

Trabajos Congreso SAMeR 2011

Perfil metabólico de embriones humanos con diferente potencial reproductivo mediante espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR)

Marcelo Garcea,¹ Priscila Calderoli,² Claudio Bisioli,¹ Mariana Gómez Peña,¹ Osvaldo Yantorno,² Alejandra Bosch²

¹ Pregunta Medicina Reproductiva, Buenos Aires, Argentina.

² CINDEFI, Centro de Biotecnología Aplicada, CONICET, La Plata, Argentina.

Reproducción 2011;26:45-54

Resumen

El objetivo del presente trabajo fue estudiar el perfil metabólico obtenido a partir de espectros infrarrojos en muestras de medio de cultivo in vitro de embriones humanos para evaluar la posibilidad de desarrollar un modelo estadístico multivariable que permita discriminar su potencial reproductivo. En primer lugar, se estandarizaron las condiciones de toma de muestra y registro de espectros de manera de reducir la varianza espectral a niveles que permitieran la discriminación. Analizando y combinando las diferentes ventanas espectrales en las derivadas primeras de los espectros de los sobrenadantes de los cultivos de embriones, se encontró que el patrón espectroscópico de los medios de cultivo de embrionarios que resultaron en embarazo fue diferente al patrón espectroscópico encontrado para los medios de cultivo de embriones que no resultaron en embarazo. Aplicando un análisis estadístico multivariable en una combinación apropiada de estas ventanas, se logró clasificar los espectros en aquellos que desarrollaron embarazo de los que no. Este estudio preliminar permitió demostrar que la espectroscopía infrarroja combinada con la aplicación matemática denominada "Transformada de Fourier" es una herramienta de valor para discriminar el potencial reproductivo embrionario.

Introducción

Entre los mayores desafíos de la investigación actual en el campo de la fertilización in vitro (FIV) se encuentran el mejoramiento de la tasa de embarazo y la disminución en la prevalencia de gestaciones múltiples (Reddy y col, 2007). El principal problema para efectivamente limitar el número de embriones transferidos deriva de la dificultad para estimar con precisión el potencial reproductivo de embriones individuales dentro de una cohorte de embriones, siendo la evaluación morfológica de los mismos la técnica de selección de embriones vigente en la mayoría de los centros de referencia de FIV (Seli y col, 2010). Sin embargo, en los últimos años han surgido una serie de tecnologías adicionales para estimar el potencial reproductivo de los embriones, muchas de las cuales son aún objeto de investigación. Estas metodologías incluyen el dosaje de glucosa, lactato, piruvato, niveles de aminoácidos, consumo de oxígeno durante el cultivo de embriones y, más recientemente, la evaluación de los perfiles genómicos y proteómicos de los embriones y la metabolómica de los cultivos (Gardner y col, 2001; Brison y col, 2004; Devreker, 2007; Seli, 2008; Botros y col, 2008; Marhuenda-Egea, 2010). En particular, la metabolómica tiende a determinar el potencial reproductivo de un embrión a través de la evaluación del perfil metabólico del sobrenadante de cultivo de los embriones.

La espectroscopía infrarroja (IR) ha tomado en la última década un importante protagonismo como técnica de biodiagnóstico no convencional

Correspondencia: Marcelo Garcea
E-mail: mgarcea@pregna.com.ar

(Naumann, 2000). La espectroscopía infrarroja combinada con la aplicación matemática denominada "Transformada de Fourier" (FT-IR), aplicada a materiales biológicos, proporciona un reflejo de la composición química y estructural de los mismos. Los espectros de absorción de los biomateriales están representados por bandas anchas constituidas por una superposición compleja de picos originados por la absorción de sus constituyentes (proteínas, carbohidratos, lípidos y otros compuestos de bajo peso molecular), representando "huellas digitales" (*fingerprinting*) altamente específicas de los mismos (Nichols, 1995; Naumann, 2000). Debido a la complejidad inherente a la interpretación de los espectros y la asociada al desarrollo de sistemas de clasificación de los mismos en sistemas biológicos, se hace necesario recurrir a la quimiometría. Esta disciplina constituye la aplicación de métodos estadísticos y/o matemáticos a los espectros FT-IR con la finalidad de extraer la información contenida en los mismos (Schmitt y Udelhoven, 2001). La quimiometría abarca las operaciones correspondientes al procesamiento espectral que involucra las pruebas de calidad espectral, normalización, la aplicación de técnicas de aumento de resolución, y el análisis espectral empleando técnicas estadísticas multivariadas basadas en metodologías de reconocimiento de patrones, como el análisis de clusters y/o redes neuronales artificiales.

El objetivo del presente trabajo fue analizar si el *fingerprinting* metabólico obtenido de espectros infrarrojos de sobrenadantes de cultivo de embriones permite discriminar su potencial reproductivo. A tales fines la información espectral fue analizada mediante un modelo estadístico multivariable que permitió discriminar distintos tipos de embriones. El presente es el primer estudio publicado sobre metabolómica de embriones mediante espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier. Por esta causa, se debió optimizar en una primera etapa un protocolo de trabajo. Asimismo, se identificaron interferencias espectrales y se propusieron metodologías para superarlas.

