohler, A., Kristian, A.N., Martens, H. (2006). *Chemometrics in Biospectroscopy*, Handbook of Vibrational Spectroscopy, PB - John Wiley & Sons, Ltd.

Kohler, A., Hanafi, M., Bertrand, D., Qannari, E.M., Oust Janbu, A., Moretro, K.N., Martens, H. (2008). Chapter 15, Interpreting several types of measurements in bioscience. *Biomedical vibrational Spectroscopy*, Edited by Peter Lasch and Janina Kneipp, Wiley-Interscience a John Wiley and Sons, Inc.

Kohler, A., Afseth, N. K., Harald, M. (2010). *Chemometrics in Biospectroscopy*. In P. R. G. and J. M. C. Eunice Li-Chan (Ed.), *Applications of Vibrational Spectroscopy in Food Science* (pp. 89–106). John Wiley & Sons, Inc.

Kohler, A., Böcker, U., Shapaval, V., Forsmark, A. (2015). High-Throughput Biochemical Fingerprinting of *Saccharomyces cerevisiae* by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *PLoS ONE*, 10(2), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118052>

Koning, A.M., Mutsaerts, M.A., Kuchenbecker, W.K., Kuchenbecher, W.K., Broekmans, F.J., Land, J.A., et al. (2012). Complications and outcome of assisted reproduction technologies in overweight and obese women. *Human Reproduction*, 27, 457–67

Kotze, D., Keskinetepe, L., Sher, G., Kruger, T., Lombard, C. (2012). A linear karyotypic association between PB-I, PB-II and blastomere using sequentially performed comparative genome hybridization with no association established between karyotype, morphologic, biochemical (sHLA-G expression) characteristics, blastocyst formation and subsequent pregnancy outcome. *Gynecologic and obstetric investigation*, 74(4), 304-312

Kotze, D., Kruger, T. F., Sher, G., Oehninger, S. (2014). A Review of Non-invasive and Invasive Embryo Characteristics to Identify the Most Competent Embryo for Transfer. *British Journal of Medicine & Medical Research*, 4(15), 2910–2930

Künzle, R., Mueller, M.D., Hänggi, W., Birkhäuser, M.H., Drescher, H., Bersinger, N.A. (2003). Semen quality of male smokers and nonsmokers in infertile couples. *Fertility and Sterility*, 79(2), 287–91

Lasch, P., Wolfgang, P. (2011). Biomedical Applications of Synchrotron Infrared Microspectroscopy. In ed. David Moss and Royal. Royal Society of Chemistry

Lasch, P. (2012). Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems Spectral pre-processing for biomedical vibrational spectroscopy and microspectroscopic imaging. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 1–15

Lasch, P. (2013). Spectral pre-processing for biomedical vibrational spectroscopy and microspectroscopic imaging. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 117, 100–114

Lecellier, A., Gaydou, V., Mounier, J., Hermet, A., Castrec, L., Barbier, G., Ablain, W., Manfait, M., Toubas, D., Sockalingum, G.D (2015) Implementation of an FTIR spectral library of 486 filamentous fungi strains for rapid identification of molds. *Food Microbiology*, 45, 126-134

Leese, H.J. (1987). Analysis of embryos by non-invasive methods. *Human Reproduction*, 2, 37–40

Legge, A., Bouzayen, R., Hamilton, L., & Young, D. (2014). The Impact of Maternal Body Mass Index on In Vitro Fertilization Outcomes. *Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 36(7), 613–619

Li, C., Wang, B. (2014) Principal Components Analysis. <http://rainicy.github.io/docs/PCA.pdf>

Lim, C. W., Chan, S. H., Visconti, A. (2011). Feed-forward neural network assisted by discriminant analysis for the spectroscopic discrimination of cracked spores *Ganoderma lucidum* : A prospective biotechnology production tool. *AMB Express*, 1(40), 2–7.

