

**PREDICCIÓ ALGORÍTMICA D'EMBRIONS ANEUPLOIDES vs.  
NASCUTS BASADA EN PARÀMETRES MORFOCINÈTICS**

**Mikaela Mladenova Koleva**

**TREBALL DE FI DE GRAU**

**Grau de Biotecnologia**

**Tutora acadèmica:** Maria Teresa Blay Olivé

**En cooperació amb:** Institut Conceptum

**Supervisor:** Enric Güell Penas

Juny 2021

Jo, Mikaela Mladenova Koleva , amb NIE X4782645W, soc coneixedora de la guia de prevenció del plagi a la URV Prevenció, detecció i tractament del plagi en la docència: guia per a estudiants (aprovada el juliol 2017) <http://www.urv.cat/ca/vidacampus/serveis/crai/que-us-oferim/formacio-competencies-nuclears/plagi/>) i afirmo que aquest TFG no constitueix cap de les conductes considerades com a plagi per la URV.

Tarragona, 7 de juny de 2021

A handwritten signature in black ink, consisting of several fluid, connected strokes that form a stylized representation of the author's name.

(signatura)

Treball realitzat a partir dels resultats cedits per l'Institut de Fertilitat i Reproducció Humana Conceptum (Reus, Tarragona), on havia d'iniciar un període de pràctiques extracurriculars, sota la tutorització i supervisió d'Enric Güell Penas, director del Laboratori d'Embriologia.



# ÍNDIX

DADES DEL CENTRE .....	VI
ABREVIATURES .....	VII
RESUM.....	8
1. INTRODUCCIÓ.....	9
1.1. Tècniques de reproducció assistida .....	9
1.2. Mètodes convencionals d'avaluació de la qualitat embrionària.....	10
1.2.1. Valoració morfològica .....	10
1.2.2. Diagnòstic genètic preimplantacional .....	10
1.3. Tecnologia <i>time-lapse</i> i paràmetres morfocinètics .....	11
1.4. Paràmetres d'exclusió embrionària .....	13
1.5. Intel·ligència artificial .....	14
1.5.1. Tipus d'algoritmes predictius .....	14
1.5.1.1. <i>Model lineal general</i> .....	15
1.5.1.2. <i>Random forest</i> .....	15
1.5.1.3. <i>Gradient boosting machine</i> .....	16
1.5.1.4. <i>Extreme gradient boosting</i> .....	17
1.5.1.5. <i>k-nearest neighbors</i> .....	17
1.5.1.6. <i>Xarxa neuronal artificial</i> .....	18
1.5.2. Validació creuada dels resultats estadístics .....	18
1.5.3. Mesures d'avaluació del model predictiu.....	20
1.5.3.1. <i>Matriu de confusió</i> .....	20
1.5.3.2. <i>Mètriques derivades de la matriu de confusió</i> .....	21
1.5.3.3. <i>Corba característica operativa del receptor i àrea sota la corba</i> .....	22
2. HIPÒTESI I OBJECTIUS .....	24
2.1. Hipòtesi .....	24
2.2. Objectius .....	24
3. MATERIALS I MÈTODES .....	25
3.1. Obtenció d'òocits i espermatozoides.....	25
3.2. Fecundació.....	25
3.3. Cultiu embrionari i monitorització per <i>time-lapse</i> .....	26
3.4. Recopilació i tractament de dades .....	26
3.5. Mida mostral.....	27
3.6. Valoració dels algoritmes predictius amb <i>V-fold cross-validation</i> .....	28
3.7. Validació del millor algoritme per <i>leave-one-out cross-validation</i> .....	28
4. RESULTATS.....	30
5. DISCUSSIÓ .....	35

6. CONCLUSIONS.....	38
7. BIBLIOGRAFIA.....	39
AUTOAVALUACIÓ .....	41
ANNEXOS .....	42

## DADES DEL CENTRE

L'Institut de Fertilitat i Reproducció Humana Conceptum va ser fundat el 1995 a Reus i constitueix la primera clínica de fertilitat de la Província de Tarragona. Inicialment, es va fundar la Clínica Ibarz el 1920 per part del Sr. Josep Ibarz Grao. La clínica estava dedicada principalment a assistir els naixements que tenien lloc a la província de Tarragona i a preservar la salut de les dones. Posteriorment, guiats per la motivació cap a la investigació, el procés i la innovació constant, es van anar incorporant noves tècniques de reproducció assistida que van portar a l'origen de la Clínica Conceptum.

La clínica compta amb un equip de professionals en el sector que està format per metges i ginecòlegs experts en fertilitat i diagnòstic prenatal, un embrióleg, un andròleg, una anestesista, una infermera de quiròfan, així com per personal de coordinació, gerència i administració.

A la Clínica de Fertilitat Conceptum s'ofereixen els millors tractaments i tècniques reproductives, tant per l'home com per la dona, que inclouen diagnòstics, tècniques de fecundació i tests de fertilitat i d'implantació embrionària.

Entre els serveis de diagnòstic es troben estudis dirigits a la qualitat i selecció dels espermatozoides (seminograma, test de selecció espermàtica i índex de fragmentació espermàtica, assaig COMET, anàlisi citogenètica (FISH) del contingut cromosòmic dels espermatozoides). Les tècniques de fecundació que s'apliquen són la inseminació artificial i la fecundació *in vitro* convencional o mitjançant microinjecció espermàtica. Addicionalment, la clínica ofereix la realització de tests diagnòstics per a l'avaluació de la fertilitat, tests genètics preimplantacionals, tests de compatibilitat genètica i tests de receptivitat de l'endometri.

## ABREVIATURES

ANN	Xarxa neuronal artificial (de l'anglès, <i>artificial neural network</i> )
ASEBIR	Associació per a l'Estudi de la Biologia de la Reproducció
AUC	Àrea sota la corba (AUC; de l'anglès, <i>area under the curve</i> )
CV	<i>Cross-validation</i>
D+n	Dia <i>n</i> de cultiu
DGP	Diagnòstic genètic preimplantacional
FIV	Fecundació <i>in vitro</i>
FN	Fals negatiu (de l'anglès, <i>false negative</i> )
FNR	Taxa de falsos negatius (de l'anglès, <i>false negative rate</i> )
FP	Fals positiu (de l'anglès, <i>false positive</i> )
FPR	Taxa de falsos positius (de l'anglès, <i>false positive rate</i> )
FSH	Hormona estimulant del fol·licle
GBM	<i>Gradient boosting machine</i>
GLM	Model lineal general (de l'anglès, <i>generalized linear model</i> )
hCG	Gonadotropina coriònica humana
ICSI	Microinjecció espermàtica (de l'anglès, <i>intracytoplasmic sperm injection</i> )
KID	<i>Known implantation data</i>
kNN	<i>k-nearest neighbors</i>
LOOCV	<i>Leave-one-out cross-validation</i>
N/A	No disponible (de l'anglès, <i>not available</i> )
NPV	Valor predictiu negatiu (de l'anglès, <i>negative predictive value</i> )
NVS	Nascut viu sa
PPV	Valor predictiu positiu (de l'anglès, <i>positive predictive value</i> )
rF	<i>Random forest</i>
ROC	Característica operativa del receptor (ROC; de l'anglès, <i>receiver operating characteristic</i> )
SD	Desviació estàndard
TN	Veritable negatiu (de l'anglès, <i>true negative</i> )
TP	Veritable positiu (de l'anglès, <i>true positive</i> )
TNR	Taxa de veritables negatius (de l'anglès, <i>true negative rate</i> )
TPR	Taxa de veritables positius (de l'anglès, <i>true positive rate</i> )
XGBoost	<i>Extreme gradient boosting</i>

## RESUM

La reproducció assistida és una tecnologia que va sorgir l'any 1978 i ha permès la concepció en molts pacients amb problemes d'infertilitat. Les tècniques de reproducció assistida constitueixen totes les intervencions que inclouen la manipulació de gàmetes, amb la finalitat d'aconseguir la reproducció. Actualment, el mètode de validació dels embrions originats per fecundació *in vitro* (FIV) consisteix en l'avaluació morfològica i en el diagnòstic genètic preimplantacional (DGP), essent ambdues tècniques altament invasives. A més, l'avaluació morfològica està subjecta al criteri de cada embriòleg, dificultant la possibilitat d'establir un criteri uniforme i universal. És per això que sorgeix la necessitat de desenvolupar un mètode objectiu i reproduïble per a la classificació embrionària segons la seva capacitat d'implantació. L'enfoc actual regeix en la implementació de la intel·ligència artificial gràcies a la introducció del sistema *time-lapse*, una tecnologia de monitorització embrionària no invasiva que permet obtenir una gran quantitat de paràmetres morfocinètics del desenvolupament embrionari. Aquest estudi retrospectiu pretén confeccionar un algoritme predictiu basat en les variables morfocinètiques fins a dia 3 (D+3) de cultiu capaç de discernir entre la condició embrionària d'aneuploïdia i de nascut viu sa. S'han utilitzat 171 embrions procedents de 85 cicles de FIV, dels quals 84 són aneuploides diagnosticats per DGP i 87 són embrions nascuts vius sans amb *known implantation data*. El model predictiu resultant es va crear per un algoritme de *machine learning*, el *gradient boosting machine*, a partir de quatre variables morfocinètiques, que inclouen t4-t2, t4-t3, t8-t4 i t8-t5. Aquest model és capaç de classificar els embrions en aneuploides i nascuts amb una exactitud del 73,68% quan s'aplica una *V-fold cross-validation* i una exactitud del 70,76% mitjançant una *leave-one-out cross-validation*. Els resultats obtinguts són prometedors, confirmant la gran utilitat del model predictiu en la presa de decisions a D+3 prèvia a la transferència embrionària de forma prospectiva.

**Paraules clau:** *time-lapse* · aneuploide · nascut viu sa · morfocinètica · algoritme predictiu



## 1. INTRODUCCIÓ

### 1.1. Tècniques de reproducció assistida

La infertilitat es defineix com una malaltia caracteritzada per la impossibilitat d'establir un embaràs clínic després d'un període de 12 mesos de relacions sexuals regulars i sense protecció. Actualment, l'estimació de població afectada arreu del món és d'entre 8-12% aproximadament, que significa al voltant de 186 milions de persones, tant homes com dones, que pateixen d'infertilitat. La insuficiència ovàrica prematura, la síndrome de l'ovari poliquístic, l'endometriosi, els fibromes uterins i els pòlips endometrials són les condicions determinants més comunes de la infertilitat femenina. D'altra banda, la infertilitat masculina pot estar deguda a deficiències tant testiculars com post-testiculars (Vander Borgh i Wyns, 2018).

Moltes causes d'infertilitat s'han aconseguit combatre gràcies al desenvolupament de la reproducció assistida, que marca el seu origen l'any 1978. Les tècniques de reproducció assistida constitueixen totes les intervencions que inclouen la manipulació de gàmetes, amb la finalitat d'aconseguir la reproducció. S'inclouen les tècniques d'inseminació artificial, fecundació *in vitro* (FIV), la biòpsia embrionària i el posterior diagnòstic genètic preimplantacional (DGP), la transferència embrionària i la criopreservació de gàmetes i embrions, entre d'altres (De Geyter, 2019). La FIV, al seu torn, engloba un conjunt de tècniques que comparteixen la mateixa finalitat, la fertilització mitjançant la unió d'un òvul i un espermatozoide al laboratori. D'una banda, la FIV convencional consisteix a incubar un òvul amb una mostra de semen per tal de simular la fecundació natural. D'altra banda, la injecció espermàtica intracitoplasmàtica (ICSI; de l'anglès, *intracytoplasmic sperm injection*) consisteix a injectar únicament un espermatozoide directament al citoplasma de l'òvul mitjançant una micropipeta (Johnson, 2019).

En cada cicle de FIV es produeixen diversos embrions, ja que no tots arriben a ser evolutius o a desenvolupar-se correctament, o bé, presenten anomalies morfològiques que impedeixen la seva transferència. Per aquest motiu, és de crucial importància seleccionar només els embrions més viables per a la transferència. La morfocinètica, és a dir, l'anàlisi del temps de les divisions i processos d'escissió com la compactació i la cavitació suposa un millor coneixement del comportament embrionari durant el desenvolupament preimplantacional i suposen un nou mètode d'avaluació de la qualitat embrionària (Milewski i Ajduk, 2017).

## 1.2. Mètodes convencionals d'avaluació de la qualitat embrionària

### 1.2.1. Valoració morfològica

La valoració embrionària morfològica es basa en l'observació i consideració conjunta de diverses característiques en diferents etapes del desenvolupament embrionari. Les característiques observades per a la determinació de la qualitat embrionària inclouen el nombre de pronuclis i corpuscles polars, el nombre de cèl·lules o blastòmers, la mida, la forma, l'existència de multinucleació, el percentatge i tipus de fragmentació cel·lular, el gruix de la zona pel·lúcida i el grau de compactació. Per a cada paràmetre avaluat, s'estableixen 4 categories segons la classificació embrionària de l'Associació per a l'Estudi de la Biologia de la Reproducció (ASEBIR). En la categoria A es classifiquen els embrions amb màxim potencial d'implantació, la categoria B correspon a embrions d'elevada capacitat d'implantació, en la categoria C s'inclouen els embrions de potencial d'implantació baix i la categoria D inclou els embrions de capacitat d'implantació deficient. Després de l'avaluació de tots els paràmetres i la classificació embrionària, s'analitza la puntuació total del conjunt de paràmetres morfològics. Els embrions amb un major nombre de categories A es prioritzen per a la transferència, ja que prometen una capacitat d'implantació més elevada (Hurtado de Mendoza i Cuadros, 2015).

Actualment, la classificació embrionària basada en la valoració morfològica és una tècnica clau per a la determinació de la qualitat embrionària requerida per a la transferència. No obstant això, es tracta d'un procediment subjectiu que genera resultats esbiaixats entre centres de reproducció, impeding l'existència d'un consens universal en la determinació de la qualitat embrionària. A més, la valoració morfològica implica la disrupció repetida de les condicions òptimes de cultiu, interferint així en el correcte desenvolupament embrionari. Aquestes evidències suggereixen la necessitat d'un mètode predictiu reproduïble. L'actual repte en l'àmbit de la reproducció assistida és desenvolupar un sistema precís, objectiu i no invasiu per a la classificació dels embrions amb una garantia de fiabilitat en els resultats (Rocha *et al.*, 2016).

### 1.2.2. Diagnòstic genètic preimplantacional

El DGP és un test destinat a la detecció d'anomalies cromosòmiques durant les etapes primerenques del desenvolupament embrionari. El procés consisteix en l'aspiració d'una o més cèl·lules d'un embrió obtingut mitjançant un tractament de FIV i la posterior anàlisi genètica, permetent la detecció de múltiples malalties genètiques hereditàries. Actualment, existeixen DGP específics orientats exclusivament a la diagnosi de l'estat

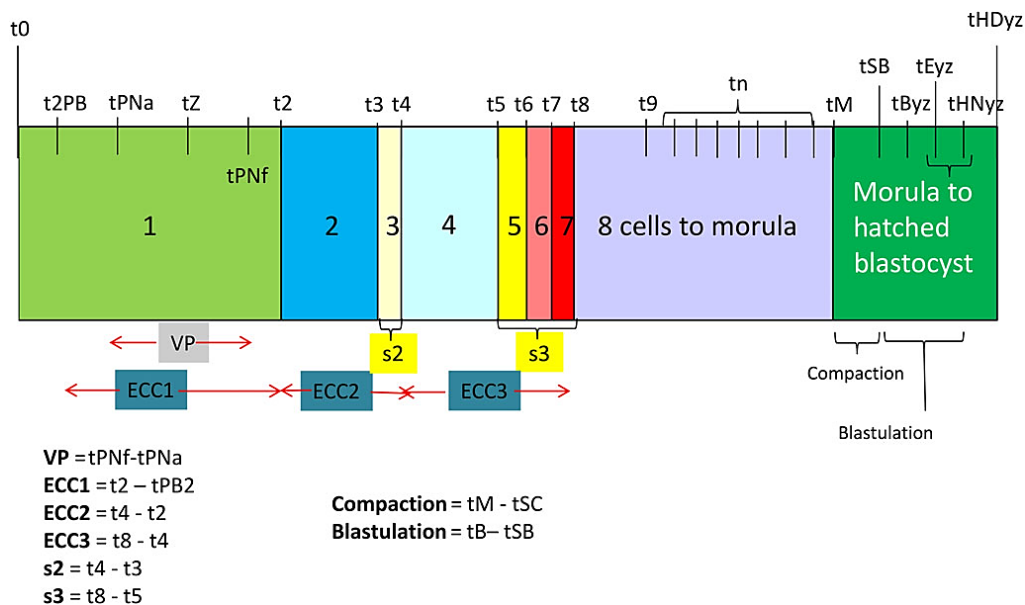
d'aneuploïdia. En aquest cas, s'analitza el contingut cromosòmic complet de les cèl·lules embrionàries procedents de la biòpsia. D'aquesta manera, si només es transfereixen els embrions cromosòmicament normals, augmentarien les possibilitats d'aconseguir un embaràs saludable i un individu nascut viu sa (NVS) (Sciorio *et al.*, 2020).

A pesar dels beneficis que ofereix el DGP, els mètodes actuals són altament invasius, ja que impliquen l'eliminació de cèl·lules dels embrions, cosa que podria influir en les taxes d'embaràs exitós (Lundin i Park, 2020).

### 1.3. Tecnologia *time-lapse* i paràmetres morfocinètics

La tecnologia *time-lapse* és una eina innovadora que permet integrar unes condicions de cultiu embrionari més estables juntament amb una alternativa no invasiva d'avaluació dels embrions. El *time-lapse* implica la captura contínua d'imatges i s'ha implementat a les tècniques de reproducció assistida durant l'última dècada. S'ha suggerit que els patrons temporals determinats per *time-lapse* poden ser indicatius de l'estat cromosòmic de l'embrió i que es podrien desenvolupar algorismes per a la predicció d'un embrió euploide. La monitorització del comportament dels embrions, en combinació amb anàlisis genètiques i/o metabòliques, podria implicar un avenç en la selecció i la classificació dels embrions (Lundin i Park, 2020).

El desenvolupament embrionari és un esdeveniment dinàmic, en el qual tenen lloc una sèrie de successos tant transitoris com permanents, incloent l'aparició i desaparició de pronuclis després de la fecundació, diversos cicles cel·lulars fins arribar a l'estat de mòrula i compactació, entre d'altres. Aquests esdeveniments, així com la seva durada, determinaran la viabilitat i qualitat embrionària. La contínua monitorització que ofereix el *time-lapse* permet determinar el moment en què es produeix cadascun d'aquests esdeveniments, donant lloc a la definició dels paràmetres morfocinètics (*t-times*) (Ciray *et al.*, 2014). L'ordre en què tenen lloc els diferents successos del desenvolupament embrionari es troben representats a la Figura 1 i el seu significat biològic es detalla a la Taula 1.



**Figura 1.** Eix cronològic dels paràmetres morfocinètics (*t-times*) típicament anotats a partir de la monitorització amb *time-lapse*. [Extret de: Ciray *et al.* (2014)]

**Taula 1.** Paràmetres morfocinètics embrionaris, denominats com *t-times*, comunament anotats a partir de la monitorització amb *time-lapse* i el seu significat segons la nomenclatura de Ciray *et al.* (2014) basada en les característiques morfològiques apreciades en cadascun.

Paràmetre	Significat
t0	Temps en què es realitza la fecundació <i>in vitro</i> (ICSI o IMSI).
tPB2	Moment en què el segon corpuscle polar està completament separat de l'oolema (és a dir, la membrana que recobreix l'òvul, delimitant-ne l'oooplasma).
tPNa	Temps en què apareix el primer pronucli.
tPNf	Temps en què comencen a desaparèixer els pronuclis.
tZ	Temps en què els pronuclis han desaparegut completament.
it2	Temps en què s'inicia el primer cycle de divisió mitòtica.
t2	Moment en què es produeix i finalitza la primera divisió mitòtica. S'observen dues cèl·lules completament separades i es dona inici al segon cycle cel·lular.
tNaCC2	Temps en què apareix el primer nucli interfàsic. Una de les cèl·lules del t2 acostuma a presentar el nucli abans que l'altra.
tNfCC2	Temps en què comencen a desaparèixer els nuclis de les dues cèl·lules de t2. Es considera quan un dels dos comença a esvair-se per tal d'iniciar la segona divisió mitòtica, corresponent al segon cycle cel·lular.
t3	Temps en què la primera cèl·lula de t2 es divideix i dona lloc a la tercera cèl·lula de l'embrió.
t4	Temps en què la segona cèl·lula de t2 es divideix (tercera divisió mitòtica) i dona lloc a la quarta cèl·lula de l'embrió. En aquest moment, es completa el segon cycle cel·lular i comença el tercer cycle cel·lular.
tNaCC3	Temps en què apareix el nucli interfàsic de la primera d'entre les quatre cèl·lules presents.

**Taula 1 (continuació).** Paràmetres morfocinètics embrionaris, denominats com *t-times*, comunament anotats a partir de la monitorització amb *time-lapse* i el seu significat segons la nomenclatura de Ciray *et al.* (2014) basada en les característiques morfològiques apreciades en cadascun.

Paràmetre	Significat
tNfCC3	Temps en què comencen a desaparèixer els nuclis de les dues cèl·lules de t4. Es considera quan un dels quatre comença a esvair-se per tal d'iniciar la quarta divisió mitòtica, corresponent al tercer cicle cel·lular.
t5	Temps en què es dona lloc a la cinquena cèl·lula de l'embrió. Normalment, la cinquena cèl·lula apareix com a conseqüència de la divisió mitòtica de la tercera cèl·lula.
t6	Temps en què es dona lloc a la sisena cèl·lula de l'embrió després de la cinquena divisió mitòtica.
t7	Temps en què es dona lloc a la setena cèl·lula de l'embrió després de la sisena divisió mitòtica.
t8	Temps en què es dona lloc a la vuitena cèl·lula de l'embrió després de la setena divisió mitòtica.
t9	Temps en què es dona lloc a la novena cèl·lula de l'embrió després de la vuitena divisió mitòtica.
tSC	Moment en què es comença a evidenciar la compactació de l'embrió per a la formació de la mòrula.

#### 1.4. Paràmetres d'exclusió embrionària

El ritme de divisió de les cèl·lules de l'embrió és un factor determinant per a la qualitat del mateix. D'una banda, les divisions que es produeixen massa ràpid poden implicar una segregació incorrecta del material genètic i donar lloc a embrions aneuploides. D'altra banda, les divisions que es perllonguen durant un llarg període de temps poden ser indicatives de dany al DNA o d'aberracions cromosòmiques i causar l'activació d'un punt de control de cicle cel·lular que promou l'aturament del cicle cel·lular. L'estat d'aneuploidia de l'embrió en estadi d'1 a 8 cèl·lules afecta, com a mínim, un temps de divisió (Milewski i Ajduk, 2017). A banda de la diferència en la durada del cicle cel·lular complet, altres paràmetres com la durada de la primera citocinesi, el segon període de sincronicitat (t4-t3) i l'interval t5-t2, entre d'altres, condicionen l'existència de blastòmers aneuploides (Chavez *et al.*, 2012). És per aquest motiu que la monitorització per *time-lapse* dels paràmetres morfocinètics està guanyant importància a l'hora de determinar la qualitat embrionària prèvia a la transferència.

## 1.5. Intel·ligència artificial

La selecció embrionària prèvia a la transferència és crucial en l'àmbit de la FIV. Els mètodes actuals de selecció d'embrions competents, generalment, es basen únicament en l'avaluació morfològica durant els diferents estadis de desenvolupament embrionari. No obstant, aquesta avaluació està subjecta a una elevada variabilitat entre centres, depenent del criteri de l'embrióleg. La intel·ligència artificial representa una de les eines més prometedores i objectives per a la selecció d'embrions i la predicció de l'embaràs (Zaninovic i Rosenwaks, 2020).

### 1.5.1. Tipus d'algoritmes predictius

Actualment, existeixen diversos models de predicció estadística basats en paràmetres morfocinètics a partir de dades embrionàries obtingudes per *time-lapse*. Els paràmetres morfocinètics de l'embrió estan correlacionats amb la seva capacitat d'implantació i es poden utilitzar com a potencials predictors de la qualitat embrionària. Els diferents algoritmes d'intel·ligència artificial es basen en mecanismes diferents de generació del model predictiu de les categories desitjades. Generalment, els algoritmes predictius requereixen dos grups d'estudi per a la generació del model. D'una banda, es necessita un grup d'entrenament (*train*) per tal d'establir unes normes per a la categorització de les mostres en funció d'un conjunt de variables. D'altra banda, el model s'ha d'avaluar amb un grup de prova (*test*) abans de poder ser utilitzat amb les mostres de categoria desconeguda que es volen predir. L'entrenament del model consisteix en un mecanisme d'aprenentatge supervisat, en què el resultat categòric es proporciona durant el procés d'entrenament del model per tal d'avaluar-ne el poder predictiu (Zaninovic i Rosenwaks, 2020).

Els algoritmes d'intel·ligència artificial es poden classificar en dos tipus. D'una banda, existeix el *machine learning*, en el qual s'inclouen algoritmes com la regressió lineal, la generació d'arbres de decisió o la classificació segons la similitud amb mostres properes. D'altra banda, s'ha desenvolupat el *deep learning*, un mètode d'aprenentatge automàtic que inclou bàsicament els models basats en xarxes neuronals. A continuació, es detallen alguns dels algoritmes predictius més àmpliament utilitzats.

### 1.5.1.1. Model lineal general

El model lineal general (GLM; de l'anglès, *generalized linear model*) constitueix una aproximació compacta per tal d'incloure diversos models de regressió múltiple alhora. Això és possible mitjançant la generació d'una equació pròpia d'un model lineal en forma de matriu (Figura 2), on cada fila és una mostra diferent del conjunt de dades i cada columna de *input* és l'efecte d'una variable. D'aquesta manera, es pot predir la classe d'*output* d'una mostra de categoria desconeguda a partir dels valors que prenen les variables independents (Poline i Brett, 2012).

$$y_i = \beta_0 x_{0i} + \beta_1 x_{1i} + \epsilon_i \longrightarrow \begin{bmatrix} y_1 \\ y_2 \\ y_3 \\ y_4 \\ y_5 \\ y_6 \\ y_7 \\ y_8 \\ y_9 \end{bmatrix} = \beta_0 \begin{bmatrix} 1 \\ 1 \\ 1 \\ 1 \\ 1 \\ 1 \\ 1 \\ 1 \\ 1 \end{bmatrix} + \beta_1 \begin{bmatrix} x_1 \\ x_2 \\ x_3 \\ x_4 \\ x_5 \\ x_6 \\ x_7 \\ x_8 \\ x_9 \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} \epsilon_1 \\ \epsilon_2 \\ \epsilon_3 \\ \epsilon_4 \\ \epsilon_5 \\ \epsilon_6 \\ \epsilon_7 \\ \epsilon_8 \\ \epsilon_9 \end{bmatrix}$$

**Figura 2.** Exemple de matriu de 9 mostres per a un GLM amb una variable independent. La categoria a predir de cada mostra s'engloba per l'*output*  $y_i$ . El terme  $\beta_0$  representa la intercepció, mentre que  $\beta_1$  és la pendent de la recta. La columna  $x$  fa referència a una variable independent. El terme  $\epsilon$  és l'error en cada regressió lineal. [Extret de: Poline i Brett (2012)]

Per a múltiples variables, l'equació del GLM es pot definir com:

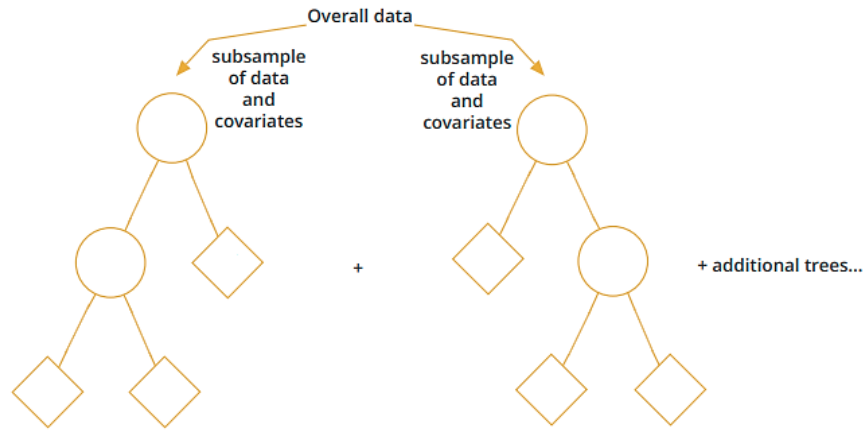
$$y_{ij} = \beta_{0j} + \beta_{1j} \cdot x_{i1} + \beta_{2j} \cdot x_{i2} + \dots + \beta_{kj} \cdot x_{ik} + \epsilon_{ij}$$

on cada observació o *output* s'indexa com  $i$ , mentre que el terme  $j$  es refereix al nombre de variables independents.

### 1.5.1.2. Random forest

L'algoritme *random forest* (rF) és un model algorítmic d'aprenentatge supervisat que es basa en el mètode d'acoblament d'arbres de decisió (Figura 3) per a generar un model de regressió. Un model de rF funciona mitjançant la construcció de diversos arbres de decisió amb diferents conjunts de dades de la mateixa mida ( $n$ ) que la base de dades original. Això s'aconsegueix mitjançant la selecció aleatòria d'un conjunt de dades de la base de dades inicial amb la possibilitat de seleccionar una mostra diverses vegades. A cada nivell de l'arbre, es trien només dues variables independents de forma aleatòria. La variabilitat de combinacions possibles i la seva consideració simultània dona una major efectivitat al model que en el cas d'arbres de decisió individuals. Un cop creat el rF, on els diferents arbres generats es situen en paral·lel sense interacció entre ells, es

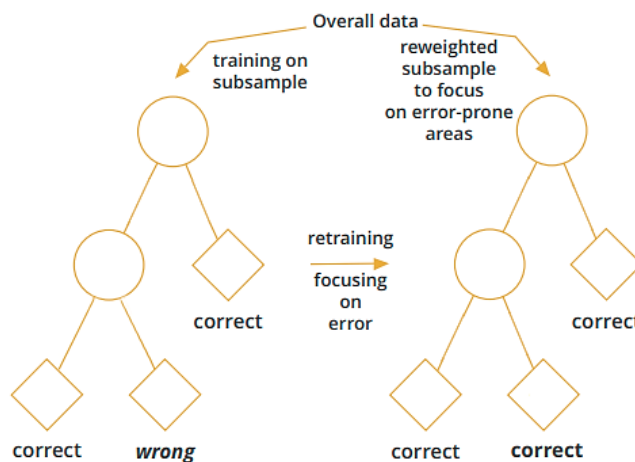
procedeix a entrenar el model amb la resta de dades que no s'ha utilitzat per a la creació del model. Durant el temps d'entrenament, es genera la mitjana de les classes que han estat resultat de la predicció de cadascun dels arbres. Un model de rF serà vàlid si prediu correctament les dades no incloses en la generació del propi model (Sarica *et al.*, 2017).



**Figura 3.** Principi de l'algorisme rF. Diversos arbres de decisió independents constitueixen el model predictiu. Els cercles indiquen les variables independents que condicionen l'*outcome*, indicat amb quadrats. En aquest exemple, hi ha 3 categories diferents. [Extret i adaptat de: Doupe *et al.* (2019)]

### 1.5.1.3. Gradient boosting machine

L'algorisme *gradient boosting machine* (GBM) es basa en la creació d'arbres de decisió per a la predicció d'una categoria (*output*). És un algorisme similar a rF, però cada nou arbre es genera específicament per tal de millorar la predicció agregada de totes les dades respecte a l'arbre anterior, en lloc de generar-los independentment (Figura 4). Aquesta generació seqüencial d'arbres de decisió constitueix un tipus d'aprenentatge supervisat, és a dir, el resultat categòric es proporciona durant el procés d'entrenament del model (Patel *et al.*, 2018).



**Figura 4.** Principi de l'algorisme GBM. Cada arbre de decisió representa una versió millorada de l'anterior. Els cercles indiquen les variables independents que condicionen l'*outcome*, indicat amb quadrats. En aquest exemple, hi ha 3 categories diferents [Extret i adaptat de: Doupe *et al.* (2019)]



#### 1.5.1.4. *Extreme gradient boosting*

L'algoritme *extreme gradient boosting* (XGBoost) crea el model de predicció en base a un únic arbre de decisions, el qual es genera per regressió. L'arbre de decisions comença amb la consideració d'una variable independent i es poden afegir diverses a mesura que l'arbre creix. Per a una variable independent, s'estableix un llindar per a la variable de resposta (*outcome*), que constitueix una predicció inicial. D'aquesta manera, les mostres que tinguin un valor major que el llindar, prendran un valor positiu, mentre que les mostres amb un valor inferior, tindran un valor negatiu. Amb el llindar establert, es calculen els residuals per a cada mostra (Chen i Guestrin, 2016). Posteriorment, es calcula una puntuació de similitud de l'arrel de l'arbre, anomenada *similarity score*:

$$similarity\ score = \frac{(suma\ de\ residuals)^2}{n^{\circ}\ de\ residuals}$$

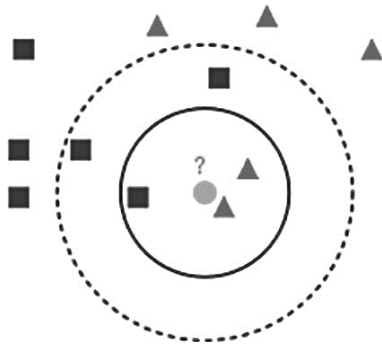
Seguidament, es comencen a crear les branques de l'arbre, establint diferents llindars de la variable independent en qüestió. D'aquesta manera, les mostres es divideixen en dos grups i es calcula novament la *similarity score* per a cada branca (Chen i Guestrin, 2016). Quan s'han determinat les puntuacions per a diferents llindars de la variable independent, es tria entre el llindar que ofereix millors resultats mitjançant el paràmetre *gain*:

$$gain = similarity_{branca\ esquerra} + similarity_{branca\ dreta} - similarity_{arrel}$$

D'aquesta manera, es va construir un arbre de regressió amb la possibilitat d'incloure múltiples variables a considerar mitjançant un aprenentatge supervisat del model (Chen i Guestrin, 2016).

#### 1.5.1.5. *k-nearest neighbors*

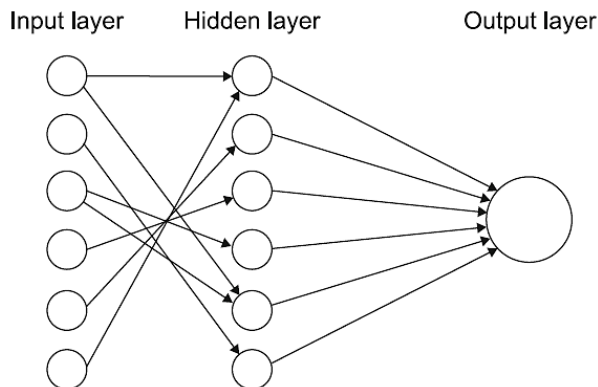
L'algoritme *k-nearest neighbors* (kNN) es basa en la classificació de les mostres sense etiqueta, és a dir, sense una categoria establerta en base a la seva similitud respecte a les mostres amb classe coneguda que es troben més a prop, anomenades veïns (Figura 5). Per tant, com més similars siguin els paràmetres d'una mostra desconeguda als paràmetres de les mostres del grup d'entrenament, més probabilitat hi ha que la mostra desconeguda sigui de la mateixa classe. Aquesta similitud es determina mitjançant una mesura de distància específica entre la mostra del grup *test* i les mostres que conformen el grup *train* (Abu Alfeilat *et al.*, 2019).



**Figura 5.** Classificació mitjançant kNN amb  $k = 3$  veïns (cercle de línia contínua) i  $k = 5$  (cercle de línia discontinua). Els triangles representen les mostres d'un grup *train* que pertany a la classe 1, mentre que els quadrats representen les mostres d'un grup *train* de la classe 2. El cercle és la mostra de categoria desconeguda a predir mitjançant l'algorisme en funció de la distància amb els veïns més propers. [Extret de: Abu Alfeilat *et al.* (2019)]

#### 1.5.1.6. Xarxa neuronal artificial

El model de xarxa neuronal artificial (ANN; de l'anglès, *artificial neural network*) es basa en la simulació d'una xarxa neuronal biològica, tal i com el seu nom indica. En aquest model, cada neurona està connectada amb altres neurones. Es poden distingir dues parts en les neurones. Les dendrites actuen com a receptors d'informació, mentre que els axons són els transmissors d'informació. La informació que es transmet d'unes neurones a unes altres es troba al nucli de cadascuna. Seguint aquest principi, les ANN consisteixen en una capa d'entrada (*input*), diverses capes ocultes i una capa de sortida (*output*) (Figura 6). Les ANN presenten un avantatge respecte els models de regressió logística, ja que són capaces de predir una relació complexa entre variables que condicionen un determinat *output* (Renganathan, 2019).

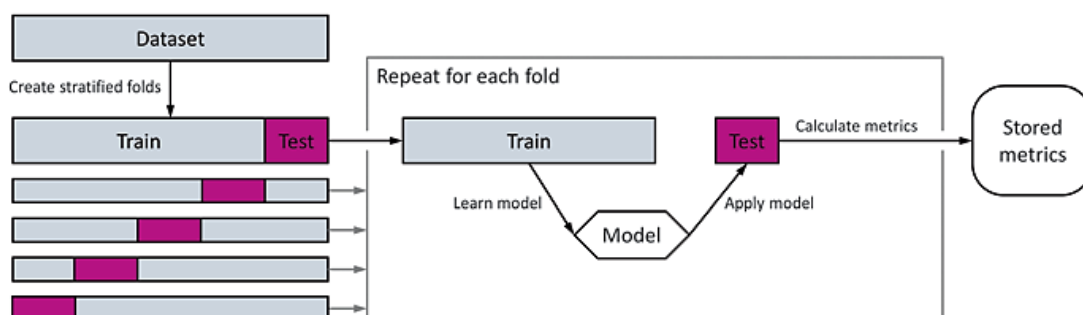


**Figura 6.** Representació de l'estructura d'una ANN. Cada cercle indica una neurona. la informació s'introdueix al model a través de la capa d'entrada, es processa a través de les capes ocultes i s'acaba donant lloc a una resposta a través de la capa de sortida. [Extret de: Renganathan (2019)]

#### 1.5.2. Validació creuada dels resultats estadístics

La validació creuada, la qual va sorgir l'any 1974, s'ha utilitzat extensament com una forma efectiva de validació dels models algorítmics. Actualment, han sorgit diferents

variacions de la validació creuada, però totes tenen la mateixa base teòrica. El mètode general es defineix com *k-fold cross-validation* (CV) (Figura 7), on el conjunt total de les dades es divideix de forma aleatòria en  $k$  parts uniformes. Posteriorment, el model predictiu s'elabora mitjançant un conjunt de dades,  $k-1$ , que constitueix el grup d'entrenament. El poder de predicció del model creat s'avalua amb la porció  $k$  que no s'ha inclòs en el model, la qual constitueix el grup de test, per tal d'analitzar la proporció de prediccions encertades. El procés es repeteix diverses vegades canviant la divisió aleatòria de  $k$  parts. El millor model d'entre totes les iteracions s'escull en base a un paràmetre d'error de predicció (Jung i Hu, 2016). L'avantatge d'aquest tipus de validació creuada és que no es repeteix cap valor de les dades en cada nou grup de test (Dankers *et al.*, 2018).



**Figura 7.** Esquema del funcionament del model de validació *k-fold* CV. [Extret de: Dankers *et al.* (2018)]

· *V-fold cross-validation*

En la *V-fold* CV, les dades es divideixen en 5 grups equilibrats. En aquesta variació, el model es construeix amb 4/5 parts de les dades i s'avalua amb la cinquena part restant (Petersen *et al.*, 2016).

· *Leave-one-out cross-validation*

La *leave-one-out* CV (LOOCV) consisteix a crear un model predictiu a partir de totes les dades excepte una, és a dir,  $n-1$ . El model s'avalua mitjançant la predicció de la classe de l'element restant. Aquesta aproximació requereix que les dades introduïdes com a *input* estiguin balancejades entre les categories d'*output*. En cas contrari, es podria donar lloc a un biaix en el resultat, creant una tendència cap a la predicció de la classe majoritària (Poldrack, 2019).

### 1.5.3. Mesures d'avaluació del model predictiu

El potencial d'un model predictiu s'avalua mitjançant el càlcul de mètriques de rendiment. Per tal de tenir validesa, el model elaborat ha de presentar una alta capacitat discriminatòria, de manera que les classes positives i negatives que representen l'*output* haurien de ser predites amb un baix marge d'error. No existeix cap mètrica que, per norma general, sigui millor per a l'avaluació del model, ja que depèn en gran mesura de les dades disponibles i de l'aplicació prevista del model (Dankers *et al.*, 2018). En aquest estudi, l'avaluació dels models predictius s'enfoca entorn a la matriu de confusió i les mètriques derivades, així com la corba característica operativa del receptor (ROC; de l'anglès, *receiver operating characteristic*) i àrea sota la corba (AUC; de l'anglès, *area under the curve*).

#### 1.5.3.1. *Matriu de confusió*

La matriu de confusió (Figura 8) és una eina crucial per a la determinació del potencial d'un model. A partir de la seva interpretació es determina el nombre de prediccions correctes i incorrectes, comparant-les amb les observacions reals. Hi ha 4 resultats possibles en la matriu de confusió. D'una banda, els veritables positius (TP; de l'anglès, *true positive*) són els casos de la classe positiva que es prediuen correctament, mentre que els falsos positius (FP; de l'anglès, *false positive*) són aquelles prediccions de la categoria positiva que no concorden amb la realitat observada. D'altra banda, els veritables negatius (TN; de l'anglès, *true negative*) són els casos de la classe negativa que es prediuen correctament, mentre que els falsos negatius (FN; de l'anglès, *false negative*) són aquelles prediccions de la categoria negativa que no concorden amb la realitat observada. La prevalença es defineix com el total d'observacions reals de la classe positiva respecte el nombre total d'observacions (Dankers *et al.*, 2018).

$$\text{Prevalença} = \frac{\text{TP} + \text{FN}}{\text{TP} + \text{TN} + \text{FP} + \text{FN}}$$

		Observació		
		Positiu	Negatiu	
Predicció	Positiu	Veritable positiu (TP)	Fals positiu (FP)	Valor predictiu positiu (PPV)
	Negatiu	Fals negatiu (FN)	Veritable negatiu (TN)	Valor predictiu negatiu (NPV)
		Sensibilitat	Especificitat	

**Figura 8.** Matriu de confusió per a l'avaluació de models predictius.

### 1.5.3.2. Mètriques derivades de la matriu de confusió

A partir d'aquests 4 resultats proporcionats per la matriu de confusió es poden calcular diverses mètriques detallades que proporcionaran informació addicional per a avaluar el poder predictiu d'un model establert (Dankers *et al.*, 2018).

#### · Exactitud

L'exactitud es defineix com la proporció de prediccions encertades, incloent tant els veritables positius com els veritables negatius. És una mètrica la validesa de la qual varia en funció de les dades. Per tal que indiqui una mesura real del poder d'un model, és necessari que les dades incloses en les diferents categories siguin balancejades (Dankers *et al.*, 2018).

$$\text{Exactitud} = \frac{\text{TP} + \text{TN}}{\text{TP} + \text{TN} + \text{FP} + \text{FN}}$$

#### · Valors predictius

Hi ha dos tipus de valors predictius. D'una banda, el valor predictiu positiu (PPV; de l'anglès, *positive predictive value*), també anomenat precisió, fa referència a la proporció de prediccions correctes de la classe positiva. D'altra banda, el valor predictiu negatiu (NPV; de l'anglès, *negative predictive value*) es refereix a la proporció de prediccions correctes de la classe negativa. Aquestes mètriques permeten comparar el nombre de prediccions encertades en funció del nombre total d'observacions i depenen de la prevalença en el conjunt de dades analitzades. D'aquesta manera, una prevalença elevada tindrà com a conseqüència un augment del PPV i una disminució de l'NPV (Dankers *et al.*, 2018).

$$\text{PPV} = \frac{\text{TP}}{\text{TP} + \text{FP}}$$

$$\text{NPV} = \frac{\text{TN}}{\text{TN} + \text{FN}}$$

#### · Sensibilitat i especificitat

La sensibilitat, també anomenada taxa de veritables positius (TPR; de l'anglès, *true positive rate*) o *recall* i l'especificitat o taxa de veritables negatius (TNR; de l'anglès, *true negative rate*) són mètriques que permeten avaluar el model predictiu quan s'utilitza de forma prospectiva per a la predicció de nous conjunts de dades (Dankers *et al.*, 2018).

$$\text{Sensibilitat o TPR} = \frac{TP}{TP + FN}$$

$$\text{Especificitat o TNR} = \frac{TN}{TN + FP}$$

Conseqüentment, es poden determinar la taxa de falsos positius (FPR; de l'anglès, *false positive rate*) i la taxa de falsos negatius (FNR; de l'anglès, *false negative rate*). Aquestes mètriques són les oposades a TNR i TPR, respectivament (Dankers *et al.*, 2018).

$$FNR = 1 - TPR = 1 - \text{sensibilitat}$$

$$FPR = 1 - TNR = 1 - \text{especificitat}$$

#### · F<sub>1</sub> score

L'*F<sub>1</sub> score* és una mètrica que combina ambdós PPV i TRP; però, a diferència de les dues mesures individualment, amb l'*F<sub>1</sub> score* es consideren tant els falsos positius com els falsos negatius alhora. Podria ser una mètrica substitutiva de l'exactitud en casos de desequilibri de mida mostral entre classes (Dankers *et al.*, 2018).

$$F_1 \text{ score} = \frac{2 \cdot PPV \cdot TPR}{PPV + TPR}$$

#### 1.5.3.3. Corba característica operativa del receptor i àrea sota la corba

La capacitat discriminatòria entre les classes establertes d'un model predictiu ve donada per un balanç entre la sensibilitat i l'especificitat, que es pot representar gràficament per mitjà d'una corba característica operativa del receptor (ROC; de l'anglès, *receiver operating characteristic*). La corba ROC es traça mitjançant diverses parelles de valors de sensibilitat i especificitat. Aquests valors s'aconsegueixen establint diversos llindars per tal d'ajustar les prediccions encertades cap a la classe positiva, o bé, cap a la classe negativa. Els valors de la sensibilitat i l'especificitat varien de forma compensatòria. D'aquesta manera, a llindars baixos s'augmenta el nombre de prediccions positives, disminuint el nombre de falsos negatius i causant un augment de la sensibilitat; però també es produeix un augment dels falsos positius, donant lloc a una especificitat més baixa. Per contra, augmentant el llindar s'aconsegueix disminuir la incidència de falsos positius, augmentant l'especificitat; però alhora s'incrementa el nombre de falsos negatius, provocant la disminució de la sensibilitat. Després de l'obtenció dels valors de sensibilitat i especificitat a diferents llindars, es representa la FPR (eix x) respecte la TPR (eix y), obtenint la corba ROC (Dankers *et al.*, 2018).

Per tal de poder interpretar la corba ROC, es calcula el valor d'AUC, donada per un rang entre 0 i 1. Com major sigui l'AUC, millor poder predictiu tindrà el model, indicant un major encert alhora de predir un integrant a l'atzar de la classe positiva (Dankers *et al.*, 2018).

## 2. HIPÒTESI I OBJECTIUS

### 2.1. Hipòtesi

L'observació d'un comportament morfocinètic diferent segons la condició d'aneuploïdia o NVS suggereix l'existència d'algoritmes capaços de predir la naturalesa inherent d'un embrió obtingut per tècniques de FIV abans de la seva transferència. Els algoritmes seran capaços d'establir la distinció de les dues categories embrionàries especificades en funció d'un conjunt de variables morfocinètiques anotades mitjançant la tecnologia del *time-lapse*. La capacitat predictiva d'aquests algoritmes proporcionarà assistència en la presa de decisions prèvia a la transferència embrionària. La confecció d'un bon model predictiu en funció de les seves mètriques suposarà una eina no invasiva essencial a l'hora de discernir entre els embrions de major qualitat, definits com aquells que presenten un potencial prometedor per arribar a néixer, tenint en compte exclusivament el seu ritme de desenvolupament i exclouent qualsevol factor extern, com la receptivitat de l'endometri, entre d'altres.

### 2.2. Objectius

L'objectiu principal d'aquest estudi és confeccionar un algoritme predictiu de la condició embrionària d'aneuploide o NVS a partir de variables morfocinètiques monitoritzades amb *time-lapse* mitjançant una anàlisi retrospectiva per tal de poder ser utilitzat amb una finalitat prospectiva.

Els objectius específics es detallen a continuació:

- Avaluar diversos algoritmes d'aprenentatge automàtic amb *V-fold CV* per tal de determinar aquell amb un major poder predictiu per tal de poder ser aplicat en embriologia.
- Definir les variables morfocinètiques fins a dia 3 (D+3) de cultiu que permeten una predicció més encertada de les categories establertes (aneuploide o NVS).
- Validar el model final mitjançant un mecanisme alternatiu (LOOCV) i determinar la validesa del model per a una aplicació prospectiva.



### 3. MATERIALS I MÈTODES

#### 3.1. Obtenció d'oòcits i espermatozoides

Per a l'obtenció d'oòcits, es realitza una estimulació ovàrica controlada mitjançant l'administració d'hormona estimulant del fol·licle (FSH) i gonadotropina coriònica humana (hCG), que garanteixen la presència d'una quantitat elevada d'oòcits madurs als ovaris. Aquesta intervenció es monitoritza mitjançant ecografia ovàrica i analítica de sang. Després de l'estimulació ovàrica, es procedeix a l'aspiració dels oòcits continguts en el líquid fol·licular mitjançant una punció fol·licular transvaginal. Posteriorment, els oòcits aspirats es renten en medi de manipulació de gàmetes (G-MOPS™ PLUS, Vitrolife, Suècia), es transfereixen a un medi de cultiu de gàmetes (G-IVF™ PLUS, Vitrolife, Suècia) i s'incuben a 37°C i 6% CO<sub>2</sub>. Transcorregut un temps, els oòcits destinats a ICSI es sotmeten a un procés de decumulació, en el qual s'allibera l'oòcit de totes les capes cel·lulars que l'envolten (corona radiada) mitjançant una digestió amb hialuronidasa (HYASE™-10x, Vitrolife, Suècia) i amb ajuda mecànica. En el cas dels oòcits destinats a FIV convencional, els espermatozoides són capaços de realitzar aquest procés gràcies al contingut de hialuronidasa a l'acrosoma. Finalment, la selecció d'oòcits es realitza en funció del seu nivell de maduració determinat per la presència d'un corpuscle polar durant la metafase II, descartant els oòcits amb una morfologia anòmala.

El semen requerit per a la fecundació pot tenir dos orígens; o bé és propi de la parella i s'ha obtingut en fresc o bé prové d'un donant del banc de gàmetes Fertibank. La preparació del semen consisteix en la creació de gradients de densitat mitjançant l'addició de capes d'una dissolució de sílice col·loidal recobert amb polivinilpirrolidona al 45%, una dissolució col·loidal al 90% i mostra seminal en proporcions 1:1:2. D'aquesta manera, es garanteix una mobilitat espermàtica reduïda. La mescla es centrifuga, el pellet es resuspèn en medi de cultiu de gàmetes (G-IVF™ PLUS, Vitrolife, Suècia), es torna a centrifugar i el pellet es resuspèn de nou en el volum desitjat de medi de cultiu de gàmetes.

#### 3.2. Fecundació

Després d'haver condicionat els oòcits per a la ICSI i haver preparat la mostra seminal, es procedeix a la fecundació. Primerament, els oòcits s'introdueixen en una gota de medi de manipulació de gàmetes (G-MOPS™ PLUS, Vitrolife, Suècia) i s'incorporen

sobre una placa d'ICSI. Seguidament, s'afegeix una gota de mostra seminal sobre una gota de PVP sobre la placa d'ICSI, on s'han col·locat els oòcits prèviament. Es col·loca una gota d'oli de cultiu (OVOIL™, Vitrolife, Suècia) de manera que cobreix les dues gotes que contenen l'oòcit i els espermatozoides, evitant-ne l'evaporació i contaminació. Després de la preparació de la placa d'ICSI, es realitza la injecció d'un espermatozoide, prèviament seleccionat per les millors característiques morfològiques, a l'ooplasma mitjançant una micropipeta d'injecció i amb l'ajuda d'una micropipeta de subjecció. El procediment de la ICSI es realitza sota un microscopi invertit de contrast de fases (Nikon Diaphot 200) a 400X augments, que compta amb un micromanipulador per a subjectar les micropipetes, a més d'un microinjector per a proveir la micropipeta d'oli de cultiu per a l'aspiració i la injecció de l'espermatozoide. En el cas de FIV convencional, el procediment de la preparació de la placa de fecundació és el mateix, però en aquest cas, l'oòcit no ha estat decumulat i es deixa transcórrer un cert temps fins que un espermatozoide fecunda l'oòcit *per se*.

### 3.3. Cultiu embrionari i monitorització per *time-lapse*

Després de la fecundació es procedeix a cultivar els zigots en plaques especials per a la monitorització amb *time-lapse* (Vitrolife, Sweden), recobrint-los amb una gota de medi de cultiu embrionari (G-1/G-2 o G-TL™, Vitrolife, Suècia) i una gota d'oli de cultiu (OVOIL™, Vitrolife, Suècia). Les plaques cultivades es col·loquen en un incubador convencional (Labotect C200) que incorpora un sistema de *time-lapse* (Primo Vision), mantenint unes condicions de 37°C i 6% CO<sub>2</sub>. El sistema de *time-lapse* captura imatges cada 5 minuts en 11 plans focals diferents, donant com a resultat un registre complet i detallat de l'evolució de cadascun dels embrions cultivats, tant en termes de morfologia com de temps en què es produeixen els diferents esdeveniments. Els embrions es mantenen constantment monitoritzats i en cultiu fins el moment de la transferència.

### 3.4. Recopilació i tractament de dades

La monitorització per *time-lapse* permet obtenir, de forma no invasiva, un enregistrament complet de l'evolució de l'embrió des del moment abans de la realització de la ICSI fins el moment de la transferència. D'aquesta manera, es permet la informatització dels embrions mitjançant l'anotació manual dels valors dels *t-times* sota el criteri de l'embriòleg del centre, generant un full de càlcul (format XLXS), on cada fila correspon a un embrió i cada columna representa una variable. Totes les variables morfocinètiques

procedents de *time-lapse* han estat relativitzades a  $t_0$ , de manera que els *t-times* corresponen a les hores reals transcorregudes des de la fecundació de l'òvul. A partir dels paràmetres morfocinètics relativitzats, s'han creat noves variables que inclouen intervals i quocients de *t-times*. Algunes variables han estat excloses per la seva dificultat d'interpretació o manca de criteri universal i es van descartar totes les variables posteriors a les 69 hores post-inseminació, quan la majoria d'embrions ja han estat transferits. Després del procés de filtració, s'ha obtingut un total de 52 variables d'estudi. S'ha determinat el valor mitjà, així com la desviació estàndard, per a tots els *t-times* i els intervals (Taula 1S, Annex 1) i quocients (Taula 2S, Annex 1) derivats. La comparació de mitjanes entre grups s'ha realitzat per mitjà d'una prova *t* de Student o U de Mann-Whitney segons si les dades segueixen una distribució normal (variables paramètriques) o no normal (variables no paramètriques), respectivament (Taula 3S, Annex 2). A més, en aquest arxiu s'inclou informació addicional per a cada embrió, com per exemple, el medi de cultiu utilitzat, el sexe de l'embrió i la condició d'aneuploidia o NVS, entre d'altres. Els embrions informatitzats han estat classificats en dues variables categòriques, denominades "aneuploide" (classe o categoria positiva) i "nascut" (classe o categoria negativa), que constitueixen els grups d'estudi. Després de la recopilació de les variables, es procedeix a la importació de dades per a l'anàlisi estadística mitjançant el *software* RStudio. El procés de normalització de les dades consisteix a dividir cada valor per la desviació estàndard (SD) de la variable (escalar) i restar la mitjana de la variable (centrar), de manera que s'obté una SD amb valor 1 i una mitjana amb valor 0 de les dades normalitzades.

### 3.5. Mida mostral

L'estudi s'ha realitzat sobre un total de 186 embrions obtinguts a partir de 85 cicles de fecundació *in vitro* que s'han realitzat a l'institut Conceptum entre els anys 2014 i 2019. D'aquests 186 embrions, que provenen de 72 pacients en total, 90 s'han diagnosticat com a aneuploides mitjançant un PGT i 96 són NVS.

Els embrions d'estudi han estat estrictament seleccionats en funció de diverses consideracions. Primer, els embrions informatitzats han estat validats individualment per part de l'embriòleg. La finalitat d'aquesta validació inicial és assegurar que s'han anotat tots els paràmetres morfocinètics obtinguts a partir del *time-lapse* i que, a més, les dades són correctes, descartant possibles errors de tecleig. Posteriorment, s'han aplicat dos factors d'inclusió. El primer consisteix en la disposició de *known implantation data* (KID), és a dir, 1 embrió transferit correspon a 1 individu NVS, o bé, 2 embrions transferits

corresponen a 2 individus NVS, els quals poden haver estat sotmesos a DGP o no. El segon factor d'inclusió és el diagnòstic d'aneuploidia per DGP obligatòriament. Finalment, els factors d'exclusió aplicats han estat els casos d'avortament dels embrions transferits i la presència de valors no disponibles (N/A; de l'anglès, *not available*) en alguna de les variables analitzades. Tot i la possibilitat d'imputar aquests valors per la mitjana de la variable o mitjançant una regressió lineal, s'ha procedit a l'eliminació de l'embrió del grup d'estudi per tal d'evitar el biaix dels resultats.

### 3.6. Valoració dels algoritmes predictius amb *V-fold cross-validation*

S'han testat diversos algoritmes predictius mitjançant dos paquets diferents del *software* RStudio. Per una banda, s'han inclòs cinc algoritmes de *machine learning* del paquet "caret", que són GBM, GLM, XGBoost, rF i kNN. D'altra banda, el paquet "H2O" s'ha utilitzat per a avaluar alguns algoritmes de *machine learning*, corresponents a GBM i GLM, i un algoritme de *deep learning*, referent a la xarxa neuronal artificial (ANN; de l'anglès, *artificial neural network*). Per a cada execució, s'han escollit diferents combinacions de variables, seleccionades en conjunts de 3 fins a 6, que constitueixen l'*input* a l'algoritme. Com a *output*, s'obté una resposta binària en funció de la categoria predita (aneuploide o nascut).

Els algoritmes generen un model sobreajustat, en què els embrions que constitueixen el grup d'entrenament es tornen a predir en base al model establert, i es validen mitjançant *V-fold CV*, en què els embrions que constitueixen el grup de prova es prediuen amb el model creat. En cada execució, s'han aplicat 10 repeticions per a cada algoritme de "caret" i 5 repeticions per a cada algoritme d'"H2O". El resultat final de cada algoritme i conjunt de variables correspon a la mitjana dels resultats obtinguts individualment en cada repetició.

Per a l'avaluació del potencial predictiu de cada algoritme, s'han anotat diferents paràmetres o mètriques resultants de la matriu de confusió, corresponents a ROC-AUC, exactitud, TP, TN, FP, FN,  $F_1$  score, precisió o PPV, NPV, sensibilitat o *recall* i especificitat, amb un interval de confiança del 95%.

### 3.7. Validació del millor algoritme per *leave-one-out cross-validation*

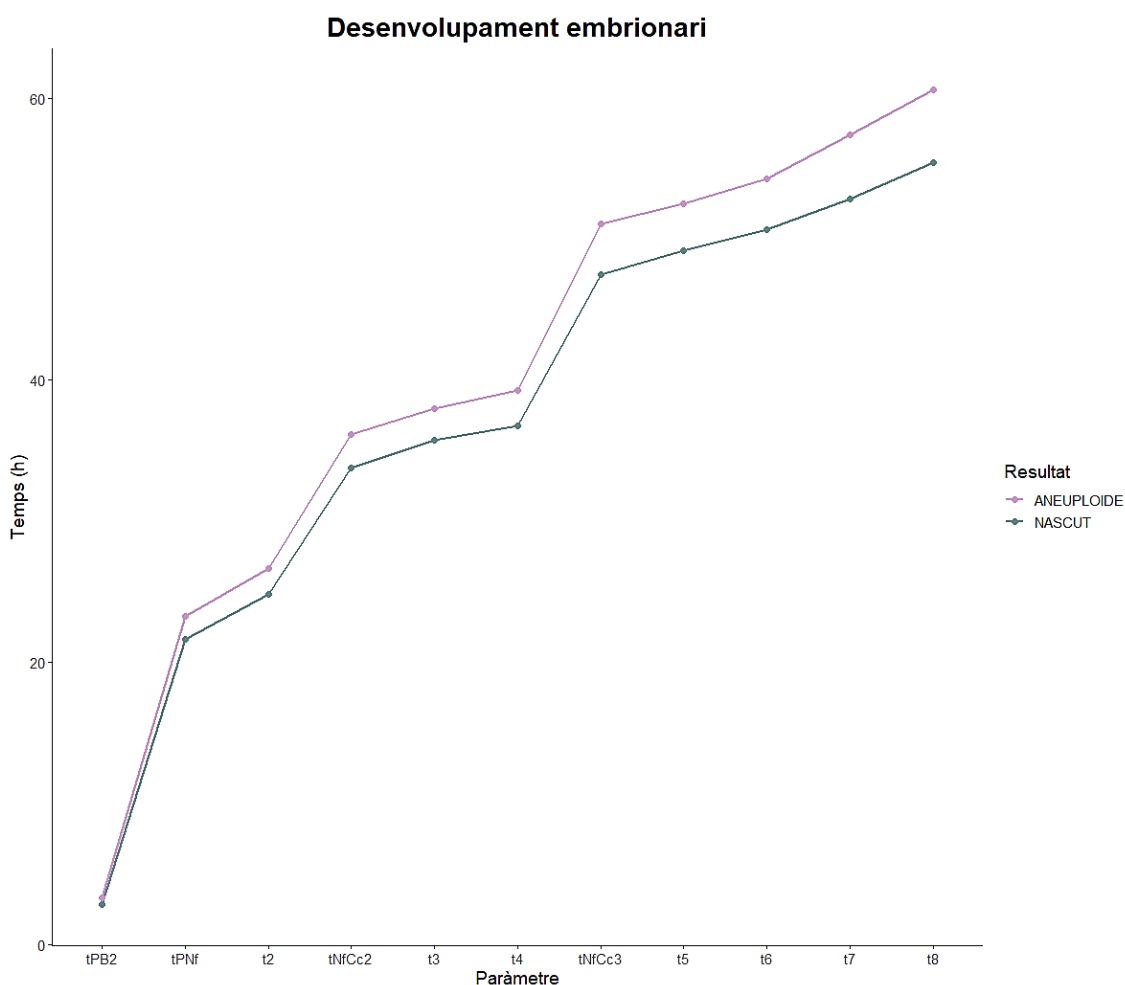
Per últim, s'ha realitzat una validació per LOOCV, en la qual el nivell d'error de predicció acostuma a ser molt més baix que en altres tipus de validacions creuades. En aquest

cas, s'ha testat únicament el millor model obtingut amb la *V-fold* CV i el conjunt de variables que millors resultats ha donat. L'execució de l'algoritme amb LOOCV s'ha dut a terme amb 10 iteracions per tal d'assegurar l'estabilitat de la predicció, disminuint la probabilitat d'obtenir els resultats a l'atzar. D'aquesta manera, un mateix embrió és predit 10 vegades mitjançant 10 construccions algorítmiques aleatòries diferents.

Per a comparar els dos models de validació, s'han anotat les mateixes mètriques, corresponents a AUC-ROC, exactitud, TP, TN, FP, FN,  $F_1$  score, precisió o PPV, NPV, sensibilitat o *recall* i especificitat, amb un interval de confiança del 95%.

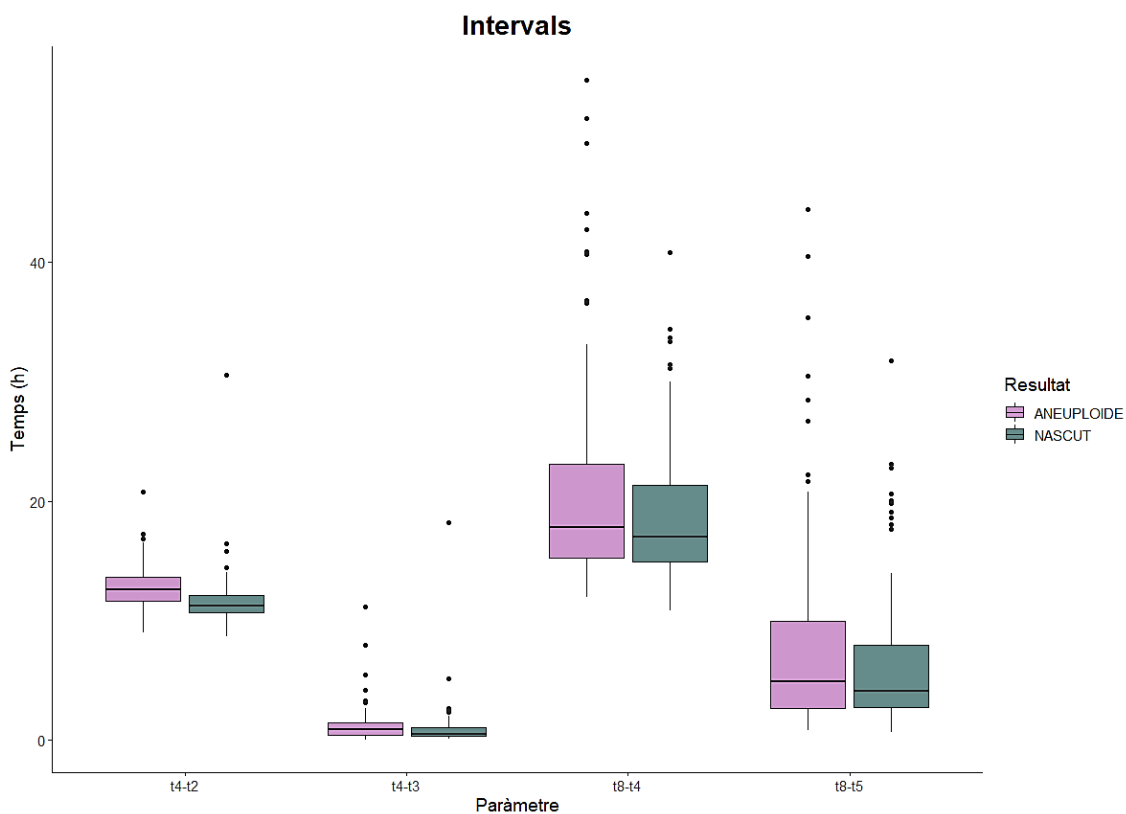
## 4. RESULTATS

Per al present estudi, s'han considerat tots els paràmetres morfocinètics anotats per *time-lapse* fins a D+3 de cultiu embrionari, de manera que l'últim *t-time* correspon a t8. A més, s'han determinat diversos intervals i quocients a partir d'aquests paràmetres morfocinètics inicials. La mitjana, l'SD i el *p*-valor s'han determinat per a cadascuna d'aquestes variables (Taula 3S, Annex 2). A la Figura 9 es representa l'evolució temporal dels *t-times* fins a D+3 de cultiu. S'observa que el comportament del desenvolupament embrionari és diferent en embrions aneuploides que en embrions nascuts, fet que permet la distinció entre les dos classes abans de la seva transferència. La interpretació visual de la Figura 9 permet observar que el desenvolupament dels embrions aneuploides és més lent que el dels embrions nascuts, ja que es requereix més temps per a què es produeixi cadascun dels esdeveniments morfocinètics. A mesura que transcorre el temps, la divergència en el desenvolupament embrionari és major entre els embrions aneuploides i els nascuts.



**Figura 9.** Gràfic de línies per al desenvolupament embrionari. Es representen els paràmetres morfocinètics (eix x) anotats mitjançant *time-lapse* en funció del temps (h) en què es produeixen (eix y). Es mostren els patrons de desenvolupament d'embrions aneuploides i d'embrions nascuts.

Les diferents variables morfocinètiques, incloent els diferents *t-times* fins a D+3 i els intervals i quocients derivats, es van combinar creant diferents conjunts de variables. Cada conjunt es va introduir com a *input* en els diversos algoritmes seleccionats, que inclouen GLM, rF, GBM, XGBoost, kNN i ANN. De tots els conjunts analitzats, les variables que millors resultats van donar són els intervals t4-t2 (durada del segon cicle cel·lular), t4-t3 (sincronicitat del segon cicle cel·lular), t8-t4 (durada del tercer cicle cel·lular) i t8-t5 (sincronicitat del tercer cicle cel·lular). La diferència de mitjanes entre la classe "aneuploide" i la classe "nascut" de les variables seleccionades es mostra a la Figura 10. Es tracta de variables no paramètriques i la significança estadística es va determinar mitjançant la prova U de Mann-Whitney. Les variables corresponents al segon cicle cel·lular presenten diferències significatives entre els dos grups d'estudi. La variable t4-t2 presenta una significança estadística de  $p = 0,000$  i la variable t4-t3, una  $p = 0,019$ . Per contra, les diferències de mitjanes de variables referents al tercer cicle cel·lular han resultat ser no significatives. La variable t8-t4 presenta una significança estadística de  $p = 0,130$  i la variable t8-t5, una  $p = 0,337$ . A partir del gràfic de la Figura 10 es pot observar que la dispersió de les dades en el cas de les variables del segon cicle cel·lular és molt menor que en el cas de les variables del tercer cicle cel·lular, les quals presenten una asimetria positiva a més d'un nombre major de valors atípics.



**Figura 10.** Diagrames de caixa dels intervals de *t-times* seleccionats per al model predictiu. Es representen els intervals de paràmetres morfocinètics (eix x) anotats mitjançant *time-lapse* en funció de la seva durada (h) (eix y). Es mostra una comparació entre el embrions aneuploides i els nascuts per a cada interval.

L'algoritme que va presentar major poder predictiu és el GBM. La configuració del model aplicada tant en la validació per *V-fold CV* com en la validació per *LOOCV* va ser la mateixa. La mida mostral total per aquest model va ser de 171 embrions, dels quals 84 eren aneuploides i 87 nascuts. El processament de les dades crues consisteix en centrar i escalar els valors. Cada model es va executar en un total de 10 repeticions. El nombre d'arbres construïts en cada iteració es va mantenir constant a un valor de 100. La profunditat (*interaction depth*) de cadascun dels arbres va ser de 2, és a dir, es van establir dos nivells de branques a part de l'arrel de l'arbre. El *shrinkage* o taxa d'aprenentatge es va mantenir a un valor de 0,1. El paràmetre *n.minobsinnode*, que constitueix el nombre mínim d'observacions als nodes terminals de l'arbre, es va fixar a un valor de 10.

Després de la creació del model, el valor predictiu s'estudia mitjançant una matriu de confusió, en què es comparen el nombre de prediccions de cada classe respecte les classes observades en la realitat. El model predictiu GBM validat per *V-fold CV* (Taula 2) ha estat capaç de predir correctament 61/84 embrions aneuploides i 65/87 embrions nascuts. Quan s'aplica la validació per *LOOCV* (Taula 3), s'aconsegueix un encert de 57/84 embrions aneuploides i 64/87 embrions nascuts. D'altra banda, una part dels embrions també són predits de forma incorrecta. La validació per *V-fold CV* dona una predicció de 23/84 falsos negatius i 22/87 falsos positius. En canvi, la validació per *LOOCV* dona un error de 27/84 embrions aneuploides predits com a nascuts i 23/87 embrions nascuts predits com a aneuploides. A partir d'aquests resultats, es dedueix que el model validat per *V-fold CV* té un poder predictiu lleugerament superior que quan es valida per *LOOCV*.

**Taula 2.** Matriu de confusió resultant de l'algoritme GBM validat per *V-fold CV* (classe positiva = aneuploide; classe negativa = nascut).

Matriu de confusió		Observació	
		Positiu	Negatiu
Predicció	Positiu	61	22
	Negatiu	23	65

**Taula 3.** Matriu de confusió resultant de l'algoritme GBM validat per *LOOCV* (classe positiva = aneuploide; classe negativa = nascut).

Matriu de confusió		Observació	
		Positiu	Negatiu
Predicció	Positiu	57	23
	Negatiu	27	64



Les mètriques derivades de la matriu de confusió per ambdós mètodes de validació es detallen a la Taula 4. El valor de la ROC-AUC en el cas de la *V-fold CV* és de gairebé un 75%, mentre que aquest pren un valor del 72,58% en el cas de la LOOCV. En termes d'exactitud, la *V-fold CV* ofereix un 73,68%, mentre que la LOOCV arriba a un 70,76% d'exactitud. Paral·lelament, la diferència del valor de l' $F_1$  score és encara major, sent d'un 74,28% en la *V-fold CV* i d'un 69,51% en la LOOCV. L'especificitat del model validat per ambdós mètodes és bastant similar, sent d'un 74,71% en el cas de la *V-fold CV* i d'un 73,56% per a la LOOCV. No obstant, els valors de sensibilitat són més distants. S'aconsegueix un 72,62% de sensibilitat en el cas de *V-fold CV*, mentre que la LOOCV assoleix un 67,68% de sensibilitat. En ambdós casos, el valor de l'especificitat és major que el de la sensibilitat, indicant que aquest model GBM és més competent a l'hora de predir la classe negativa, és a dir, els embrions nascuts.

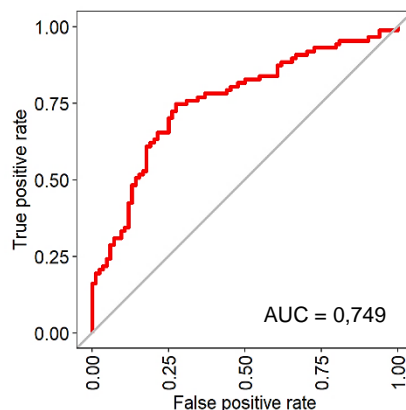
Malgrat la poca diferència entre els valors de les mètriques d'avaluació del model validat per ambdós mètodes, es pot afirmar que la *V-fold CV* té un millor poder predictiu, ja que tots els paràmetres derivats de la matriu de confusió són més elevats que en el cas de la LOOCV. Aquest fet és lògic, posat que el nombre de TP i TN és major en el model predictiu validat per *V-fold CV*.

**Taula 4.** Mètriques d'avaluació del model predictiu confeccionat amb l'algoritme GBM. Comparació entre la validació del model per *V-fold CV* i LOOCV.

Mètrica	<i>V-fold CV</i>	LOOCV
ROC-AUC	74,85 %	72,58 %
Exactitud	73,68 %	70,76 %
TP	65	57
TN	61	64
FP	23	23
FN	22	27
PPV	73,86 %	71,25 %
NPV	73,49 %	70,33 %
Sensibilitat	72,62 %	67,86 %
Especificitat	74,71 %	73,56 %
$F_1$ score	74,28 %	69,51 %

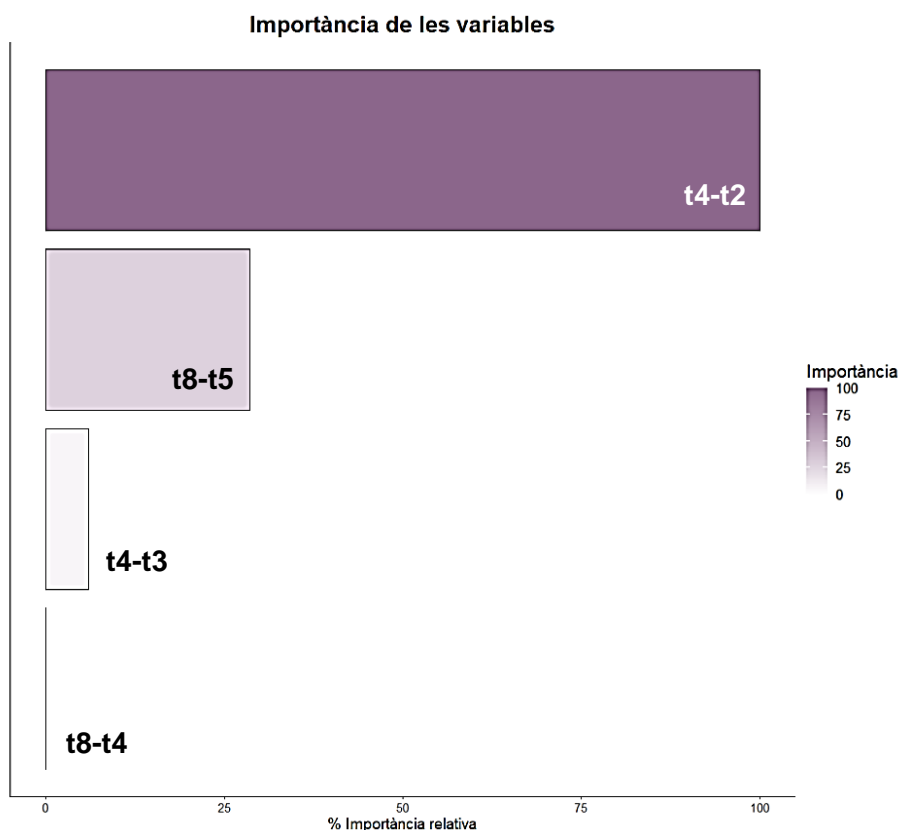
Diferents parelles de valors de sensibilitat i especificitat, també anomenats TPR i TNR, respectivament, s'utilitzen per a construir la corba ROC, que permet avaluar gràficament el poder predictiu d'un sistema de classificació binària.

La Figura 11 mostra una comparació de la corba ROC obtinguda a partir de la validació del model mitjançant *V-fold CV*. Una corba ROC perfecta, amb  $AUC = 1$ , traçaria una línia vertical sobre  $x = 0$  i una línia horitzontal sobre  $y = 1$ . Una corba ROC diagonal ( $AUC = 0,5$ ) indicaria una capacitat de discriminació del model similar a l'atzar. Per tant, el model confeccionat en aquest estudi presenta un bon rendiment de predicció, tot i no ser perfecte.



**Figura 11.** Corba ROC per al model predictiu confeccionat amb l'algoritme GBM i validat per *V-fold CV*. El valor de l'AUC és de 0,749.

En la creació del model predictiu, no totes les variables seleccionades han contribuït equitativament. La variable que ha tingut més importància en la confecció de l'algoritme GBM ha estat  $t4-t2$ , seguida de  $t8-t5$ ,  $t4-t3$  i  $t8-t4$  (Figura 12). Aquest fet concorda amb la Figura 10, on s'observa que la variable  $t4-t2$  presenta una major diferència de mitjanes entre les dues classes d'estudi.



**Figura 12.** Gràfic de barres per a la importància relativa de cadascuna de les variables incloses en el model predictiu.

## 5. DISCUSSIÓ

El propòsit d'aquest estudi era confeccionar un model algorítmic predictiu basat en paràmetres morfofocinètics procedents de la monitorització amb *time-lapse* fins a D+3 de cultiu capaç de classificar els embrions obtinguts per FIV en aneuploides o nascuts vius sans. Els resultats obtinguts indiquen l'existència d'algoritmes amb un poder predictiu prometedor per a poder ser aplicats de forma prospectiva com a criteri de selecció embrionària prèvia a la transferència.

Un dels aspectes més preocupants de la reproducció assistida és la baixa proporció de cicles de FIV amb un resultat exitós. Per tal de reduir la taxa de fracàs de la implantació associada amb l'essència de l'embrió, molts estudis proposen la identificació del dia òptim de transferència embrionària (Xiao *et al.*, 2019). La transferència pot tenir lloc a D+3 (etapa de divisió) o a D+4-6 (etapa de blastòcit) post-fertilització. Tradicionalment, la transferència es duia a terme a D+3, tot i que les innovacions introduïdes en els medis de cultiu han permès el desenvolupament *in vitro* durant períodes més prolongats, fent possible la transferència a D+4-6. La posposició de la transferència embrionària ofereix l'avantatge de la selecció natural d'embrions viables, en la qual només els embrions amb potencial de viabilitat sobreviuen. No obstant, es planteja un major risc de cancel·lació del cicle FIV quan el cultiu embrionari s'estén fins a l'etapa de blastocist (Hatırnaz i Kanat Pektaş, 2017).

D'altra banda, l'estudi realitzat per Xiao *et al.* (2019) constata que la transferència d'embrions a l'úter en fase de divisió a D+3 comporta taxes més elevades d'embaràs i de naixement viu, en comparació el cultiu i la transferència d'embrions a D+4-6. A més, l'estudi es planteja la possibilitat que els criteris morfològics actuals que s'utilitzen per classificar els embrions en etapes de divisió no es correlacionen amb la taxa d'embaràs, ja que es van transferir embrions de totes les categories amb èxit. Per tant, és necessari un refinament del sistema de classificació embrionària per distingir millor entre embrions amb elevat i baix potencial d'implantació (Xiao *et al.*, 2019).

El problema del sistema actual de la classificació i validació embrionària mitjançant l'avaluació morfològica és el fet d'aplicar puntuacions estàtiques a processos dinàmics. La implementació de la tecnologia del *time-lapse* permet afrontar aquesta contrarietat mitjançant una monitorització constant del desenvolupament embrionari en cultiu. A més, es garanteix un cultiu embrionari en condicions òptimes i estables, un aspecte crucial per a l'èxit de la FIV. A més, la capacitat d'avaluar i classificar correctament els embrions per determinar-ne la qualitat permetrà transferir primer l'embrió amb més potencial d'implantació, reduint així el temps fins a l'embaràs. També es fomentarien les

transferències d'un únic embrió, augmentant així la seguretat tant per la mare i la descendència (Lundin i Park, 2020). Gràcies al sistema *time-lapse*, s'han proposat nous marcadors cinètics associats a un major potencial d'implantació (Basile *et al.*, 2014). En l'estudi realitzat per Basile *et al.* (2014), s'elabora un model algorítmic que inclou variables morfocinètiques corresponents a D+2 de desenvolupament. De la mateixa manera, en el model generat en aquest estudi s'han inclòs variables morfocinètiques corresponents a D+2 i D+3 de cultiu. D'aquesta manera, es permet una decisió que combina marcadors morfocinètics i aspectes morfològics sense la necessitat d'un cultiu embrionari fins a l'etapa de blastòcit. Aquest aspecte suposa un gran avantatge, ja que es pot aplicar no només a pacients sotmesos a transferència de blastòcit, sinó també a aquells que se sotmeten a transferències a D+3 de desenvolupament, una situació habitual en moltes clíniques de FIV (Basile *et al.*, 2014).

En un estudi realitzat per Goyal *et al.* (2020), es comparen diversos algoritmes, incloent tant el *machine learning* clàssic com el *deep learning* i un mètode d'acoblament de diversos algoritmes. Els algoritmes amb un major poder predictiu en l'estudi de Goyal *et al.* (2020) van ser el rF amb un  $F_1$  score del 76,49% i l'XGBoost amb un valor AUC de 0,73. Es tracta d'uns algoritmes semblant al GBM (millor model del present estudi), ja que els tres es basen en la creació d'arbres de decisió. No obstant, es van incloure una gran varietat de factors relacionats amb la infertilitat (tipus, duració), l'edat i embarassos i avortaments anteriors, entre d'altres, de manera que l'aproximació no és totalment comparable amb el nostre estudi. D'altra banda, el present estudi s'enfoca en la classificació embrionària basada únicament en paràmetres morfocinètics intrínsecs de l'embrió. Considerem de crucial importància la capacitat evolutiva del propi embrió sense tenir en compte factors condicionants que impedeixin la seva implantació i/o naixement. La premissa de la qual es parteix és seleccionar els embrions capacitats per a desenvolupar-se i donar lloc a un NVS. En cas contrari, l'algoritme podria aprendre a associar una edat > 35, per exemple, a una baixa probabilitat de naixement i classificar un embrió viable com a aneuploide.

Una aproximació similar a la realitzada en el present estudi es va dur a terme per part de Petersen *et al.* (2016), ja que s'utilitzen dades d'embrions transferits a D+3 i utilitzen la *V-fold CV* per a validar el model. L'algoritme desenvolupat en el seu estudi (KIDScore) es basa en variables derivades de sis anotacions de *time-lapse*, corresponents tPNa, tPNf, t2, t3, t5 i t8 i en una classificació dels embrions en cinc categories segons una puntuació generada per avaluar el potencial d'implantació. En aplicar aquest algoritme, es va poder predir el potencial d'implantació dels embrions amb un valor de l'AUC de 0,65. Tenint en compte el poder predictiu del potencial d'implantació amb dades

morfocinètiques a D+3, queda evident que el model desenvolupat en el nostre estudi té un major potencial de predicció. Una de les diferències entre els dos models proposats és el nombre de categories possibles a l'*output* i, a més, l'algoritme KIDScore no té en compte la informació de naixement viu (Petersen *et al.*, 2016). D'aquesta manera, no es pot garantir que l'embrió implantat acabi resultant en NVS. Aquesta limitació podria ser comparable a l'actual problema d'avaluació morfològica dels embrions, en què s'estableix un sistema de gradació per a determinar el potencial d'implantació, però no es defineixen patrons detectables durant etapes primerenques de desenvolupament que condicionin l'embrió per a desenvolupar-se un cop implantat a l'úter.

Paral·lelament, hi ha estudis que proposen una nova metodologia que implica el mètode clàssic d'anàlisi morfològica combinada amb informació sobre la morfocinètica del desenvolupament embrionari i intel·ligència artificial per a una valoració automatitzada. En aquesta aproximació es planteja incloure totes les imatges documentades per *time-lapse* a l'algoritme per tal que siguin analitzades per part del programa informàtic i que aquest sigui capaç d'establir patrons que es conserven en els embrions de la mateixa classe per tal de poder discernir entre les categories de l'*output* (Lundin i Park, 2020). En aquesta línia, Tran *et al.* (2018) van elaborar un model basat en *deep learning*, anomenat IVY, que consisteix en un sistema objectiu i totalment automatitzat que prediu la probabilitat d'embaràs directament a partir de vídeos de *time-lapse* sense la necessitat de cap anotació morfocinètica manual o avaluació morfològica convencional. Aquesta metodologia presenta un avantatge afegit més respecte a la intel·ligència artificial basada en *t-times* i variables derivades. Gràcies a la valoració automatitzada de les imatges crues obtingudes per *time-lapse* es disminueix encara més el risc d'incloure la subjectivitat durant l'anotació dels diferents temps en què succeeixen els esdeveniments de desenvolupament embrionari. A més, aquest fet suposaria un estalvi del temps que suposa anotar tots els paràmetres morfocinètics de cada embrió manualment. No obstant, també es suggereix un inconvenient per aquest model automatitzat. El fet de tractar-se d'un aprenentatge automàtic, les associacions que realitza no són conegudes. D'aquesta manera, pot ser que es produeixi una intercalació entre patrons d'embrions amb elevat potencial de desenvolupament post-transferència i embrions amb un baix potencial de desenvolupament, portant en últim terme a una predicció no fiable. De fet, els impactes clínics d'aquests resultats encara no es coneixen. Es requereixen estudis addicionals, incloent assajos controlats aleatoris prospectius, per avaluar la importància clínica d'aquest model d'aprenentatge automàtic (Tran *et al.*, 2018).

## 6. CONCLUSIONS

Els resultats obtinguts en aquest estudi retrospectiu donen evidència de l'existència d'algoritmes predictius capaços de discernir entre embrions aneuploides i NVS a D+3 de cultiu embrionari mitjançant les diferències existents entre classes en referència als paràmetres morfocinètics. La determinació del moment exacte en què ocorren els diferents esdeveniments durant el desenvolupament embrionari gràcies a la monitorització per *time-lapse* i el càlcul de patrons de longitud de diferents processos cel·lulars és crucial en l'àmbit de la intel·ligència artificial aplicada a l'embriologia. La confecció d'algoritmes basada en *t-times* i variables derivades permet un entrenament controlat dels models predictius per a la selecció embrionària per a la posterior transferència de forma no invasiva. En aquest estudi es demostra el potencial que té aquesta tecnologia que combina *time-lapse* i intel·ligència artificial d'implantar-se com a mètode habitual per proporcionar assistència en la presa de decisions. No obstant, actualment no hi ha evidència prospectiva suficient que garanteixi una fiabilitat suficientment elevada com per a substituir la necessitat de realitzar un DGP. És per això que el present estudi es planteja una aproximació que permet aprofitar el model creat per a una aplicació prospectiva amb un bon poder predictiu. Aquesta alternativa consisteix en l'aplicació de la LOOCV com a aproximació estadística que presenta similitud amb la situació real, en la qual es requereix la predicció de cadascun dels nous embrions obtinguts per FIV. La LOOCV permet aprofitar el model ja establert per tal de poder incloure el nou embrió com a mostra *test* del model. Per tant, aquest estudi suporta la proposta actual d'establir un mètode objectiu de selecció embrionària i la millora de la taxa de gestació i naixement viu mitjançant intel·ligència artificial.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- Abu Alfeilat, H., Hassanat, A., Lasassmeh, O., Tarawneh, A., Alhasanat, M., Eyal Salman, H. and Prasath, V., 2019. Effects of Distance Measure Choice on K-Nearest Neighbor Classifier Performance: A Review. *Big Data*, 7(4), pp.221-248.
- Basile, N., Nogales, M., Bronet, F., Florensa, M., Riqueiros, M., Rodrigo, L., García-Velasco, J. and Meseguer, M., 2014. Increasing the probability of selecting chromosomally normal embryos by time-lapse morphokinetics analysis. *Fertility and Sterility*, 101(3), pp.699-704.e1.
- Chavez, S., Loewke, K., Han, J., Moussavi, F., Colls, P., Munne, S., Behr, B. and Reijo Pera, R., 2012. Dynamic blastomere behaviour reflects human embryo ploidy by the four-cell stage. *Nature Communications*, 3(1).
- Chen, T. and Guestrin, C., 2016. XGBoost: A Scalable Tree Boosting System. *Proceedings of the 22nd ACM SIGKDD International Conference on Knowledge Discovery and Data Mining*.
- Ciray, H., Campbell, A., Agerholm, I., Aguilar, J., Chamayou, S., Esbert, M. and Sayed, S., 2014. Proposed guidelines on the nomenclature and annotation of dynamic human embryo monitoring by a time-lapse user group. *Human Reproduction*, 29(12), pp.2650-2660.
- Dankers, F., Traverso, A., Wee, L. and van Kuijk, S., 2018. Prediction Modeling Methodology. *Fundamentals of Clinical Data Science*, pp.101-120.
- De Geyter, C., 2019. Assisted reproductive technology: Impact on society and need for surveillance. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 33(1), pp.3-8.
- Doupe, P., Faghmous, J. and Basu, S., 2019. Machine Learning for Health Services Researchers. *Value in Health*, 22(7), pp.808-815.
- Goyal, A., Kuchana, M. and Ayyagari, K., 2020. Machine learning predicts live-birth occurrence before in-vitro fertilization treatment. *Scientific Reports*, 10(1).
- Hatirnaz, Ş. and Kanat Pektaş, M., 2017. Day 3 embryo transfer versus day 5 blastocyst transfers: A prospective randomized controlled trial. *Journal of Turkish Society of Obstetric and Gynecology*, 14(2), pp.82-88.
- Hurtado de Mendoza, M. and Cuadros, J., 2015. Criterios ASEBIR de Valoración Morfológica de Oocitos, Embriones Tempranos y Blastocistos Humanos. [online] ASEBIR. Available at: <https://asebir.com/cuadernos-asebir/criterios-asebir-de-valoracion-morfologica-de-oocitos-embriones-tempranos-y-blastocistos-humanos/c> [Accessed 21 May 2021].
- Johnson, M., 2019. Human in vitro fertilisation and developmental biology: a mutually influential history. *Development*, 146(17).
- Jung, Y. and Hu, J., 2015. AK-fold averaging cross-validation procedure. *Journal of Nonparametric Statistics*, 27(2), pp.167-179.
- Lundin, K. and Park, H., 2020. Time-lapse technology for embryo culture and selection. *Upsala Journal of Medical Sciences*, 125(2), pp.77-84.
- Milewski, R. and Ajduk, A., 2017. Time-lapse imaging of cleavage divisions in embryo quality assessment. *Reproduction*, 154(2), pp.R37-R53.
- Patel, S., Chamberlain, D. and Chamberlain, J., 2018. A Machine Learning Approach to Predicting Need for Hospitalization for Pediatric Asthma Exacerbation at the Time of Emergency Department Triage. *Academic Emergency Medicine*, 25(12), pp.1463-1470.

- Petersen, B., Boel, M., Montag, M. and Gardner, D., 2016. Development of a generally applicable morphokinetic algorithm capable of predicting the implantation potential of embryos transferred on Day 3. *Human Reproduction*, 31(10), pp.2231-2244.
- Poldrack, R., Huckins, G. and Varoquaux, G., 2020. Establishment of Best Practices for Evidence for Prediction. *JAMA Psychiatry*, 77(5), p.534.
- Poline, J. and Brett, M., 2012. The general linear model and fMRI: Does love last forever?. *NeuroImage*, 62(2), pp.871-880.
- Renganathan, V., 2019. Overview of artificial neural network models in the biomedical domain. *Bratislava Medical Journal*, 120(07), pp.536-540.
- Rocha, J., Passalia, F., Matos, F., Maserati Júnior, M., Alves, M., Almeida, T., Cardoso, B., Basso, A. and Nogueira, M., 2016. Methods for assessing the quality of mammalian embryos: How far we are from the gold standard?. *JBRA Assisted Reproduction*, 20.
- Sarica, A., Cerasa, A. and Quattrone, A., 2017. Random Forest Algorithm for the Classification of Neuroimaging Data in Alzheimer's Disease: A Systematic Review. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 9.
- Sciorio, R., Tramontano, L. and Catt, J., 2019. Preimplantation genetic diagnosis (PGD) and genetic testing for aneuploidy (PGT-A): status and future challenges. *Gynecological Endocrinology*, 36(1), pp.6-11.
- Tran, D., Cooke, S., Illingworth, P. and Gardner, D., 2019. Deep learning as a predictive tool for fetal heart pregnancy following time-lapse incubation and blastocyst transfer. *Human Reproduction*, 34(6), pp.1011-1018.
- Vander Borght, M. and Wyns, C., 2018. Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clinical Biochemistry*, 62, pp.2-10.
- Xiao, J., Healey, M., Talmor, A. and Vollenhoven, B., 2019. When only one embryo is available, is it better to transfer on Day 3 or to grow on?. *Reproductive BioMedicine Online*, 39(6), pp.916-923.
- Zaninovic, N. and Rosenwaks, Z., 2020. Artificial intelligence in human in vitro fertilization and embryology. *Fertility and Sterility*, 114(5), pp.914-920.



## AUTOAVALUACIÓ

L'àmbit de la reproducció assistida està guanyant importància en l'actualitat, degut a una major incidència de la infertilitat, tant en homes com en dones, deguda a diversos factors biològics, ambientals i socials. Personalment, la reproducció assistida em va cridar l'atenció des del moment en què vaig començar a buscar una entitat on realitzar les pràctiques externes. Fins llavors, no m'havia plantejat seriosament què és el que m'agrada; de totes les disciplines que conformen les biociències, quina és l'adequada per a mi. Paral·lelament, considero de crucial importància tenir una experiència pràctica per a poder decidir realment cap a on enfocar el futur laboral. Tot i no haver-se pogut donar la possibilitat de formar part d'un laboratori d'embriologia, he tingut l'oportunitat de basar el present treball en un dels aspectes de l'embriologia, per la qual cosa estic eternament agraïda a Enric Güell Penas i l'Institut Conceptum de Reus.

Amb aquest estudi, he pogut entendre la importància de la selecció embrionària per a la seva transferència. La validació dels embrions fecundats *in vitro* condiciona, en part, la seva posterior capacitat d'implantació, desenvolupament a l'úter i, en últim terme, el naixement. És per això que la determinació de la seva viabilitat és de crucial importància. He pogut intervenir en la confecció d'un algoritme predictiu per a l'ajuda en la presa de decisions abans de la transferència, una eina innovadora i prometedora en l'embriologia. Durant la realització d'aquest treball, m'he enfrontat a un dels àmbits de la ciència que més temor em produeix, l'anàlisi estadística. Fins ara, no havia treballat amb el *software* estadístic R, el qual és un programa de llenguatge de programació per a la computació estadística i la generació de gràfics. Gràcies a aquest treball he pogut familiaritzar-me amb aquest programa i he pogut conèixer la seva gran utilitat per a l'anàlisi de dades i la rapidesa amb què proporciona els resultats. En un futur proper m'agradaria ampliar els coneixements en aquest programa, ja que ofereix un gran ventall de possibilitats en funció de les dades de què es disposen.

D'altra banda, el desenvolupament d'aquest treball m'ha servit per a orientar la meua carrera professional després de finalitzar els estudis de grau. Actualment, la meua intenció és especialitzar-me amb un màster en Medicina Reproductiva Humana, ja que m'agradaria treballar en un centre de reproducció assistida en un futur.

En general, la realització del present treball ha suposat una experiència molt enriquidora per a mi, ja que he après moltes coses noves que no he tingut oportunitat de conèixer durant la carrera. A més, considero que el TFG ha estat una activitat necessària en aquest punt del meu desenvolupament estudiantil per tal d'adquirir aptituds en el procés de redacció d'una memòria científica completa.

## ANNEXOS

### Annex 1. Intervalls i quocients obtinguts a partir de les variables morfocinètiques anotades amb *time-lapse*

**Taula 1S.** Intervalls de paràmetres morfocinètics anotats a partir de la monitorització amb *time-lapse* i el seu significat.

Interval	Significat
t3 - t2	Temps que transcorre des de la primera divisió mitòtica, en què es dona lloc a les primeres dues cèl·lules de l'embrió, fins que es produeix la segona divisió mitòtica, en què una cèl·lula de l'embrió dona lloc a la tercera.
t4 - t3	Temps que transcorre des de la segona divisió mitòtica, en què l'embrió es constitueix de tres cèl·lules, fins que es produeix la tercera divisió mitòtica, en què la segona cèl·lula de l'embrió dona lloc a la quarta. Correspon al període de sincronicitat del segon cicle cel·lular, és a dir, des que s'ha produït la primera divisió del segon cicle cel·lular fins a l'última.
t4 - t2	Temps que transcorre entre la primera i la tercera divisió mitòtica, on la segona cèl·lula de l'embrió origina la quarta. Constitueix el període de temps que dura el segon cicle cel·lular.
t5 - t2	Temps des de que apareix la segona cèl·lula de l'embrió fins que s'origina la cinquena. És el període entre la primera divisió mitòtica del primer cicle cel·lular i la primera divisió mitòtica del tercer cicle cel·lular.
t5 - t3	Temps des de que apareix la tercera cèl·lula de l'embrió fins que s'origina la cinquena. Correspon al període entre la primera divisió mitòtica del primer cicle cel·lular i la primera divisió mitòtica del segon cicle cel·lular.
t5 - t4	Temps que representa la primera quarta part del tercer cicle cel·lular, en el qual la quarta cèl·lula de l'embrió es comença a dividir i dona lloc a la cinquè blastòmer.
t8 - t2	Temps que transcorre des del final del primer cicle cel·lular fins el final del tercer cicle cel·lular, és a dir, comprèn el període en què ocorren el segon i el tercer cicle cel·lular complets.
t8 - t3	Temps que transcorre des de la segona divisió mitòtica, en què es dona lloc a la tercera cèl·lula de l'embrió, fins que es produeix la setena divisió mitòtica, en què l'embrió es constitueix de 8 blastòmers.
t8 - t4	Temps que transcorre entre la tercera i la setena divisió mitòtica, on la quarta cèl·lula de l'embrió origina la vuitena. