

***TRABAJO DE FIN DE MÁSTER***  
***en***  
***Biología y Tecnología Aplicada a la***  
***Reproducción Humana Asistida***

**Últimas tendencias de los biomarcadores en los medios de cultivo como técnica no invasiva en la evaluación de la viabilidad e implantación embrionaria en FIV**

Autora: Verónika Herasymenko Levkovich

Tutor: David Agudo Garcillán

Villaviciosa de Odón, Octubre 2021

## **RESUMEN:**

La infertilidad sigue siendo uno de los principales problemas de salud pública para muchas parejas en todo el mundo. Por ello, se han utilizado técnicas de reproducción asistida con el uso de la evaluación morfológica clásica para seleccionar los embriones para la transferencia. Pero la ineficacia de los criterios de evaluación morfológica, que se emplean actualmente para la selección de un embrión viable, se considera uno de los principales factores limitantes que contribuyen a una baja tasa de embarazo y, por tanto, de recién nacidos vivos. Por ello, los biomarcadores presentes en el medio de cultivo de embriones tienen una gran perspectiva clínica. Pueden ser analizados a través de muestras del medio de cultivo tras emplearlo en el cultivo embrionario mediante diferentes metodologías de investigación ómica. Asimismo, en esta revisión bibliográfica, se analizarán los diferentes biomarcadores que actualmente tienen un papel pronóstico en cuanto a la viabilidad del embrión y el potencial de implantación en un entorno clínico. También, se estudiarán los diferentes métodos indirectos y no invasivos *in vitro* basados en el análisis del medio de cultivo utilizados por los embriones dentro de las áreas de metabolómica, proteómica y microRNA (miRNA). Además, se revisará qué biomarcadores tienen una mejor perspectiva clínica y, cuáles de ellos tienen más relevancia clínica. Aunque se han definido varios biomarcadores de los medios de cultivo, todavía hay mucha escasez de información en cuanto a qué biomarcadores son potenciales debido a la falta de sincronización de los protocolos, medios y prácticas en los diferentes laboratorios, por lo que se necesitarían más estudios clínicos aleatorios, así como más muestras a analizar. Sin embargo, existe una gran tendencia en la búsqueda y análisis de miRNAs debido a su fácil manejo. Además, el uso de MALDI-TOF e IA podría ayudar en futuras investigaciones de potenciales biomarcadores del embarazo.

**PALABRAS CLAVE:** biomarcador, evaluación no invasiva, medio de cultivo, pre-embryones humanos, tecnología de reproducción asistida

## **ABSTRACT:**

Infertility remains one of the major public health problems for many couples worldwide. As a result, assisted reproductive techniques using classical morphological evaluation have been used to select embryos for transfer. But the ineffectiveness of morphological screening criteria, which are currently used for the selection of a viable embryo, is considered to be one of the main limiting factors contributing to a low pregnancy rate and thus low live birth rate. Therefore, biomarkers present in embryo culture media have a great clinical perspective. They can be analysed through samples of the culture medium after use in embryo culture using different omics research methodologies. Furthermore, in this literature review, the different biomarkers that currently have a prognostic role in terms of embryo viability and implantation potential in a clinical setting will be analysed. Also, the different indirect and non-invasive in vitro methods based on the analysis of the culture medium used by embryos will be studied within the areas of metabolomics, proteomics and microRNA (miRNA). In addition, we will review which biomarkers have a better clinical perspective and which of them have more clinical relevance. Although several biomarkers of culture media have been defined, there is still a lack of information as to which biomarkers are potential due to the lack of synchronisation of protocols, media and practices in different laboratories, so more randomised clinical studies would be needed, as well as more samples to be analysed. However, there is a strong trend in the search for and analysis of miRNAs due to their ease of use. In addition, the use of MALDI-TOF and IA could help in future investigations of potential biomarkers of pregnancy.

**KEYWORDS:** assisted reproductive technology, biomarker, embryo quality, human preimplantation embryos, non-invasive assessment, used embryo culture médium

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1.1. MÉTODOS NO INVASIVOS UTILIZANDO EL MEDIO DE CULTIVO DE EMBRIONES</b>	<b>3</b>
<b>1.1.1. METABOLÓMICA</b>	<b>4</b>
<b>1.1.2. PROTEÓMICA</b>	<b>6</b>
<b>1.1.3. miARN</b>	<b>7</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>8</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>9</b>
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>9</b>
<b>5. DISCUSIÓN</b>	<b>16</b>
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>20</b>
<b>7. ABREVIATURAS</b>	<b>20</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>21</b>

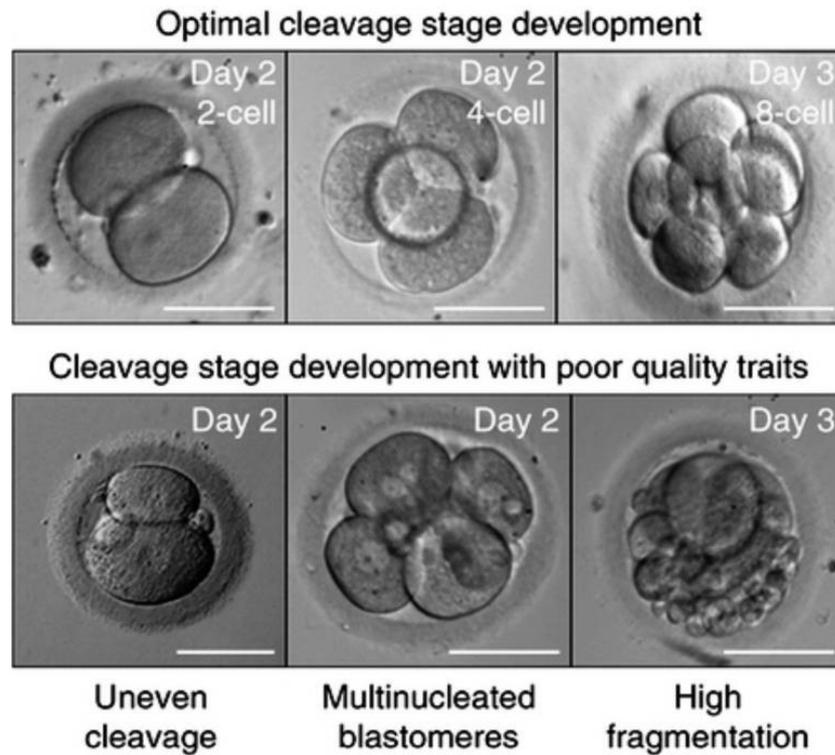
## 1. INTRODUCCIÓN

Hoy en día, la infertilidad sigue siendo uno de los grandes problemas de salud pública para muchas parejas en todo el mundo, afecta alrededor del 10-15% de la población en edad reproductiva. Por ello, las técnicas de reproducción asistida (TRA), ante todo la fecundación *in vitro* (FIV), han sido de gran relevancia a la hora de conseguir un niño recién nacido en casa. El proceso de FIV consiste en la monitorización, la estimulación de la ovulación de la mujer y la extracción de un óvulo o varios con el fin de fertilizarlo con el semen en el laboratorio. Tras ello, el ovocito fertilizado se cultiva durante 2 a 6 días en un medio de cultivo y posteriormente se transfiere al útero de la mujer con la intención de que ocurra una implantación, y, por ende, una gestación exitosa (1).