Materiales y métodos

Población analizada

Se analizaron muestras de sobrenadantes de

cultivo de embriones pertenecientes a pacientes tratados por infertilidad entre septiembre de 2009 y junio de 2010. Las pacientes fueron hiperestimuladas siguiendo nuestros protocolos regulares de hiperestimulación ovárica controlada. Brevemente, la FSH recombinante (*Gonal-F*[®], *Merck KGaA*, Ginebra, Suiza; *Puregon*[®], *Merck Co*, New Jersey, Estados Unidos) fue usada sola o en combinación con gonadotrofinas urinarias (*Menopur*[®], *Ferring Pharmaceuticals*, Saint Prex, Suiza) en protocolos fijos con antagonistas del GnRH (*Cetrotide*[®], *Merck KGaA*, Ginebra, Suiza; *Orgalutran*[®], *Merck Co*, New Jersey, Estados Unidos). La aspiración transvaginal de los folículos se llevó a cabo 34-36 hs luego de la administración de gonadotrofina coriónica humana. En todos los casos se administró progesterona vaginal (*Utrogestan*[®], *Ferring Pharmaceuticals*, Saint Prex, Suiza) a partir de la noche correspondiente a la captación ovocitaria.

Cultivo y transferencia de embriones

El día de la aspiración de los folículos los complejos cumulus-corona recuperados fueron lavados en medio tamponado sobre platina térmica y luego colocados en placas de cuatro pocillos conteniendo 500 µl de medio *EmbryoAssist* cubierto con parafina líquida, y llevados de inmediato a la incubadora. Todos los gametos y embriones fueron procesados o cultivados con los mismos medios comerciales (*Medicult*[®], Jyllinge, Dinamarca), equilibrados cuando fuese necesario durante toda la noche en incubadoras convencionales (6% CO₂ y 19,8% O₂ en aire). Las muestras de semen fueron procesadas mediante gradientes discontinuos de densidad 90-50% (*SupraSperm 100 + Sperm Preparation Medium*). La suspensión final fue dejada a temperatura ambiente hasta el momento de la inseminación. Para FIV convencional, la inseminación fue llevada a cabo 4-6 horas después de la captación de los ovocitos en medio *EmbryoAssist* bajo parafina líquida. La concentración de espermatozoides para inseminación fue ajustada a 200.000 espermatozoides progresivos rápidos/ml. Para ICSI, 4-6 horas después de la punción folicular, los ovocitos captados fueron pelados de sus células del cumulus mediante tratamiento con 80 UI/ml de hialuronidasa (*SynVitro Hyadase*). Los procedimientos de ICSI fueron

llevados a cabo de acuerdo con protocolos estandarizados. La fecundación fue verificada a las 18-20 horas de la inseminación. Los embriones producidos fueron cultivados en grupos de no más de 4 embriones cada uno en microgotas de 40 μ L de medio *ISM1* bajo parafina líquida en placas de cultivo plásticas. Los embriones fueron puestos diariamente en gotas limpias de medio de cultivo hasta el día de la transferencia. Los embriones de día 3 fueron evaluados mediante el puntaje de morfología de Bolton, y col (1989). Los embriones de calidad óptima fueron aquellos con, al menos, 6 blastómeros simétricos en día 3, menos del 20% de fragmentación, sin vacuolas ni granularidad citoplasmática.

Todos los embriones fueron transferidos en día 3 en medio *UTM* utilizando catéteres *Echo-Tip® Soft-Pass™ TVP* (Cook Medical, Blooming-

ton, Estados Unidos) o *PM Trans Set Mini CH3®* (Prince Medical, Erculs, Francia) para las transferencias difíciles.

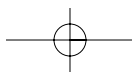
Espectroscopía IR-TF de sobrenadantes de cultivos de embriones

a. Preparación de las muestras y registro de espectros.

Se analizaron 30 muestras de sobrenadantes de cultivo de embriones humanos de 3 días de crecimiento provenientes de 15 pacientes cuyos resultados de FIV eran conocidos, y 15 muestras control provenientes de medios de cultivo incubados bajo las mismas condiciones en ausencia de embriones (Tabla 1). Diferentes volúmenes (15, 20, 30 μ l) de sobrenadantes de cultivo fueron transferidos a celdas de ZnSe y secados a temperatura

Tabla 1. Muestras de sobrenadantes de cultivo de embriones de 3 días de incubación utilizadas en este trabajo.

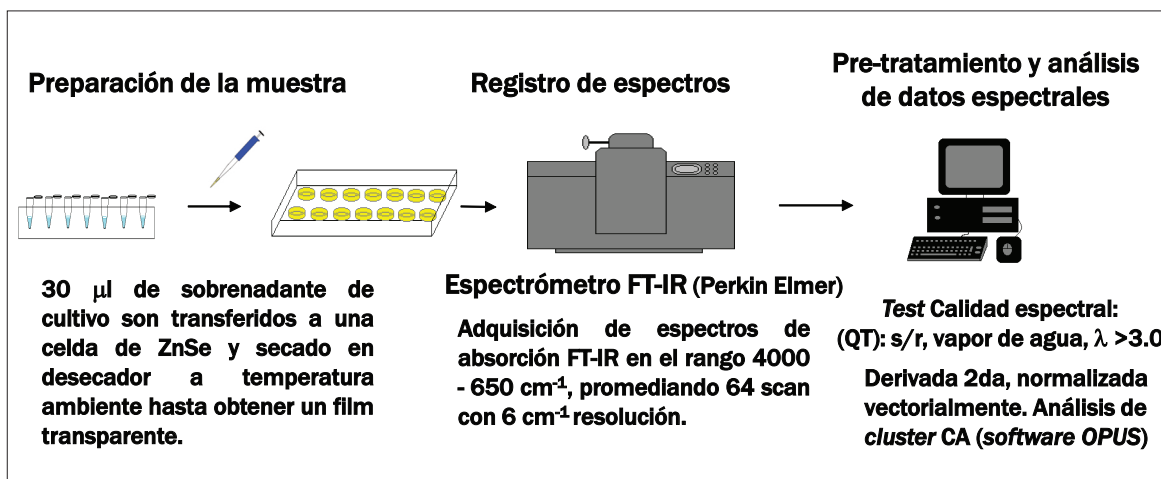
Muestras	Pacientes	Embrión	Número de sacos implantados	Observaciones
Muestras empleadas para estandarizar el proceso	Paciente 1	Emb1 Emb2 control	-	10 μ l para calibración contiene aceite 20 μ l para calibración
	Paciente 2	Emb3 Emb6 control	1 saco	contiene aceite contiene aceite contiene aceite
	Paciente 3	Emb5 Emb4 control	-	10 μ l para calibración 20 μ l para calibración 20 μ l para calibración
	Paciente4	Emb1 Emb2 Control	-	30 μ l para calibración 10 μ l para calibración 20 μ l para calibración
	Paciente 5	Emb2 Emb1	-	10 μ l para calibración 20 μ l para calibración
Muestras empleadas para la búsqueda de biomarcadores espectroscópicos asociados al potencial reproductivo	Paciente 6	Emb1 Emb2	1 saco	
	Paciente 7	Emb6 Emb7	1 saco	
	Paciente 8	Emb5 Emb7.2	1 saco	
	Paciente 9	Emb1 Emb2	1 saco	
	Paciente 10	Emb2 Emb1	2 sacos	
	Paciente 11	Emb1 Emb2	2 sacos	
	Paciente 12	Emb1 Emb2	-	
	Paciente 13	Emb1 Emb2	-	
	Paciente 14	Emb8 Emb7	-	
	Paciente 15	Emb1 Emb2	-	



ambiente por 20 minutos. Los espectros FT-IR fueron registrados en el rango 4000 y 650 cm^{-1} con 6 cm^{-1} de resolución espectral empleando un

espectrómetro FT-IR Spectrum One (Perkin Elmer, Estados Unidos) (Helm y col, 1991; Naumann, 2000; Bosch y col, 2008) (Esquema 1).

Esquema 1. Representación esquemática del procedimiento de preparación de las muestras, registro de espectros, pre-procesamiento y análisis de los datos espectrales.



b. Pre-procesamiento y análisis de los datos espectrales

Todos los espectros fueron sometidos a un ensayo de calidad espectral (QT) en el cual se evaluó la intensidad espectral en las regiones 1700-1600 cm^{-1} y 1200-900 cm^{-1} , el nivel del vapor de agua (en el intervalo 1840-1850 cm^{-1}) y las relaciones señal:ruido y señal:vapor de agua (Helm y Naumann, 1995; Naumann, 2000). Asimismo, se definió y evaluó el parámetro λ que representa el contenido de lípidos/proteínas en las muestras. Este parámetro fue calculado como la relación de las intensidades $\lambda = I_{2930} / I_{1654}$, donde I_{2930} representa la altura de la banda de 2930 cm^{-1} (estiramiento $-\text{CH}_2$ asignado al contenido de lípidos) e I_{1654} la altura del pico de 1654 cm^{-1} (banda Amida I asignada a proteínas). 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 relativo espectral. Se construyó así una base de datos espectrales constituida por las derivadas segundas normalizadas vectorialmente en todo el rango espectral de los espectros que superaron el test de calidad (QT) (Helm y col, 1995; Nau-

mann, 2000; Bosch y col, 2008) con un valor $\lambda < 0,33$. El análisis de los espectros se llevó a cabo mediante un análisis de *clusters* calculando las distancias espectrales mediante el coeficiente de Pearson. Los dendrogramas correspondientes fueron construidos empleando el algoritmo de Ward (Naumann, 2000; Helm y Naumann, 1995; Bosch y col, 2010). El pre-tratamiento y análisis espectral fueron realizados utilizando el software OPUS, versión 4 (Bruker Optics GmbH, Ettlingen, Alemania).

Resultados y discusión

Los espectros FT-IR de los materiales biológicos son representaciones de su composición química y estructural global y pueden ser utilizados como huellas digitales altamente específicas de dicho material. La (Figura 1) muestra, a modo de ejemplo, un espectro de absorción FT-IR obtenido del sobrenadante de cultivo de un embrión de 3 días de incubación que no produjo implantación. Teniendo en cuenta la información reportada previamente para el análisis de muestras biológicas (Naumann, 1991; Naumann, 2000; Helm y Naumann, 1995; Kacuráková y col, 2000), se

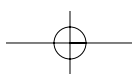
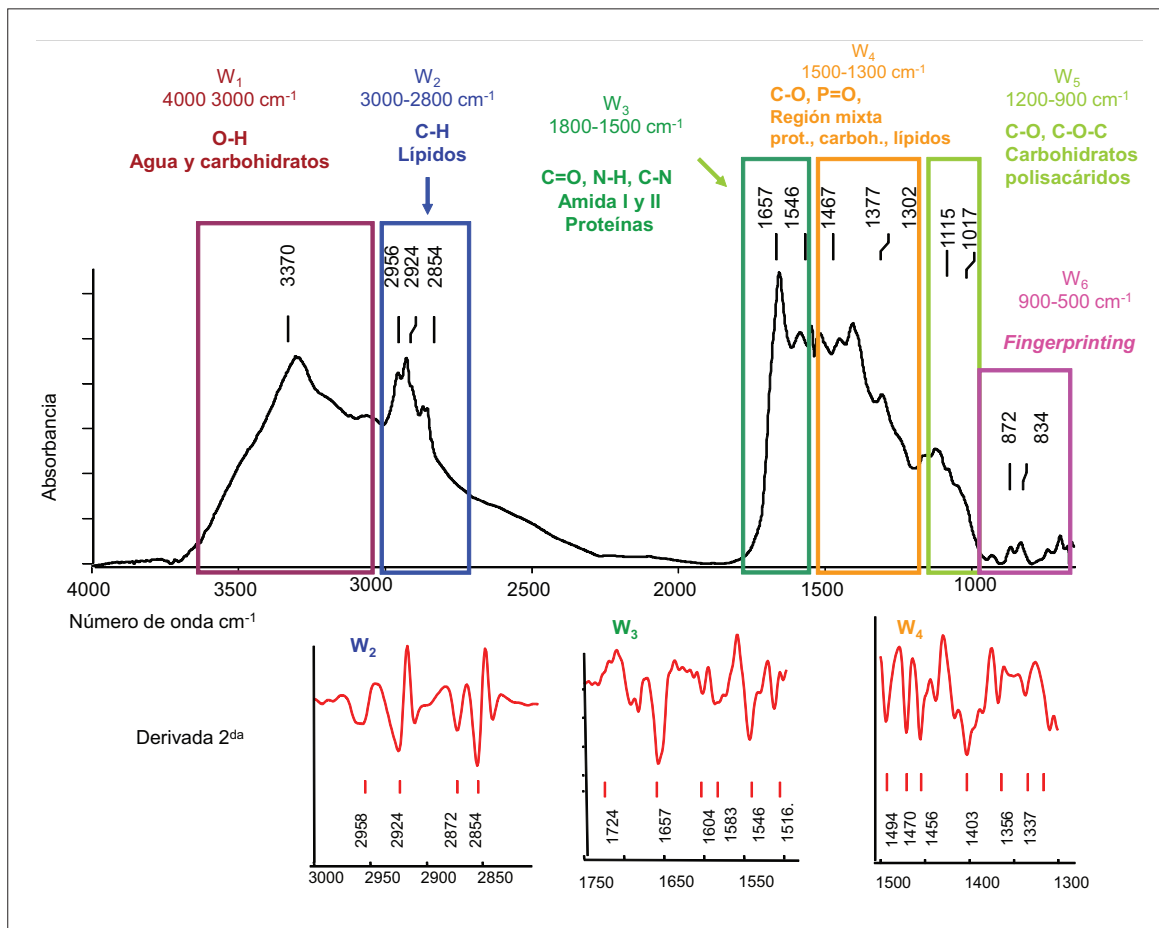


Figura 1. Espectro IR-TF del sobrenadante de cultivo de embriones humanos de 3 días de incubación. Se indican las principales ventanas espectrales y las asignaciones de bandas de absorción correspondientes a los principales constituyentes moleculares en cada región. En el panel inferior se muestra para 3 ventanas espectrales la derivada segunda que se emplea como técnica de aumento de resolución espectral.



indican en dicha figura las seis regiones espectrales que son normalmente descriptas y las asignaciones de bandas de absorción correspondientes a los principales constituyentes moleculares en

cada región: W_1 (3600 - 3000 cm^{-1}), representada por una banda amplia que contiene los modos fundamentales de estiramiento de los grupos hidroxilo (OH); W_2 (3000-2800 cm^{-1}), debido al agua e hidratos de carbono, contiene las bandas atribuidas a los modos simétricos y antisimétricos correspondientes al estiramiento C-H del metilo (CH_3) y metileno (CH_2); W_3 (1800-1500 cm^{-1}) es la región espectral que incluye las bandas de absorción de los grupos éster y amidas (I y II); W_4 (1500-1300 cm^{-1}) es la región conocida como la región de absorción mixta; W_5 (1200-900 cm^{-1})

está representada por una banda ancha e intensa que tiene los picos asignados principalmente a los modos de estiramiento de los anillos de los hidratos de carbono (-COC, C- OH, CH); y finalmente W_6 (900-700 cm^{-1}) constituye la región espectral denominada región de la huella digital o fingerprinting. En el panel inferior de la figura se indica en forma de zoom la segunda derivada del espectro en las principales regiones.

Desarrollo de un protocolo de estandarización

Los espectros IR de los sobrenadantes de cultivos embrionarios constituyen un *fingerprinting* metabólico que resulta altamente específico y reproducible bajo las mismas condiciones de operación. La composición química de los sobrenadan-

tes (proteínas, lípidos, carbohidratos, moléculas pequeñas), depende de un gran número de variables tales como la composición del medio de cultivo y los tiempos y condiciones de incubación. De modo que pequeños cambios en estos parámetros, así como en la preparación de las muestras o en la adquisición de los datos espectrales, producirán efectos significativos en los espectros resultantes. Debido a que el presente trabajo es el primer estudio sobre metabolómica de embriones por FT-IR, se debió desarrollar en primer lugar un protocolo de estandarización que incluyera las condiciones de cultivo de los embriones, el procedimiento de toma y preparación de las muestras, así como también definir los parámetros de adquisición de los espectros.