Lintsen, A., Pasker-de Jong, P., De Boer, E., Burger, C., Jansen, C., Braat, D., et al. (2005). Effects of subfertility cause, smoking and body weight on the success rate of IVF. *Human Reproduction*, 20(7), 1867–75

Liu, Y., Gold, E.B., Lasley, B.L., Johnson, W.O. (2004), Factors affecting menstrual cycle characteristics. *American Journal of Epidemiology*, 160(2), 131–40

Li-Vien, D., Colthup, N.B., Fateley, W.G., Grasselli, J.G. (1991). *The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules*. Boston: Academic Press

Luke, B.; Martin, J. The rise in multiple births in the United States: Who, what, when, where, and why. *Clin. Obstet. Gynecol.* 2004, 47, 118–133

Lux, A., Müller, R., Tulk, M., Olivieri, C., Zarrabeita, R., Salonikios, T., Wirnitzer, B. (2013). HHT diagnosis by Mid-infrared spectroscopy and artificial neural network analysis. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 8(94), 1–15

Mackey, M.E. (2016). Registro Argentino de Fertilización Asistida 2004-2014 (RAFA). <http://www.samer.org.ar/pdf/ULTIMA-RESENTACION-DEFINITIVA.pdf>

Magli, M. C., Jones, G. M., Gras, L., Gianaroli, L., Korman, I., Trounson, A. O. (2000). Chromosome mosaicism in day 3 aneuploid embryos that develop to morphologically normal blastocysts in vitro. *Human Reproduction*, 15(8), 1781–1786

Malek, K., Wood, B. R., Bambery, K. R. (2014). Chapter 15 FTIR Imaging of Tissues: Techniques and Methods of Analysis. In M. B. (ed.) (Ed.), *Optical Spectroscopy and Computational Methods in Biology and Medicine, Challenges and Advances in Computational Chemistry and Physics* (Springer S, pp. 419–473)

Maquelin, K., Kirschner, C., Choo-Smith, L.P., Ngo-Thi, N.A., van Vreeswijk, T., Stammli, M., Endtz, H.P., Bruining, H.A., Naumann, D., Puppels, G.J. (2003). Prospective study of the performance of vibrational spectroscopies for rapid identification of bacterial and fungal pathogens recovered from blood cultures. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 324-329

Mariey, L., Signolle, J. P., Amiel, C., Travert, J. (2001). Discrimination, classification, identification of microorganisms using FTIR spectroscopy and chemometrics. *Vibrational Spectroscopy*, 26(2), 151-159

Martin, J.A., Hamilton, B.E., Ventura, S.J., Menacker, F., Park, M.M., Sutton, P.D. (2002). Births: Final Data for 2001. *National Vital Statistics Reports*, 51(2)

Mascarenhas, M.N., Flaxman, S.R., Boerma, T., Vanderpoel, S., Stevens, G.A. (2012). National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. *PLOS Medicine*, 9, 1–12

Matsunaga, M. (2010). How to Factor-Analyze Your Data Right : Do's, Don'ts, and How-To's. *International Journal of Psychological Research*, 3(1), 97–110

Mertzanidou, A., Wilton, L., Cheng, J., Spits, C., Vanneste, E., Moreau, Y., et al. (2013). Microarray analysis reveals abnormal chromosomal complements in over 70% of 14 normally developing human embryos. *Human Reproduction*, 28(1), 256-6

- Meseguer, M., Rubio, I., Cruz, M., Basile N., Marcos J., Requena A. (2012). Embryo incubation and selection in a time-lapse monitoring system improves pregnancy outcome compared with a standard incubator : a retrospective cohort study. *Fertility and Sterility*, 98(6), 1481–1489
- Milki, A.A., Hinckley, M.D., Fisch, J.D., Bher, B. (2007). Comparison of blastocyst transfer with day 3 embryo transfer in similar patient populations. *Fertility and Sterility*, 73(1), 126-129
- Moreno, J.M., Iniesta, J., López-Gálvez, J.J., Esclapez-Vicente, M.D., Montiel, V., García-García, V., Candela, P., García, D., Gil L., Poveda, M., Lloret, M., Rueda, J. (2006). Premio Serono 2006 a la innovación, calidad e imagen en reproducción asistida.
- Nachtigall, R.D. (2006). International disparities in access to infertility services. *Fertility and Sterility*, 85,871– 875
- Naumann, D., Helm, D., Labischinski, H. (1991). Microbiological characterizations by FT-IR spectroscopy. *Nature*, 351, 81-82.
- Naumann, D. (2000). Infrared Spectroscopy in Microbiology. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, 102–131. <https://doi.org/10.1002/9780470027318.a0117>
- Naumann, D. (2001). FT-IR and FT-NIR Raman Spectroscopy in Biomedical Research. Gremlich, Hans-Ulrich and Yang, Bing. [24], 323-377 USA, Marcel Dekker, Inc. *Practical Spectroscopy*.
- Naumann, D., (2008). FT-IR spectroscopy of microorganisms at the Robert Koch Institute: experiences gained during a successful project, in: A. Mahadevan-Jansen, W. Petrich, R.R. Alfano, A. Katz (Eds.), *Biomedical Optical Spectroscopy, Proceedings of SPIE*, 2008, p. 68530F
- Nelson, S.M., Lawlor, D.A. (2011). Predicting live birth, preterm delivery, and low birth weight in infants born from in vitro fertilisation: a prospective study of 144,018 treatment cycles. *PLOS Medicine*, 8(1), e1000386
- Nel-Themaat, L., Nagy Z.P (2011) A review of the promises and pitfalls of oocyte and embryo metabolomics. *Placenta*, 32, S257-S263
- Niakan, K.K., Han, J., Pedersen, R.A., Simon, C., Reijo Pera, R.A. (2012). Human pre-implantation embryo development. *Development*, 139, 829–841
- Norwitz, E.R., Schust, D., Fisher, S. (2001) Implantation and the survival of early pregnancy. *The New England Journal of Medicine*, 345(19), 1400-1408.
- Nyalwidhe, J., Burch, T., Bocca, S., Cazares, L., Green-mitchell, S., Cooke, M., et al. (2013). The search for biomarkers of human embryo developmental potential in IVF : a comprehensive proteomic approach. *Molecular Human Reproduction*, 19(4), 250–263

Ombelet, W., Cooke, I., Dyer, S., Serour, G., Devroey, P. (2008 a). Infertility and the provision of infertility medical services in developing countries. *Human Reproduction*, 14, 605–621

Ombelet, W., Devroey, P., Gianaroli, L., teVelde, E. (eds). (2008 b). *Developing Countries and Infertility. Spec Issue Human Reproduction*, 1–117

Ory, S.J., Devroey, P., Banker, M., Brinsden, P., Buster, J., Fiadjoe, M., Horton, M., Nygren, K., Pai, H., Le, Rous P. (2014) International Federation of Fertility Societies Surveillance 2013: preface and conclusions. *Fertility and Sterility*, 101, 1582–1583

Ottosen, L.D., Kesmodel, U., Hindkjaer, J., Ingerslev, H.J. (2007). Pregnancy prediction models and eSET criteria for IVF patients—do we need more information? *Journal of assisted reproduction and genetics*, 24(1), 29-36.

Oust, A., Moretro, T., Kirschner, C., Narvhus, J.A., Kohler, A. (2004). FT-IR spectroscopy for identification of closely related lactobacilli. *Journal of Microbiological Methods*, 59,149-162

Ozaki, Y., Murayama, K. (2001). Infrared and Raman Spectroscopy and chemometrics of biological materials. In: Germlich H-U, Yan B, editors. *Infrared and Raman Spectroscopy of Biological Material*. New York: Marcel Dekker, Inc.p 515-567

Pagotto, G. (2010). La infertilidad como crisis vital en la pareja: factores disfuncionales y salutogénicos. *Facultad de Psicología Universidad del Aconcagua*.

Palermo G, Joris H, Devroey P, V. S. A. (1992). Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *The Lancet*, 340(8810), 17–8.

Panagou, E. Z., Mohareb, F. R., Argyri, A. A., Bessant, C. M., Nychas, G. E. (2011). A comparison of artificial neural networks and partial least squares modelling for the rapid detection of the microbial spoilage of beef fillets based on Fourier transform infrared spectral fingerprints. *Food Microbiology* 28, 28, 782–790

Paternot, G., Devroe, J., Debrock, S., D’Hooghe, T.M., Spiessens, C. (2009). Intra- and inter-observer analysis in the morphological assessment of early-stage embryos. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 29,105–110

Petibois, C., Melin, A.-M., Perromat, A., Cazorla, G., &Déléris, G. (2000). Glucose and lactate concentration determination on single microsamples by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 135(2), 210–215

Pickering, S.J., Taylor, A., Johnson, M.H., Braude, P.R. (1995). An analysis of multinucleated blastomere formation in human embryos. *Human Reproduction*, 10, 1912–1922

Rabiner, L. R. (1989). A tutorial on hidden Markov models and selected applications in speech recognition. *Proceedings of the IEEE* 77 (2), 257-286

Rebuffo, C. A., Wenning, M., Stetten, F. Von, Scherer, S. (2006). Reliable and Rapid Identification of *Listeria monocytogenes* and *Listeria* Species by Artificial Neural Network-Based Fourier Transform Infrared Spectroscopy, 72(2), 994–1000

Rebuffo-Scheer, C. A., Dietrich, J., Wenning, M., Scherer, S. (2008). Identification of five *Listeria* species based on infrared spectra (FTIR) using macrosamples is superior to a microsample approach. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 390(6), 1629–1635

Renard, J.P., Philippon, A., Menezo, Y. (1980). In-vitro uptake of glucose by bovine blastocysts. *Journal of Reproduction and Fertility*, 58,161–164

Rittenberg, V., Seshadri, S., Sunkara, S., Sobaleva, S., Oteng-Ntim, E., El-Toukhy, T. (2011). Effect of body mass index on IVF treatment outcome: an updated systematic review and meta-analysis. *Reproductive BioMedicine Online*, 23, 421–39

Rockliff, H. E., Lightman, S. L., Rhidian, E., Buchanan, H., Gordon, U., Vedhara, K. (2014). A systematic review of psychosocial factors associated with emotional adjustment in in vitro fertilization patients. *Human Reproduction*, 20(4), 594–613

Romar Andrés, R. (2001). Efecto de las células oviductales y del cumulusoophorus sobre diferentes parámetros biológicos relacionados con la fecundación in vitro en la especie porcina. Universidad de Murcia.

Sakkas, D. (2014). Chapter 24 Embryo Selection Using Metabolomics. In Zev Rosenwaks and Paul M. Wassarman (Ed.), *Human Fertility: Methods and Protocols*, *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1154, pp. 533–540). New York: © Springer Science+Business Media.

Salvador Figueras, M. (2000). Análisis Discriminante, [en línea] 5campus. com, Estadística [http. 5campus. com/lección/discr](http://5campus.com/lección/discr) [10 de febrero de 2005].

Sami, N., AliT.S. (2006). Psycho-social consequences of secondary infertility in Karachi. *Journal of Pakistan Medical Association*, 56, 19-22

Sampaio, P.N., Sales, K.C., Rosa, F.O, Lopes, M.B., Calado, C.R.C. (2017).High-throughput FTIR-based bioprocess analysis of recombinant cyprosin production. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 44(1), 49-61

Sathya, A., Balasubramanyam, S., Gupta, S., Verma, T. (2010). Effect of body mass index on in vitro fertilization outcomes in women. *Human Reproduction*, 3(3), 135–8

Savitzky, A., Golay, M., (1964). Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures, *Analytical Chemistry*, 36, 1627

Schliep, K. C., Mumford, S. L., Ahrens, K. A. (2015). Effect of male and female body mass index on pregnancy and live birth success after in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*, 103(2), 388–395

Schmidt, V. S. J., Kaufmann, V., Kulozik, U., Scherer, S., Wenning, M. (2012). Microbial biodiversity, quality and shelf life of microfiltered and pasteurized extended shelf life (ESL) milk from Germany, Austria and Switzerland. *International Journal of Food Microbiology*, 154(1–2), 1–9

Schmitt, J., Udelhoven, T. (2001). Use of Artificial Neural Networks in Biomedical Diagnosis. In: Gremlich H-U, Yang B, editors. *Infrared and Raman Spectroscopy of Biological Material*. New York: Marcel Dekker, Inc. p 379-419

Scott, R., Seli, E., Miller, K., Sakkas, D., Scott, K., & Burns, D. H. (2008). Non-invasive metabolomic profiling of human embryo culture media using Raman spectroscopy predicts embryonic reproductive potential: a prospective blinded pilot study. *Fertility and Sterility*, 90(1), 77–83

Seli, E., Sakkas, D., Scott, R., Kwok, J.S., Rosendahl, S., Burns, D.H., (2007). 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. *Fertility and Sterility*. 88:1350–1357

Seli, E., Vergouw, C. G., Morita, H., Botros, L., Roos, P., Lambalk, C. B., Yamashita, N., Kato, O., Sakkas, D. (2009). Non-invasive metabolomic profiling as an adjunct to morphology for non-invasive embryo assessment in women undergoing single embryo transfer. *Fertility and Sterility*, 94(2), 535–542

Seli, E., Botros, L., Sakkas, D., Burns, D. H. (2008). Non-invasive metabolomic profiling of embryo culture media using proton nuclear magnetic resonance correlates with reproductive potential of embryos in women undergoing in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*, 90(6), 2183–2189

Seli, E., Bruce, C., Botros, L., Henson, M., Roos, P., Judge, K., et al. (2011). Receiver operating characteristic (ROC) analysis of day 5 morphology grading and metabolomic Viability Score on predicting implantation outcome. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 28(2), 137-44

Sfontouris, I. A., Lainas, G. T., Sakkas, D., Zorzovilis, I. Z., Petsas, G. K., & Lainas, T. G. (2013). Non-invasive metabolomic analysis using a commercial NIR instrument for embryo selection. *Journal of human reproductive sciences*, 6(2), 133.

Shapaval, V., Schmitt, J., Møretrø, T., Suso, H. P., Skaar, I. (2012). Characterization of food spoilage fungi by FTIR spectroscopy. *Journal of Applied Microbiology*, 114, 788–796

Shuster, K. C., Mertens, F., Gapes, J. R. (1999). FTIR spectroscopy applied to bacterial cells as a novel method for monitoring complex biotechnological processes. *Vibrational Spectroscopy*, 19, 467-477

Smith, B. (1999). *Infrared spectral interpretation. A systematic approach*. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press LLC.

Sobotka, T. (2013). Oocyte cryopreservation as an insurance strategy: a socio-demographic view. *Proceedings of the 1st International Symposium on Social Egg Freezing*, 31.

Stephen, E.H., Chandra A. (2006). Declining estimates of infertility in the United States: 1982-2002. *Fertility and Sterility*, 86, 516-523

Stuart, B., Ando, D.J. (1997). *Biological Applications of Infrared Spectroscopy*

Sturmey, R.G., Hawkhead, J.A. (2009). DNA damage and metabolic activity in the preimplantation embryo. *Human Reproduction*, 24, 81–91

Sunderam, S., Kissin, D.M., Crawford, S.B., Folger, S.G., Jamieson, D.J., Barfield, W.D. (2014). Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Assisted Reproductive Technology Surveillance-United States, 2011*. *MMWR Surveillance Summaries*, 63(10), 1-28

Tesarik, J., Kopečný, V., Plachot, M., Mandelbaum, J. (1987) Ultrastructural and autoradiographic observations on multinucleated blastomeres of human cleaving embryos obtained by in-vitro fertilization. *Human Reproduction*, 2,127–136

The NeuroDeveloper® 2.5 Manual, 2014. Synthon, Analytics and pattern recognition, www.synthon-analytics.de

Thum, M.Y., El-Sheikhah, A., Faris, R., Parikh, J., Wren, M., Ogunyemi, T., et al. (2007). The influence of body mass index to in vitro fertilization treatment outcome, risk of miscarriage and pregnancy outcome. *Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 27(7), 699–702

Tracy, K., Syiem, K., Reddy, J. *The Multifaceted Aspects of Infertility*. *International Journal of Science and Research* 2319-7064 2 Issue 11, November 2013

Tseng, D. Y., Vir, R., Traina, J. S., and Chalmers, J. J. (1996). A Fourier transform infrared spectroscopic analysis of organic matter degradation in a bench-scale solid substrate fermentation (composting) system. *Biootechnology and Bioengineering*, 52, 661-671.

Tu, A.T. (1982). *Raman spectroscopy in biology: Principles and applications*. New York: John Wiley & Sons

Tusell, F. (2012). 6. Análisis Factorial. In *Análisis Multivariante*.

Udelhoven, T., Novozhilov, M., & Schmitt, J. (2003). The NeuroDeveloper®: a tool for modular neural classification of spectroscopic data. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 66(2), 219–226

Vaegter, K. K., Lakic, T. G., Olovsson, M., Berglund, L., Brodin, T., Holte, J. (2017). Which factors are most predictive for live birth after in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection (IVF/ICSI) treatments? Analysis of 100 prospectively recorded. *Fertility and Sterility*, 107(3), 641–648

van der Mei, H.C., Naumann, D., Busscher, H.J. (1993). Grouping of oral streptococcal species using Fourier-transform infrared spectroscopy in comparison with classical microbiological identification. *Archives Oral Biology*, 38, 1013-1019

van Loendersloot, L. L., van Wely, M., Repping, S., Bossuyt, P. M. M., & van der Veen, F. (2013). Individualized decision-making in IVF: calculating the chances of pregnancy. *Human Reproduction*, det315

Vergouw, C.G., Botros, L.L., Roos, P., Lens, J.W., Schats, R., Hompes, P.G., Burns, D.H., Lambalk, C.B. (2008). Metabolomic profiling by near-infrared spectroscopy as a tool to assess embryo viability: a novel, non-invasive method for embryo selection. *Human Reproduction*, 23, 1499–1504

Vergouw, C. G., Kieslinger, D. C., Kostelijk, E. H., Botros, L. L., Schats, R., Hompes, P. G., Sakkas D., Lambalk, C. B. (2012). Day 3 embryo selection by metabolomic profiling of culture medium with near-infrared spectroscopy as an adjunct to morphology: A randomized controlled trial. *Human Reproduction*, 27(8), 2304–2311

Vergouw, C. G., Heymans, M. W., Hardarson, T., Sfontouris, I. A., Economou, K. A., Ahlström, A., Rogberg, L., Lainas, T.G., SakkasD., Kieslinger, D.C., lilandstelijk, E.H., Hompes, P.G.A., Schats, R., Lambalk, C. B. (2014). No evidence that embryo selection by near-infrared spectroscopy in addition to morphology is able to improve live birth rates: Results from an individual patient data meta-analysis. *Human Reproduction*, 29(3), 455–461

Waylen, A., Metwally, M., Jones, G., Wilkinson, A., Ledger, W. (2009). Effects of cigarette smoking upon clinical outcomes of assisted reproduction: a meta-analysis. *Human Reproduction Update*, 15(1), 31–44

Wenning, M., Seiler, H., and Scherer, S. (2002). Fourier-Transform Infrared Microspectroscopy, a Novel and Rapid Tool for Identification of Yeasts. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(10), 4717-4721

Wenning, M., Scherer, S. (2013). Identification of microorganisms by FTIR spectroscopy: Perspectives and limitations of the method. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(16), 7111–7120

Wenning, M., Breitenwieser, F., Konrad, R., Huber, I., Busch, U., Scherer, S. (2014). Identification and differentiation of food-related bacteria: A comparison of FTIR spectroscopy and MALDI-TOF mass spectrometry. *Journal of Microbiological Methods*, 103, 44–52

Winston, N.J., Braude, P.R., Pickering, S.J., George, M.A., Cant, A., Currie, J., Johnson, M.H. (1991). The incidence of abnormal morphology and nucleocytoplasmic ratios in 2-, 3- and 5-day human pre-embryos. *Hum Reproduction*, 6, 17–24.

Wiweko, B., Hestiantoro, A., Sumapraja, K., Muharam, R., Andriyana, H., Febia, Pradipta B., Susanto, C. A. (2010). Predictive Factors for Pregnancy in IVF : An Analysis of 348 Cycles. *Indonesian Journal of Obstetrics and Gynecology*, 34(4), 180–184

Wong, C.C., Loewke, K.E., Bossert, N.L., Behr, B., De Jonge, C.J., Baer, T.M., Reijo Pera, R.A. (2010). Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage. *Nature biotechnology* 28(10)

Wright, K. P., Trimarchi, J. R., Allsworth, J., Keefe, D. (2006). The effect of female tobacco smoking on IVF outcomes. *Human Reproduction*, 21(11), 2930–2934

Zain, M.M., Norman, R.J. (2008). Impact of obesity on female fertility and fertility treatment. *Womens Health*, 4(2):183–94

Zegers-Hochschild, F., Adamson, G. D., de Mouzon, J., Ishihara, O., Mansour, R., Nygren, K., Sullivan, E., van der Poel, S. (2009) International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology. *Fertility and Sterility*, 92 (5), 1520–4

Zendehdel, R., Masoudi-nejad, A., Shirazi, F. H. (2012). Patterns Prediction of Chemotherapy Sensitivity in Cancer Cell lines Using FTIR Spectrum, Neural Network and Principal Components Analysis. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 11(2), 401–410

Zhang, Y., Fu, Y., Han, F., Kuang, H., Hu, M., & Wu, X. (2014). The effect of complementary and alternative medicine on subfertile women with in vitro fertilization. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014

Zhao, Q., Yin, T., Peng, J., Zou, Y., Yang, J., Shen, A. (2013). Non-invasive Metabolomic Profiling of Human Embryo Culture Media Using a Simple Spectroscopy Adjunct to Morphology for Embryo Assessment in in Vitro Fertilization (IVF). *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 6556–6570

Zheng, J. F., Chen, X. B., Zhao, L. W., Gao, M. Z., Peng, J., Qu, X. Q., Shi, H. J. (2015). Original article ICSI treatment of severe male infertility can achieve prospective embryo quality compared with IVF of fertile donor sperm on sibling oocytes. *Asian Journal of Andrology*, 17, 845–849. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.146971>

Zwielly, A., Mordechai, S. (2010). Advanced statistical techniques applied to comprehensive FTIR spectra on human colonic tissues. *Medical Physics*, 37(3), 1047–1055