A través de la mejora en las condiciones de cultivo y la reducción en el número de los embriones a transferir en el mismo ciclo se ha producido un aumento en la tasa de implantación, así como una reducción significativa de los embarazos múltiples. Sin embargo, a pesar de los avances en TRA, la tasa de recién nacido vivo sigue siendo baja (1-2).

La evaluación morfológica clásica ha sido históricamente la variable más importante en la selección de los embriones para la transferencia cuando se considera a los embriones como factores estáticos. Sin embargo, aún se desconoce exactamente la relevancia de varios aspectos morfológicos del embrión, como el grado de la fragmentación, la asimetría celular y los polimorfismos en la evolución posterior, pero la presencia de estas características indica un mal pronóstico (2).

Por lo que la ineficacia de los criterios de evaluación morfológica, que en la actualidad se practican para la selección de un embrión viable, se considera uno de los principales factores limitantes que contribuyen a una baja tasa de embarazo y por ende, de recién nacido vivo (3).

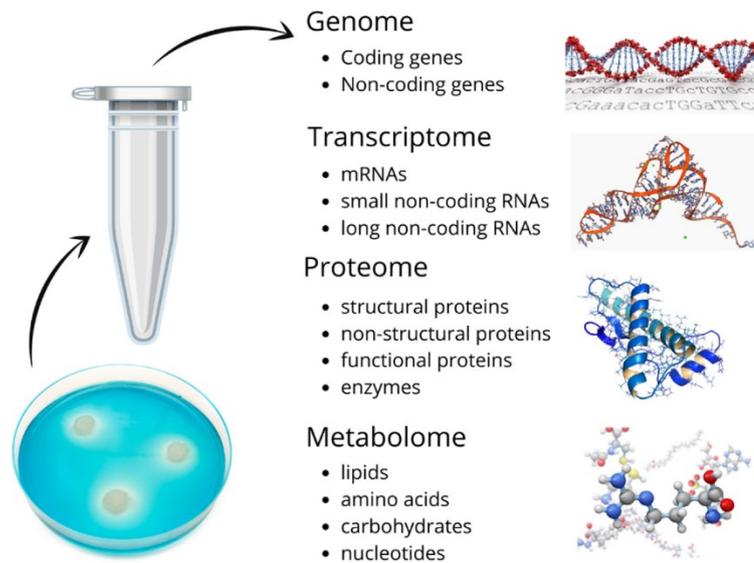


**Figura 1.** La imagen representa la evaluación morfológica de un embrión en día 2 y 3 de desarrollo. Arriba se muestra un embrión de alta calidad y abajo un embrión de baja calidad (4).

Dada la situación actual, existe una necesidad urgente de encontrar un método de evaluación fiable que pueda predecir el potencial de implantación de los embriones. Se han propuesto los biomarcadores en el medio de cultivo embrionario ya utilizado como un método complementario, no invasivo, para comprobar la viabilidad y el potencial de desarrollo del embrión, así como la implantación del mismo (5).

Además, implementar un enfoque no invasivo para predecir los resultados de los embriones sería beneficioso de muchas maneras, amenorando la posibilidad de dañar el embrión, su entorno y, por lo tanto, su potencial de desarrollo. También reduciría los costos, disminuyendo la necesidad de la biopsia, el número de ciclos y aumentando la eficacia de tales pruebas. Y, con ello, mejorar las tasas de recién nacido vivo (3).

Por tanto, los biomarcadores presentes en el medio de cultivo embrionario tienen una gran perspectiva clínica. Se pueden analizar a través de las muestras del medio de cultivo embrionario ya utilizado por medio de distintas metodologías de investigación como la genómica, transcriptómica, metabolómica y proteómica (3).



**Figura 2.** Esquema de los materiales que se pueden encontrar en un medio de cultivo que ha sido empleado para el cultivo hasta estadio de blastocisto y que pueden ser el reflejo de la capacidad implantatoria del embrión. (3).

Recientes investigaciones en el campo de la medicina reproductiva han demostrado que es necesaria la tendencia hacia métodos no invasivos para el análisis simple y directo. Con el objetivo de asegurar una selección precisa del mejor embrión para la transferencia, asegurando minimizar el tiempo hasta el embarazo (3).

Por consiguiente, en este trabajo de fin de máster, se hará una revisión bibliográfica acerca de los distintos biomarcadores que actualmente tienen un papel pronóstico en cuanto a la viabilidad del embrión y potencial de implantación en un entorno clínico. Para ello, se estudiarán los distintos métodos *in vitro* indirectos y no invasivos basados en el análisis del medio de cultivo embrionario dentro de las áreas de metabolómica, proteómica y microARN (miARN). También, a través de un estudio bibliográfico, se revisará qué bioindicadores tienen mejor perspectiva clínica, y, cuál de ellos tiene mayor relevancia clínica.

## 1.1. MÉTODOS NO INVASIVOS UTILIZANDO EL MEDIO DE CULTIVO DE EMBRIONES

Los embriones al cultivarse en el medio de cultivo secretan distintas sustancias que son de gran interés para analizar y poder construir su perfil metabólico, lo que podría

indicar qué potencial de viabilidad y de implantación tienen. Por eso, se utilizan los medios de cultivo embrionario gastados para su análisis.

Las sustancias de interés o bioindicadores se pueden dividir en los tres principales grupos que corresponden con las diferentes etapas que tienen durante la función celular. Así como los productos finales de los procesos biológicos de las células (metabolómica); las proteínas traducidas de los productos de expresión genética específica de las células (proteómica); y los reguladores negativos de la expresión génica basados en ARN (ARN pequeño no codificante o miARN) que se ha demostrado que mantienen la estabilidad extracelularmente. Al tratarse de moléculas que están presentes en cantidades ínfimas en el medio de cultivo disponible, el análisis, y por tanto los métodos a utilizar en estos bioindicadores deben tener gran sensibilidad. La cantidad del medio a analizar puede variar desde 15 a 40  $\mu\text{l}$  en una gota que rodea a un embrión, hasta 400 a 500  $\mu\text{l}$  en cultivos de grupo. Sin embargo, aunque el cultivo grupal permite un amplio resultado de analitos, este carece de la especificidad de discernir entre embriones individuales. Por lo tanto, es fundamental que prime la especificidad en los métodos implicados en el análisis del medio de embriones gastados (6).

### **1.1.1. METABOLÓMICA**

La metabolómica puede detectar y cuantificar los metabolitos tanto endógenos como exógenos en organismos vivos. Los metabolitos, moléculas de bajo peso molecular, son productos intermedios o finales que produce un organismo en condiciones específicas, y que pueden indicarnos el correcto funcionamiento y desarrollo de diferentes procesos biológicos (2).

Por lo tanto, se podría usar el análisis del metaboloma embrionario para correlacionar la actividad metabólica con la capacidad de implantación y la viabilidad embrionaria. A diferencia de la genómica y proteómica, la metabolómica analiza diversos tipos de moléculas como aminoácidos, productos de oxidación, ácidos carboxílicos y carbohidratos (6-7).

A lo largo del tiempo se ha utilizado espectroscopia, especialmente la de infrarrojo cercano (NIR), para el estudio de la relación entre el metaboloma y la viabilidad celular. Se basa en la medición de las vibraciones de los grupos funcionales en una muestra sin identificar los metabolitos específicos, se puntúa la viabilidad al comparar dentro de las regiones espectrales de NIR. Además, tiene la ventaja de realizar mediciones directas

con poco volumen de muestra (<15 µl), sin requisitos para la preparación de la muestra y con resultados disponibles en 1 minuto por muestra. Lo que contrastaba con otras espectroscopías como la de Raman o la de resonancia magnética nuclear (RNM), que se caracterizaban por ser equipos costosos y complicados, baja sensibilidad, procesamiento prolongado y extenso, además de necesitar un análisis estadístico complejo, lo que los hace poco prácticos en entorno clínico. Sin embargo, tras realizar varios ensayos clínicos aleatorios se ha observado que el perfil metabólico basado en NIR no ofrece ninguna ventaja sobre la evaluación morfológica de los embriones, las tasas de nacidos vivos fueron del 34,7% en el grupo control y del 33,2% en el grupo NIR. También se ha observado que en los estudios en los que se utilizaba NIR había una gran variación intragrupo, lo que puede ocasionar predicciones tanto de los falsos positivos como de los falsos negativos. Por lo que este tipo de tecnología necesita mejorarse y volver a probarse para obtener los perfiles metabólicos embrionarios y poder evaluar la viabilidad embrionaria (3-6).

De la misma forma se han utilizado otros tipos de espectroscopía. Una de ellas, una variante de la NIR es la espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) utilizada para predecir el embarazo de los embriones bovinos. Sin embargo, a pesar de demostrar que en los blastocistos expandidos transferidos la tasa de natalidad era más alta utilizando este método, se observaron diferencias en el tratamiento de los embriones (frescos o vitrificados) y entre los laboratorios que manipulan los embriones, lo que inducía diferencias en el perfil de FTIR de los medios de cultivo gastado. Aunque existe la posibilidad de utilizar FTIR para predecir el éxito de la transferencia, ya que se trataría de una técnica rápida, sencilla y económica, sigue siendo limitado por la baja cantidad de los datos validados en las base de datos (6).

Por último, también, se ha utilizado la espectroscopia de RNM, a diferencia de la NIR, es capaz de identificar los metabolitos específicos. No obstante, los resultados de los estudios obtenidos con este método son ambiguos y controvertidos. Una posible razón a que no sea concluyente es debido a que el tamaño de las muestras era distinto en cada estudio. Además, se observó que la composición del medio de cultivo afectaba profundamente al perfil de RNM. Y, dado que los distintos laboratorios de FIV utilizan diferentes tipos de medios de cultivo, y que, además las casas comerciales cambian y mejoran continuamente los medios, esto puede suponer un problema crucial en este método. También es una técnica como se ha mencionado anteriormente, con aparatos de gran tamaño y costosa. Por lo que, la utilización de RNM como una herramienta clínica

práctica para predecir una transferencia exitosa de los embriones sigue siendo baja en la actualidad (6).

Sin embargo, con los avances en las bases de datos y en la tecnología pueden cambiar en el futuro los métodos espectroscópicos de infrarrojos y RNM, ya que son rápidos y tienen potencial para ser aplicados en la predicción de la capacidad implantatoria de los embriones en un laboratorio de FIV (6).

### **1.1.2. PROTEÓMICA**

El proteoma es un conjunto de proteínas y sus propiedades (niveles de expresión, modificaciones post-transcripcionales, interacciones) expresadas en una célula, un tejido o un organismo en el momento concreto de estudio. Mientras que el secretoma se define como aquellas proteínas producidas y secretadas por el embrión al medio de cultivo, siendo de utilidad para la obtención de información sobre los procesos del desarrollo embrionario temprano y la viabilidad del desarrollo posterior (2).

En un principio, el limitado conocimiento del proteoma y el secretoma embrionario, junto a una limitación de la tecnología proteómica han sido un obstáculo para el desarrollo y la aplicación de la proteómica para la caracterización de los embriones (6).

Por lo que el uso de métodos proteómicos, con gran sensibilidad, como la espectrometría de masas (MS), los ensayos de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) y la transferencia de Western, han permitido en estos últimos años el descubrimiento de los potenciales biomarcadores. Siendo la MS más rápida en comparación con los métodos inmunoquímicos tradicionales como la ELISA, y por tanto presenta un mayor potencial de aplicación en las TRA. Aun así, estos avances siguen teniendo inconvenientes técnicos, debido a los reactivos que se utilizan para los medios de cultivo de embriones, como el suero en los medios de cultivo más antiguos, la albúmina como fuente de proteínas del medio, las inmunoglobulinas y algunos factores de crecimiento celular, que pueden enmascarar los resultados. Todavía no se ha encontrado un remplazo para la albúmina, dadas las múltiples ventajas que aporta al cultivo embrionario, mejorando el manejo embrionario en los medios de cultivo, quelando metales pesados, actuando como osmolitos o como una fuente de aminoácidos estable y no desaminados, así como transportando diferentes factores de crecimiento importantes para el embrión. Por lo que la presencia de la albúmina y de otras proteínas

afecta a la detección de proteínas de origen embrionario con un peso molecular correspondiente al de la albúmina sérica (60-70 kDA), o a las inmunoglobulinas con los métodos rentables y aplicables en los laboratorios de FIV (6).

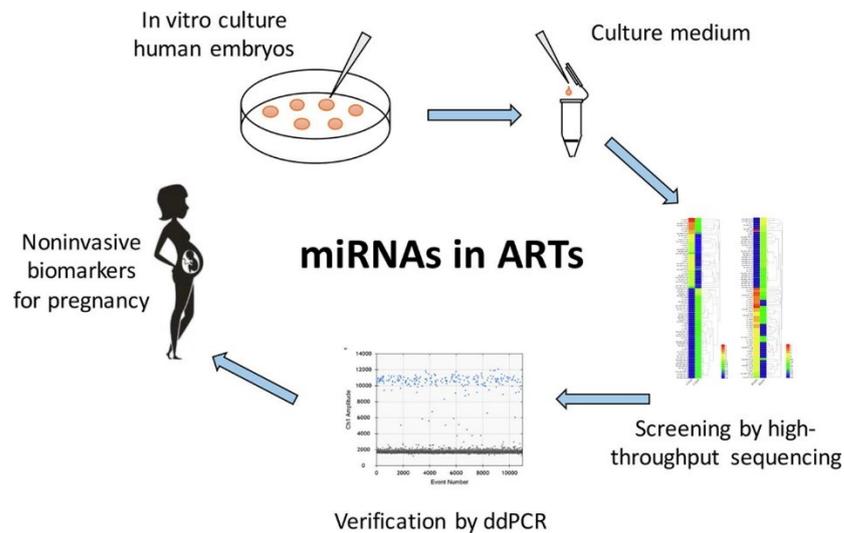
### **1.1.3. miARN**

Los miARNs son moléculas de ARN pequeños (18-22 nucleótidos) no codificantes de cadena única conservadas evolutivamente tanto en los humanos como en otras especies, como en los cerdos, bovino y pollos. De hecho, funcionan como reguladores post-transcripcionales de la expresión génica que causa la represión traduccional o la degradación controlada del ARN mensajero (ARNm). Además, son moléculas pleiotrópicas, un solo miARN puede regular más de 100 genes. De igual manera se ha asociado que estas dianas genéticas tengan influencias en todos los sistemas biológicos, como la apoptosis, el crecimiento, la proliferación, la reproducción y el desarrollo, así como la expresión se produce de una manera espacial y temporal específica. Así mismo, los miARNs regulan más del 50% de todos los procesos de traducción. También se ha descrito la presencia de esta molécula en casi todos los biofluidos, incluidas las lágrimas, la sangre, la orina, la leche materna y el semen, y, en el medio de cultivo celular. De igual modo, se ha observado, que el miARN es muy estable y resistente a la degradación. Dicho fenómeno es posible por la encapsulación de al menos algo del miARN extracelular en pequeñas vesículas derivadas de la membrana llamadas exomas, que se pueden ser captadas por otras células y, por lo tanto, afectar a la expresión génica en esas células (6-9-10).

Desde una perspectiva biológica o clínica, los miARNs son interesantes ya que pueden exportarse de las células del donante, viajar a través de todos los diferentes fluidos del cuerpo y ser internalizados por las células receptoras, donde modifican su expresión génica. Y, desde la perspectiva técnica o logística, tiene mayor interés ya que son extremadamente resistentes a varias agresiones biológicas y mecánicas, como la digestión de ARNasa, a los ciclos consecutivos de congelación y descongelación, y el tratamiento extremo de pH y ADNasa. Es decir, es un biomarcador ideal para la futura adopción putativa en el flujo del trabajo diario de una clínica de FIV (9).

Varios grupos han estudiado que los miARNs secretados en los medios de cultivo pueden diferir entre los embriones viables y no viables (6). Para su análisis se utiliza la reacción cuantitativa en cadena de la polimerasa en tiempo real (qRT-PCR) ya que es un

método rápido, económico y se puede utilizar con las muestras de pequeño tamaño. Aunque para su utilización se necesite un pretratamiento de la muestra, esto lo convierte en un candidato como la herramienta para detectar los biomarcadores de miARN en el medio de cultivo embrionario, ya que la prueba se puede realizar dentro del medio antes de realizar la transferencia.



**Figura 3.** Esquema de la obtención y el análisis de miARN en los medios de cultivo embrionario (10).

## 2. OBJETIVOS

- Revisar las últimas actualizaciones que existen acerca de los biomarcadores en los medios de cultivo embrionario que son relevantes en la viabilidad embrionaria.
- Estudiar qué biomarcadores tienen una mayor relevancia clínica para la selección del mejor embrión.
- Analizar la perspectiva futura del uso de los biomarcadores en los medios de cultivo embrionario como una técnica no invasiva en la evaluación de la viabilidad embrionaria.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

En este trabajo de fin de máster se ha realizado una revisión bibliográfica entre los meses de junio y agosto del 2021, se lleva a cabo una búsqueda en las principales bases de datos científicas: Google Scholar, Pubmed, Springer Link, Frontiers, Science Direct, MDPI, NCBI, Fertility and Sterility, Oxford Academic.

Para dicha revisión se han seleccionado 20 artículos científicos que contenían una relación directa con el tema de este estudio y que hayan sido publicados en los últimos 6 años (2015-2021). La búsqueda de información se ha realizado principalmente en inglés, ya que es el idioma más usado y extendido en la comunidad científica. También se han realizado búsquedas en castellano, aunque la cantidad de información ha sido más escueta en este caso.

Las palabras clave que se han utilizado para recopilar la información han sido: *assisted reproductive technology, biomarker, embryo quality, human preimplantation embryos, non-invasive assessment, metabolomics, miRNA, proteomics, spent embryo culture médium.*

Como estrategia de búsqueda de información en las bases de datos se han utilizado conectores booleanos como AND y OR. De este modo, combinando dichos conectores con las palabras clave a utilizar, se han encontrado los artículos que son válidos para los objetivos que se han planteado en este trabajo de fin de máster. El conector OR se ha utilizado para palabras cuya búsqueda nos da información similar acerca de lo queremos encontrar como *biomarker* y *metabolomics*, *biomarker* y *proteomics* o *biomarker* y *miRNA*. Así como, el conector AND se ha utilizado en todas las palabras clave para obtener una mayor especificidad y sensibilidad de la búsqueda.

Finalmente, para una organización eficaz de la información obtenida, se utilizó un gestor bibliográfico, concretamente Mendeley, que ayuda a ordenar y clasificar todos los artículos. También, ayuda a citar en los textos ya que se puede vincular al programa editor de Microsoft Word.

### 4. RESULTADOS

En la siguiente tabla se resumen los biomarcadores que han sido considerados potenciales y han sido analizados a través de las distintas técnicas -ómicas (metabolómica y proteómica), además del uso de nuevas tecnologías como el análisis de

miARN utilizando la reacción cuantitativa en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR).

**Tabla 1.** Biomarcadores potenciales de la viabilidad e implantación embrionaria

MOLÉCULAS	PUBLICACIONES	DESCRIPCIÓN
<b>Glucosa y piruvato</b>	<p>Sallam y col. (2016) Artículo de revisión (4)</p> <p>Monstkó y col. (2017) Capítulo (11)</p>	<p>En los primeros 2 días tras la fertilización los embriones utilizan preferentemente el piruvato como su principal fuente de energía, mientras que tras la compactación comienzan a consumir preferentemente la glucosa. El uso de la glucosa y el piruvato en el día 4 demostró que se podía predecir el desarrollo de los blastocistos en los embriones humanos. Aquellos embriones que dieron lugar al embarazo no fueron los que tenían las puntuaciones morfológicas más altas. Además, se observó que los embriones humanos femeninos consumían más glucosa en comparación con los embriones masculinos. También se estudió que la medición de la glucosa es más importante que la del piruvato, y a mayor grado del blastocisto mayor consumo de la glucosa que proporciona una información adicional sobre la viabilidad del embrión.</p>
<b>Leucina</b>	<p>Calomarde y col. (2016) Artículo de revisión (2)</p> <p>Monstkó y col. (2017) Capítulo (11)</p>	<p>Desarrollo del embrión de manera normal hasta blastocisto.</p>
<b>Alanina, arginina, glutamina, metionina y asparagina</b>	<p>Monstkó y col. (2017) Capítulo (11)</p>	<p>Predijeron significativamente el potencial del desarrollo.</p>
<b>Leucina, glicina y asparagina</b>	<p>Calomarde y col. (2016) Artículo de revisión (2)</p> <p>Monstkó y col. (2017) Capítulo (11)</p>	<p>El recambio de estos aminoácidos se asoció significativamente al embarazo clínico y los nacidos vivos.</p>

<p><b>Antígeno leucocitario humano soluble G (sHLA-G)</b></p>	<p>Calomarde y col. (2016) Artículo de revisión (2)</p> <p>Monstkó y col. (2017) Capítulo (11)</p> <p>Rodríguez Díaz y col (2019) Artículo de investigación (12)</p>	<p>El HLA-G es secretado principalmente por el trofoblasto extraveloso en la interfaz fetal-materna y desempeña un papel importante en el proceso de la implantación ya que se opone a la acción de las células <i>natural killers</i> (NK).</p> <p>El antígeno leucocitario humano soluble G (sHLA-G) fue considerado un predictor de la tasa de implantación y del embarazo. Se cuantificó mediante un inmunoensayo y se hicieron dos grupos, uno con sHLA-G+ para aquellos embriones que producían el antígeno por encima de la media y sHLA-G-, para aquellos que producían el antígeno por debajo de la media. En el grupo de sHLA-G+ se observaron tasas de embarazo e implantación significativamente más altas, el 75% y el 44%, mientras que para sHLA-G- se observaron el 23% y el 14%.</p> <p>Se relaciona con el éxito de la implantación y evita que el sistema inmunitario de la madre detecte al embrión como extraño, por ello se considera un buen marcador de la viabilidad embrionaria.</p>
<p><b>Apolipoproteína A1</b></p>	<p>Monstkó y col. (2017) Capítulo (11)</p>	<p>En un estudio, mediante la identificación y cuantificación de la apolipoproteína A1 a través de MS (MALDI-TOF), ELISA y qRT-PCR con la transcriptasa inversa de ARNm. Se observó que el nivel de esta apolipoproteína se correlacionaba con el grado del blastocisto, pero no con las tasas de implantación y el embarazo. Sin embargo, en otro estudio utilizando MS, Western-blot y ELISA para identificar 14 péptidos regulados diferencialmente que luego se utilizaron para generar algoritmos genéticos capaces de la identificación de ciclos de embriones que resultaron en un embarazo y ciclos con implantación fallida. Con una precisión del 71-84% estos algoritmos genéticos podían predecir los ciclos de transferencia que resultaron en embarazo. En aquellos medios en los que los péptidos presentaban una expresión reducida de apolipoproteína A-1 representaban ciclos de transferencia que daban a un embarazo viable.</p>
<p><b>Lipocalina-1</b></p>	<p>Calomarde y col. (2016) Artículo de revisión (2)</p>	<p>Utilizando un espectrofotómetro de masas ultra híbrido de transformada de Fourier- Quadropolar de Trampa Lineal (LTQ-FT) y operando en modo de espectrometría de masas tándem (MS/MS) se identificó la lipocalina-1 como asociada con la</p>

	Monstkó y col. (2017) Capítulo (11)	aneuploidía. Se cuantificó la concentración de la lipoproteína a través de un kit de ELISA comercial y se pudo determinar una clara discriminación de embriones euploides y aneuploides en microgotas de medios de cultivo. Los embriones que contenían 3-4 ng/ml de lipocalina-1 eran euploides, mientras que los embriones aneuploides contenían este compuesto en una concentración de 6-7 ng/ml, así mismo inhibía el proceso de hatching e implantación.
<b>Cadena alfa-1 de haptoglobina</b>	Sallam y col. (2016) Artículo de revisión (4)  Monstkó y col. (2017) Capítulo (11)  Monstkó y col. (2015) Artículo de investigación (13)	La forma alfa-1 de la haptoglobina humana tiene una masa monoisotópica de 9186,4 Da. Se identificó a través de la MS en tándem. El resultado del análisis ciego del medio del cultivo de embriones después de 3 días de incubación reveló de 161 mediciones de la cadena alfa-1 de haptoglobina que 62 muestras eran bioquímicamente no viables y 99 muestras eran bioquímicamente viables. De los 62 embriones bioquímicamente no viables no dieron ningún parto exitoso. Mientras que los embriones que eran bioquímicamente viables mostraron una tasa de embarazo del 55%. Además, existe una correlación significativa entre la cantidad de fragmento del péptido y el resultado del embarazo.
<b>Factor de activación plaquetaria (PAF)</b>	Calomarde y col. (2016) Artículo de revisión (2)  Sallam y col. (2016) Artículo de revisión (4)	El factor de activación de plaquetas (PAF) también conocido como fosfolípido 1-o-aquil-2-acetil-sn-glicero-3-fosfolina, es un factor soluble que es producido por embriones de mamíferos preimplantacionales. Además de estar involucrado en la activación plaquetaria, influye en los cambios de las funciones inmunitarias oviductal, endometrial y materna. Además, actúa como un factor de supervivencia trófica para el embrión temprano y esto se ha demostrado con la suplementación con PAF en medios de cultivo. Se encontró una buena correlación entre los niveles del PAF y del embarazo. No se ha asociado con la viabilidad embrionaria. Está implicado en la vasodilatación uterina promoviendo así la implantación del blastocisto.
<b>Leptina</b>	Calomarde y col. (2016) Artículo de revisión	Se expresa en el endometrio promoviendo la adhesión del embrión.

	(2) Sallam y col. (2016) Artículo de revisión (4)	Se observó que los blastocistos humanos secretaban leptina a niveles significativamente más altos en comparación a los embriones detenidos. Implicada en el proceso de implantación.
<b>Ubiquitina</b>	Calomarde y col. (2016) Artículo de revisión (2)  Sallam y col. (2016) Artículo de revisión (4)	Se ha estudiado que un aumento en la expresión de esta proteína en los embriones se relacionaba con un aumento de la llegada a blastocisto.
<b>Isoformas de la gonadotropina coriónica humana (BBhCG)</b>	Calomarde y col. (2016) Artículo de revisión (2)  Sallam y col. (2016) Artículo de revisión (4)	Esta molécula fue detectada en el medio de cultivo ya utilizado de los embriones humanos desde la etapa 2 pronuclear (2PN) hasta la etapa de blastocisto. A través de los inmunoensayos de electroquimioluminiscencia de alta sensibilidad, se halló una correlación positiva entre la concentración de BBhCG y la clasificación morfológica del blastocisto, así como la tasa de implantación.
<b>Caspasa-3 y glicoproteína rica en histidina (HRG)</b>	Kaihola y col. (2019) Artículo de investigación (14)	A través del análisis de las proteínas de extensión de la proximidad multiplex del secretoma de los embriones cultivados en el día 2 basándose si consiguieron o no el embarazo. Se observó que los niveles de caspasa-3 más bajos se relacionaban con los secretomas de alta calidad frente a los blastocistos de baja calidad y los que se detuvieron. Además, los niveles altos de HRG se correlacionaron con un tiempo más corto de formación de mórula. También se analizaron que los niveles de caspasa-3 en el día 2 fueron inferiores en los secretomas de los embriones cultivados que resultaron en un embarazo frente a los que no lo hicieron. Así mismo, se demostró que la caspasa-3 es un potencial marcador para predecir la tasa de éxito potencial después de la transferencia de embriones que habían sido cultivados en el día 2, con una probabilidad de predecir del 68%. Por tanto, los niveles de caspasa-3 y HRG son marcadores potenciales de la calidad del embrión.

<p><b>IL-6</b></p>	<p>Zmuidinaite y col. (2021) Artículo de revisión (3)</p> <p>Dominguez y col. (2015) Artículo de investigación (15)</p>	<p>Utilizando la tecnología multiplex basada en perlas se analizaron 7 proteínas y se reveló que la presencia de la interleucina 6 (IL-6) en los medios de cultivo gastados estaba correlacionada con altas tasas de implantación de los blastocistos humanos.</p>
<p><b>miR-372, miR-191 y miR-645</b></p>	<p>Rødgaard y col. (2015) Artículo de revisión (6)</p>	<p>En un estudio en el que se analizó 754 miARN en el medio de cultivo gastado, se observó que estos 3 miARNs se expresaron de manera diferencial el día 5 en los medios de cultivo que tuvieron un embarazo exitoso y en el medio que no condujeron a un embarazo. Se observó que miR-191 se encontraba en concentraciones más altas en el medio de cultivo de embriones aneuploides en comparación con los embriones euploides.</p>
<p><b>miR-142-3p</b></p>	<p>Zmuidinaite y col. (2021) Artículo de revisión (3)</p>	<p>Se identificó que este miARN se correlacionaba significativamente con el fracaso de la implantación, por lo que los embriones que lo produzcan podrían excluirse de la implantación.</p>
<p><b>miR-294</b></p>	<p>Ramos y col. (2020) Artículo de revisión (16)</p>	<p>Este miARN en el medio de cultivo se correlacionó directamente con la apoptosis en los embriones de ratón. Aunque se desconoce el papel biológico de miR-294, hay dos hipótesis que lo podrían explicar. Una es que miR-294 está involucrado en la supresión del inhibidor de apoptosis BCL2, que en última estancia actúa promoviendo la apoptosis. La otra posible razón es que la apoptosis desencadene miR-294, que se confirmó exponiendo embriones a la radiación ultravioleta.</p>
<p><b>miR-30c</b></p>	<p>Kaihola y col. (2019) Artículo de investigación (14)</p> <p>Ramos y col. (2020) Artículo de revisión (16)</p>	<p>En los embriones bovinos los niveles altos de este miARN se han asociado con un aumento de la apoptosis y una reducción de las tasas de desarrollo. El miR-30c regula la expresión de p53 y la apoptosis celular. Además, regula negativamente la quinasa 12 dependiente de la ciclina (CDK12) y los genes de respuesta al daño celular del ADN, que puede afectar la progresión del ciclo celular. Este</p>

	Capalbo y col. (2016) Artículo de investigación (17)	miARN está altamente conservado entre especies y en humanos, los altos niveles de miR-30c en el medio de cultivo gastado de embriones se han asociado a una implantación exitosa.
<b>miR-20a</b>	Kaihola y col. (2019) Artículo de investigación (14)  Capalbo y col. (2016) Artículo de investigación (17)	Este miARN estaba involucrado en 25 vías y procesos biológicos diferentes. Principalmente, estas vías son la comunicación y señalización célula a célula, la adhesión de célula a célula y el crecimiento celular/ cáncer. El miR-20a es uno de los miARN más abundantes en medio de cultivo ya utilizado para el cultivo de blastocistos humanos que han implantado.
<b>miR-372-3p y miR-323-3p</b>	Fang y col. (2021) Artículo de investigación (10)	Se observó que estos miARNs estaban regulados positivamente en los medios de cultivo de los embriones con embarazo exitoso, lo que reprimiría su gen diana, LATS2 (inhibidor del ciclo celular), promoviendo la progresión del ciclo celular en el desarrollo embrionario temprano.
<b>Hsa-miR-26b-5p y hsa-miR-21-5p</b>	Fang y col. (2021) Artículo de investigación (10)	Se ha analizado que estos miARNs se expresan de manera reducida en los medios de cultivo de los embriones humanos con embarazos exitosos.
<b>miR-29c-3p</b>	Abu-Halima y col. (2017) Artículo de investigación (18)	Entre 621 miARNs, 102 mostraron una expresión diferencial entre el resultado positivo y negativo del embarazo, siendo miR-29c-3p, el miARN expresado diferencialmente el más significativo.
<b>miR-634</b>	Abu-Halima y col. (2017) Artículo de investigación (18)	Se correlacionó este miARN del medio de cultivo embrionario con un embarazo exitoso con una precisión del 71% y una sensibilidad del 85%.

Además del uso de los métodos convencionales descritos anteriormente para hallar el perfil metabólico de los embriones para tratamientos de FIV, se está planteando implementar el uso de los nuevos modelos de espectrometrías de masas MALDI-TOF (ionización láser asistida por matriz) de sobremesa de bajo perfil, o la microscopía Time Lapse combinada con la inteligencia artificial (IA). Estas aplicaciones podrían ser un método alternativo para aumentar la detección de aneuploidías en los casos en los que el

cribado genético preimplantacional (PGS) invasivo no es aconsejable o no se desea. Además de proveer la disponibilidad del cribado en aquellos casos en los que no esté disponible debido a los altos costos de las tecnologías actuales. También podría ser un cambio importante en el paradigma de cómo se examinan los embriones de FIV antes de la implantación, permitiendo una alternativa más segura y eficiente. Así como reducir el tiempo hasta el embarazo y el riesgo de un embarazo aneuploide, estas metodologías podrían ser beneficiosas desde la perspectiva de la economía sanitaria (3).

## 5. DISCUSIÓN

En los últimos 6 años ha habido bastante actualización acerca del perfil metabolómico de los embriones utilizando el medio de cultivo empleado para el cultivo embrionario a través de las distintas -ómicas. Sin embargo, la búsqueda de los biomarcadores únicos ha sido más difícil en comparación a un conjunto de ellos, esto es así debido a que el metabolismo de los embriones es mucho mayor y más complejo que el que pueda explicar el desequilibrio de un solo metabolito. Por ello, actualmente se ha producido un cambio hacia el análisis metabolómico global.

Además, hay muchos estudios realizados tanto en los humanos como en otras especies, utilizando el proteoma y el metaboloma en el secretoma embrionario que ha dado lugar a muchos marcadores biológicos o biomarcadores potenciales, como los recogidos en la Tabla 1. Sin embargo, hasta ahora, ninguno ha resultado útil para el uso en el laboratorio de FIV, además, hay muchos marcadores que aún no se han probado en el entorno clínico. Asimismo, la tecnología utilizada en estas ómicas aún es compleja para su uso clínico y tampoco se ajusta al tiempo crítico que transcurre entre la formación del blastocisto y la transferencia de embriones, por lo que aún no se podrían adaptar adecuadamente a los flujos actuales de trabajo del laboratorio de embriología. De igual manera estos métodos actualmente requieren técnicos capacitados y un gasto de capital significativo para funcionar con éxito (19).

En una revisión sistemática se estudiaron los medios de cultivo que habían sido utilizados para el cultivo de embriones, y las diferencias metabolómicas entre embriones que podrían indicar el potencial de la implantación. Sin embargo, se identificaron numerosos obstáculos. El primero, y el más significativo, es que la adición de los perfiles metabólicos de los medios de cultivo gastados a la morfología no mejoró la posibilidad

de lograr un embarazo viable en comparación con el uso de la morfología sola. En segundo lugar, algunos estudios que utilizaron los medios de cultivo usados los congelaron y los transportaron a un laboratorio central, por lo que indica que el perfil metabólico no sea una prueba robusta y reproducible cuando se realiza en los laboratorios locales. En tercer lugar, las clínicas utilizan diferentes tipos y volúmenes de los medios de cultivo de embriones y también tienen diferentes prácticas en cuanto al momento de la transferencia de embriones. Por lo que si el perfil metabólico está influenciado por estos factores se necesitaría de un protocolo estandarizado, así como, de un mayor número de estudios clínicos aleatorizados. Y, en el cuarto lugar, tener en cuenta que la aneuploidía es un factor importante en la implantación fallida y el aborto espontáneo, por ello, si la aneuploidía tuviera un perfil metabólico único y detectable sería de gran interés para las futuras investigaciones (20).

En los últimos años se ha incrementado el interés en el uso y análisis de los miARNs. Ya que los miARNs pueden detectarse y analizarse de manera confiable en el medio de cultivo de los embriones usado. Además, se ha observado que la expresión del mismo es estable tanto en las etapas de escisión como de blastocisto, además que se ha demostrado que en los blastocistos hay un elevado número de la expresión de miARN (8-10).

Potencialmente los miARNs juegan un papel importante en la sincronización de los eventos que ocurren para que el blastocisto tenga un desarrollo normal. Por lo que, la expresión de los miARNs podría aumentar durante esta etapa de desarrollo, que se ve reflejado en la medición del medio de cultivo. Otra explicación al elevado número de los miARNs detectados en los blastocistos en el medio de cultivo, es debido al elevado número de células presentes en esta etapa de desarrollo. En un reciente estudio se determinó que la mayoría de los miARNs detectados en el medio de cultivo de blastocitos provenía del trofoectodermo. También, algunos autores postulan que el blastocisto secreta miARN para comunicarse paracrinamente con el endometrio. Se ha estudiado que la diversa población de los microARNs, secretadas por las células del trofoectodermo, puede ser captada por las células del endometrio. Una vez dentro, los miARNs pueden modular la expresión genética para prevenir o favorecer la implantación de un blastocisto. Por ello, la expresión de los diversos miARN en el medio de cultivo de blastocistos puede desempeñar un papel funcional en la implantación y también ser un subproducto directo del elevado número de células presentes en esta etapa de desarrollo. Se ha observado que, en los medios de cultivo del embrión de 2 células, este es capaz de captar los miARNs del entorno extracelular, lo que podría plantear que los

embriones pueden tomar los miARNs durante todo el periodo preimplantacional. En otros estudios se ha demostrado que los embriones en la etapa de mórula son capaces de captar los miARNs, con efectos posteriores sobre la expresión génica que afecta al desarrollo de blastocistos. Todo esto resalta un área para el desarrollo de terapias, mediante ciertos miARNs que se podrían complementar en los medios de cultivo para modular la expresión génica que favorecería el desarrollo normal del embrión (8).

En un estudio se sugiere que la mayoría de los miARNs expresados en el desarrollo embrionario temprano son derivados de los ovocitos. Proponiendo que las distintas funciones domésticas que realizan los miARNs, encontrados durante todo el periodo preimplantacional, en el desarrollo embrionario temprano pueden ser derivadas de la madre, fortaleciendo así la relación entre la calidad de los ovocitos y la calidad general del embrión posterior (8).

Aunque actualmente se utilice el PGS para ayudar a seleccionar al mejor embrión para la transferencia y la mejora de las posibilidades de lograr un embarazo exitoso, sin embargo, es un método invasivo y costoso. Mientras que, por el contrario, el miARN es estable, se expresa de manera uniforme, se detecta fácilmente y participa en múltiples procesos fisiológicos y patológicos (10). Su principal limitación es que actualmente, la mayoría de los medios de cultivo, incluidos los utilizados para la maduración *in vitro*, la fertilización y el cultivo de embriones, utilizan suero como un medio para la mejora del rendimiento de los blastocistos. Dado que los miARNs se pueden encontrar en una amplia gama de biofluidos, se puede postular que el suero utilizado en los medios de cultivo contiene miARN. Actualmente el perfil de estas moléculas en los medios de cultivo no se conoce, sin embargo, las investigaciones han demostrado que los miARNs están presentes en medios de cultivo simples. Por ello, los miARNs en lugar de modular los genes para estimular el crecimiento, pueden inhibir negativamente el crecimiento y desarrollo. Para que esto no ocurra, estos miARNs que afectan negativamente se pueden eliminar con la suplementación posterior de miARN que se sabe que estimula el desarrollo. También se pueden realizar estudios con sistemas de cultivo sin suero. Sin la presencia de miARN propio de los cultivos, se facilitaría la identificación de los miARNs adicionales secretados por embriones. Por ende, aunque las funciones de los miARNs identificados son en su mayoría desconocidas, las que se han identificado sugieren que los miARNs son indicativos de fisiología embrionaria intrínseca. Y por ello, las investigaciones futuras deberían centrarse en la validación cualitativa de los miARNs caracterizados dentro de medio de cultivo usado (8).

Además, se ha anotado previamente en estudios que una cohorte exclusiva de miARN de blastocistos está relacionado con el cáncer. Específicamente, se han citado que algunos miARNs propios de los blastocistos tienen un papel oncogénico y supresor de los tumores en varios tejidos tales como el riñón, el hígado, la próstata y el ovario. Está establecido que hay paralelismos en las vías biológicas utilizadas en la tumorigénesis y la embriogénesis. Las señales moleculares que propician el cambio morfológico, la diferenciación, la invasión y la proliferación son todas utilizadas por el embrión antes la implantación para establecer el embarazo. Mientras que, las células tumorales utilizan estos mismos procesos para mejorar el crecimiento, reclutar células y coordinar la propagación a los tejidos distantes. Por lo que, conectar las investigaciones de los estudios oncogénicos daría la respuesta a las funciones de los miARNs en la embriogénesis (8-10).

La tecnología de la espectrometría de tiempo de vuelo de ionización por desorción láser asistida por matriz o MALDI-TOF, es una nueva técnica prometedora para la evaluación del secretoma de los blastocistos en los minutos previos a la transferencia de los embriones y las características espectrales correlacionadas con el resultado del embarazo. Ya que se trata de una espectrometría que puede examinar regiones de mayor masa (1000-100000 m/z), y, por tanto, de importantes citocinas proteicas, ha sido posible desarrollar los algoritmos de riesgo sencillos para el diagnóstico prenatal después del análisis con MALDI-TOF de orina del embarazo temprano. En un estudio utilizando 401 muestras de los medios de cultivo de blastocisto utilizado de 216 mujeres sometidas a ciclos FIV de rutina, se observó que utilizando un algoritmo simple basado en nueve contenedores de masa de 100 m/z dentro de la región 2000-10000 m/z, se pudo identificar las muestras con la mejor probabilidad de convertirse en un embarazo exitoso, con un valor predictivo del 82,9% ( $p=0,0018$ ), además de durar menos de 20 minutos (19).

Así mismo, la implementación de la tecnología como la IA desempeñaría un papel importante en la mejora y la asistencia en muchos de los métodos, tanto en los campos de microscopía como en el análisis de medios usados. Con estos nuevos enfoques computacionales automatizados e integrados, se abren las puertas a los resultados menos sesgados, rápidos, robustos y ultrarrápidos desde el momento en que los datos estén disponibles. Combinado con los ensayos de proteómica de alto rendimiento (MALDI-TOF) realmente podría conducir a un cambio del paradigma en cómo se criba un número cada vez mayor de embriones (3).

## 6. CONCLUSIONES

En conclusión, aunque ha habido alguna actualización en los últimos años acerca de los biomarcadores encontrados en los medios de cultivo embrionarios a través de las distintas ómicas, todavía hay mucha escasez de la información en cuanto a qué biomarcadores son potencialmente útiles debido a la falta de sincronización de los protocolos, los medios y las prácticas en los distintos laboratorios, por ende, se necesitaría de más estudios clínicos aleatorizados, así como una mayor cantidad de muestras a analizar. Sin embargo, actualmente se observa una gran tendencia en la búsqueda y el análisis de los miARNs debido a su fácil manejo. Además, la implementación de las tecnologías más sensibles y robustas como el uso de MALDI-TOF y la IA pueden ser grandes métodos para el futuro hallazgo de los potenciales bioindicadores que puedan predecir la viabilidad embrionaria y la implantación exitosa en una clínica de fertilidad.

## 7. ABREVIATURAS

**ELISA** – Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas

**FIV** – Fecundación *in vitro*

**FTIR** - Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier

**IA** – Inteligencia artificial

**MALDI-TOF** - Tiempo de vuelo de ionización por desorción láser asistida por matriz

**miARN** – ARN pequeño no codificante

**MS** – Espectrometría de masas

**NIR** – Espectroscopía infrarrojo cercano

**PGS** – Cribado genético preimplantacional

**qRT-PCR** - Reacción cuantitativa en cadena de la polimerasa en tiempo real

**RNM** – Resonancia magnética nuclear

**TRA** – Técnicas de reproducción asistida

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. Huo P, Zhu Y, Liang C, Yao J, Le J, Qin L, et al. Non-invasive Amino Acid Profiling of Embryo Culture Medium Using HPLC Correlates With Embryo Implantation Potential in Women Undergoing in vitro Fertilization. *Front Physiol.* 2020;11:405.
2. Calomarde González C, Carmona Saborido L, Guerra Juan I, Gutiérrez Pascual D, Santana Martín A, Domingo del Pozo J. Técnicas invasivas y no invasivas en el diagnóstico de embriones humanos. *Rev IBEROAMERICANA Fertil Y Reprod ASISTIDA.* 2016;33:67-72.
3. Zmuidinaite R, Sharara FI, Iles RK. Current advancements in noninvasive profiling of the embryo culture media secretome. *International Journal of Molecular Sciences.* MDPI AG. 2021;22:1-13.
4. Sallam HN, Sallam NH, Sallam SH. Non-invasive methods for embryo selection. *Facts, views Vis ObGyn.* 2016;8(2):87-100.
5. D'Souza F, Uppangala S, Asampille G, Salian SR, Kalthur G, Talevi R, et al. Spent embryo culture medium metabolites are related to the in vitro attachment ability of blastocysts. *Sci Rep.* 2018;8(1).
6. Rødgaard T, Heegaard PMH, Callesen H. Non-invasive assessment of in-vitro embryo quality to improve transfer success. *Reproductive BioMedicine Online.* Elsevier Ltd. 2015;31:585-92.
7. Alfaro J, Bustamante P, Duarte A, Fern[andez P, Nuñez S, Zúñiga J. Utilización de marcadores bioquímicos como método no invasivo en la determinación de la viabilidad embrionaria en Fertilización In-Vitro. *Rev Cienc y Salud Integr Conoc.* 2019;3(5):18-19.
8. Rio P Del, Madan P. Does miRNA Expression in the Spent Media Change During Early Embryo Development? *Front Vet Sci.* 2021;8:658968.

9. Cimadomo D, Rienzi L, Giancani A, Alviggi E, Dusi L, Canipari R, et al. Definition and validation of a custom protocol to detect miRNAs in the spent media after blastocyst culture: Searching for biomarkers of implantation. *Hum Reprod.* 2019;34(9):1746-61.
10. Fang F, Li Z, Yu J, Long Y, Zhao Q, Ding X, et al. MicroRNAs secreted by human embryos could be potential biomarkers for clinical outcomes of assisted reproductive technology. *J Adv Res.* 2021;31:25-34.
11. Montskó G, Zrínyi Z, Várnagy Á, Bódis J, Kovács GL. Non-Invasive Assessment of the Embryo Viability via the Analysis of the Culture Media. En: *Embryo Cleavage.* Hungry InTech; 2017. p.82-92.
12. Rodríguez Díaz R, Blanes Zamora R, Vaca Sánchez R, González Pérez J, Alberto Bethencourt JC. Embryo sHLA-G secretion is related to pregnancy rate. *Zygote.* 2019;27(2):78-81.
13. Montskó G, Zrínyi Z, Janáky T, Szabó Z, Várnagy Á, Kovács GL, et al. Noninvasive embryo viability assessment by quantitation of human haptoglobin alpha-1 fragment in the in vitro fertilization culture medium: An additional tool to increase success rate. *Fertil Steril.* 2015;103(3):687-93.
14. Kaihola H, Yaldir FG, Bohlin T, Samir R, Hreinsson J, Åkerud H. Levels of caspase-3 and histidine-rich glycoprotein in the embryo secretome as biomarkers of good-quality day-2 embryos and high-quality blastocysts. *PLoS One.* 2019;14(12):e0226419.
15. Dominguez F, Meseguer M, Aparicio-Ruiz B, Piqueras P, Quiñonero A, Simón C. New strategy for diagnosing embryo implantation potential by combining proteomics and time-lapse technologies. *Fertil Steril.* 2015;104(4):908-14.
16. Ramos-Ibeas P, Gimeno I, Cañón-Beltrán K, Gutiérrez-Adán A, Rizos D, Gómez E. Senescence and Apoptosis During in vitro Embryo Development in a Bovine Model. *Frontiers in Cell and Developmental Biology.* Frontiers Media S.A. 2020;8:1646.
17. Capalbo A, Ubaldi FM, Cimadomo D, Noli L, Khalaf Y, Farcomeni A, et al. MicroRNAs

in spent blastocyst culture medium are derived from trophoctoderm cells and can be explored for human embryo reproductive competence assessment. *Fertil Steril.* 2016;105(1):225-235.e3.

18. Abu-Halima M, Häusler S, Backes C, Fehlmann T, Staib C, Nestel S, et al. Micro-ribonucleic acids and extracellular vesicles repertoire in the spent culture media is altered in women undergoing In Vitro Fertilization. *Sci Rep.* 2017;7(1):1-11.
19. Iles RK, Sharara FI, Zmuidinaite R, Abdo G, Keshavarz S, Butler SA. Secretome profile selection of optimal IVF embryos by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Assist Reprod Genet* 2019 366. 2019;36(6):1153-60.
20. Bracewell-Milnes T, Saso S, Abdalla H, Nikolau D, Norman-Taylor J, Johnson M, et al. Metabolomics as a tool to identify biomarkers to predict and improve outcomes in reproductive medicine: A systematic review. *Hum Reprod Update.* 2017;23(6):723-36.