Al comenzar los estudios advertimos que aún trabajando sobre la base de condiciones estrictamente estandarizadas, la varianza espectral en-

contrada entre las diferentes muestras era muy alta. Sin embargo, se observó que la mayor contribución a esta variación se debía a diferencias significativas en la región asignada a la absorción de los lípidos (2920 cm^{-1} y 1450 cm^{-1} , estiramiento y balanceo del enlace C-H, respectivamente) (Figura 2). Esto nos condujo a considerar que en el proceso de toma de la muestra del sobrenadante de cultivo se podría arrastrar una fracción del aceite empleado para cubrir las microgotas de medio de cultivo. De modo que, como primer etapa en la estandarización de las condiciones de operación, se estableció que la toma de muestra debía ser muy cuidadosa para evitar la contaminación del sobrenadante de cultivo con aceite. La (Figura 2) muestra los espectros FT-IR correspondientes a sobrenadantes de cultivo de embriones en los cuales se ha arrastrado distintas cantidades de aceite al tomar la muestra. En el caso de

Figura 2. Espectros IR-TF 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 los espectros IR-TF. λ es un parámetro cualitativo $\lambda = I_{2930} / I_{1654}$ donde I_{2930} representa la altura de la banda de 2930 cm^{-1} y I_{1654} la altura de la banda de 1654 cm^{-1} .

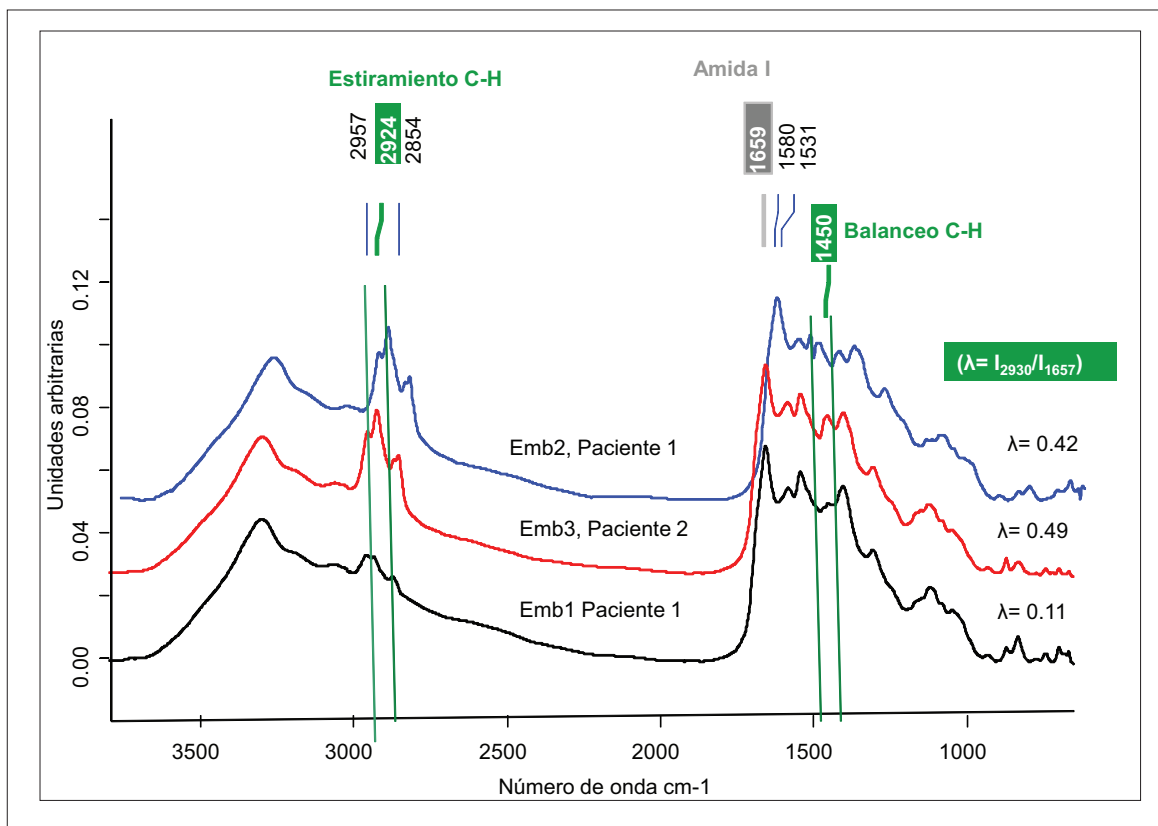
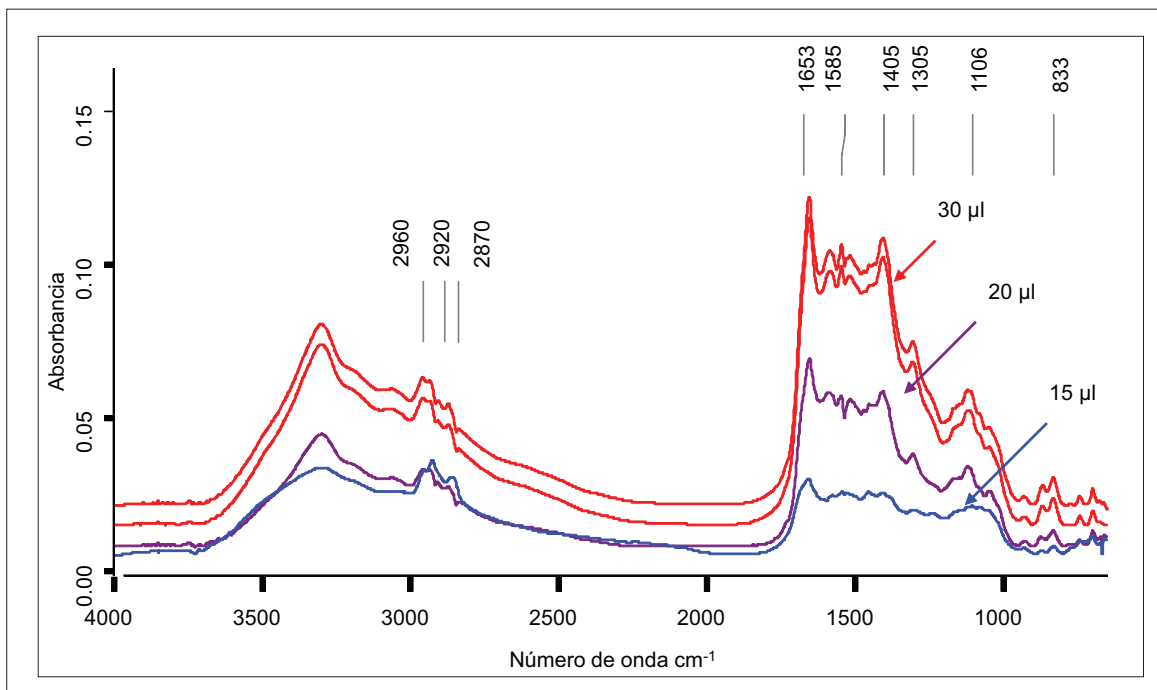


Figura 3. Optimización del volumen de sobrenadante de cultivo a emplear. Espectros FT-IR de 15, 20 y 30 μ l de sobrenadante.



los espectros correspondientes al Embrión #2 del paciente 1 y al Embrión #3 del paciente 2, los valores de λ obtenidos fueron de 0,42 y 0,49, respectivamente (ver Sección materiales y métodos). En la figura se indica también el espectro FT-IR correspondiente a un sobrenadante de cultivo para el cual la extracción se realizó cuidadosamente para evitar la presencia de aceite, mostrando un valor de λ de 0,11. Se determinó que los espectros que arrojaran un valor de $\lambda < 0,33$ serían descartados de la base de datos de referencia.

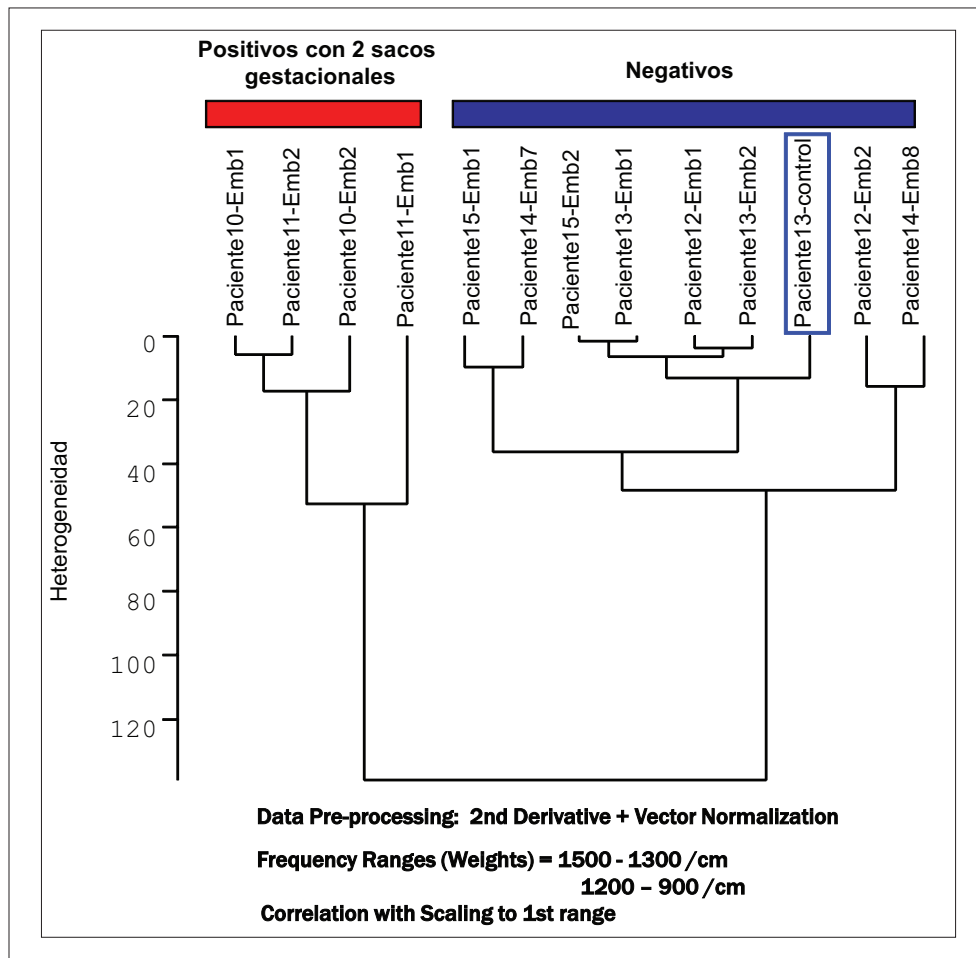
El segundo paso en la estandarización de la metodología fue determinar la cantidad óptima de sobrenadante de cultivo que se debía utilizar para obtener espectros con adecuada relación señal:ruido, de manera que los mismos superaran el ensayo de calidad espectral (QT) descrito en la Sección materiales y métodos. La (Figura 3) muestra los espectros obtenidos empleando 15, 20 y 30 μ l de sobrenadante de cultivo. Se estableció que 30 μ l de sobrenadante de cultivo era el mínimo volumen necesario para ser transferido a las celdas de ZnSe (13 mm de diámetro) de modo de asegurar que el espectro obtenido tenga una absorción en la región de Amida I y carbohi-

dratos que supere el *test* de calidad espectral definido QT.

Evaluación de marcadores espectroscópicos asociados a embarazo

A fin de determinar si los sobrenadantes del cultivo de embriones que dan como resultado embarazo presentan un patrón espectroscópico diferente al que muestran los sobrenadantes de embriones que no resultan en embarazo, se analizaron las derivadas segundas de los espectros correspondientes, normalizadas vectorialmente en todo el rango espectral. Se desarrolló un modelo basado en el análisis de *clusters* (Figura 4) que permitió la discriminación entre los espectros correspondientes a los sobrenadantes de embriones con posterior embarazo demostrado (pacientes 10 y 11, en los cuales los dos embriones transferidos resultaron en dos sacos embrionarios) de los espectros correspondientes a embriones que no resultaron en embarazo (pacientes 12, 13, 14, 15, cuyos dos embriones transferidos no se implantaron). En el análisis se incluyeron los espectros correspondientes a las muestras control (cultivos sin embrión), los cuales resultaron agrupados con los espectros de

Figura 4. Modelo basado en análisis de clusters obtenido con las derivadas segundas de los espectros de los sobrenadantes del cultivo de embriones que resultaron en embarazo y de los que no resultaron en embarazo. La combinación de ventanas espectrales empleadas incluye marcadores espectrales que permitieron discriminar las dos poblaciones.



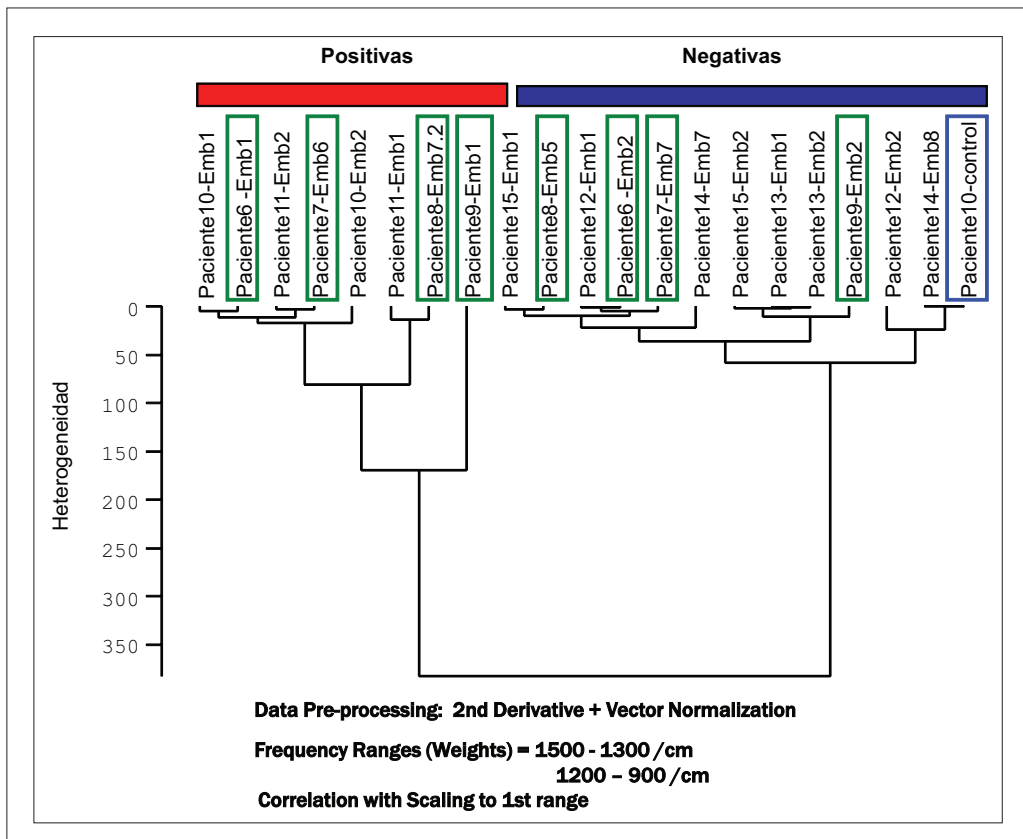
los embriones que no se implantaron.

Desafiamos al modelo desarrollado con los espectros correspondientes a los embriones de las pacientes en las que sólo 1 de los 2 embriones transferidos produjo implantación (pacientes 6, 7, 8 y 9) y vimos que un espectro se agrupaba con los espectros de los embriones que implantaban, y el otro espectro se agrupaba con los que no desarrollaban embarazo (Tabla 1). La (Figura 5) muestra que las ventanas espectrales seleccionadas proporcionan la discriminación buscada.

Los resultados obtenidos indicarían que la espectroscopía FT-IR es capaz de detectar marcadores espectroscópicos asociados a las diferencias en la metabolómica de los cultivos de embriones

con diferente potencial de implantación. Sin embargo, quedan aún aspectos por considerar en relación al impacto en la varianza o reproducibilidad, que podrían producir el empleo de diferentes lotes de medios de cultivo o el uso de diferentes suplementos que podrían generar señales espectroscópicas que enmascaren los biomarcadores específicos. Asimismo, debe ampliarse la librería espectral obtenida hasta el momento, incorporando al estudio un mayor número de muestras procedentes de transferencias de embriones de resultados conocidos para alcanzar un sistema de discriminación sensible y estadísticamente robusto que permita predecir con certeza el potencial reproductivo de una cohorte de embriones.

Figura 5. Modelo basado en el análisis de clusters obtenido con las derivadas segundas de los espectros de los sobrenadantes de embriones que resultaron en embarazo y de los que no resultaron en embarazo. La combinación de ventanas espectrales empleadas incluye marcadores espectrales que permitieron discriminar las dos poblaciones.



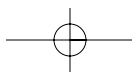
Conclusiones

Los estudios preliminares sobre estandarización de un protocolo y estudio de la varianza espectral muestran que los cambios detectados en el *fingerprinting* metabólico de los sobrenadantes del cultivo de 3 días de embriones humanos podrían permitir el desarrollo de una metodología no invasiva basada en IR-TF y análisis estadístico multivariado capaz de predecir el potencial de los embriones para producir embarazo antes de su transferencia.

Referencias

- Bolton VN, Hawes SM, Taylor CT, y col. Development of spare human preimplantation embryos in vitro: an analysis of the correlations among gross morphology, cleavage rates, and development to the blastocyst. J In Vitro Fert Embryo Transf 1989;6:30-35.

- Bosch A, Miñán A, Vescina C, y col. Fourier transform infrared spectroscopy for rapid identification of nonfermenting gram-negative bacteria isolated from sputum samples from cystic fibrosis patient. J Clin Microbiol 2008;46:2535-2546.
- Bosch A, Prieto C, Serra DO, y col. Type IV pili spectroscopic markers: Applications in the quantification of piliation levels in *Moraxella bovis* cells by a FT-IR ANN-based model. J Biophotonics 2010;3: 522-533.
- Botros L, Sakkas D, Seli E. Metabolomics and its application for non-invasive embryo assessment in IVF. Mol Hum Reprod 2008;14:679-690.
- Brisson DR, Houghton FD, Falconer D, y col. Identification of viable embryos in IVF by non-invasive measurement of amino acid turnover. Hum Reprod 2004;19: 2319-2324.
- Devreker F. Uptake and release of metabolites in human preimplantation embryos. En: Human Preimplantation Embryo Selection. Cohen J, Elder K, Taylor and Francis, Londres, Reino Unido, 2007:325-336.



- Gardner DK, Lane M, Stevens J, y col. Noninvasive assessment of human embryo nutrient consumption as a measure of developmental potential. *Fertil Steril* 2001; 76:1175-1180.
- Helm D, Labischinski H, Schallehn G, Naumann D. Classification and identification of bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy. *J Gen Microbiol* 1991; 137:69-79.
- Helm D, Naumann D. *FEMS Microbiol, Lett.* 1995;126: 75-80.
- Kacuráková M, Capek P, Sasinková V, y col. 2000. FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses. *Carbohydr Polym* 2000;43: 195-203.
- Marhuenda-Egea FC, Martínez-Sabater E, González Álvarez R, y col. A crucial step in assisted reproduction technology: human embryo selection using metabolomic evaluation. *Fertil Steril* 2010;94:772-774.
- Naumann D, En: *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Meyers RA. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, Reino Unido, 2000:102-131.
- Nichols PDJ, Henson M, Guckert JB, y col. Fourier transform-infrared spectroscopic methods for microbial ecology: analysis of bacteria, bacteria-polymer mixtures and biofilms. *J Microbiol Meth* 1985;4:79-94.
- Reddy UM, Wapner RJ, Rebar RW, y col. Infertility, assisted reproductive technology, and adverse pregnancy outcomes: executive summary of a National Institute of Child Health and Human Development workshop. *Obstet Gynecol* 2007;109:967-977.
- Schmitt J, Udelhoven T. Use of artificial neural networks in biomedical diagnosis. En: *Infrared and Raman spectroscopy of biological material*. Gremlich HU, Yang B Marcel Dekker, Inc. Nueva York, Estados Unidos, 2001: 379-419.
- Seli E, Botros L, Sakkas D. Non-invasive metabolomic profiling of embryo culture media using proton NMR correlates with reproductive potential of embryos in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2008;90: 2183-2189.
- Seli E, Vergouw CG, Morita H, y col. Noninvasive metabolomic profiling as an adjunct to morphology for noninvasive embryo assessment in women undergoing single embryo transfer. *Fertil Steril* 2011;94:535-542.
- Thiele B, Fullner K, Stein N, y col. Analysis of amino acids without derivatization in barley extracts by LC-MS-MS. *Anal Bioanal Chem* 2008;391:2663-2672.

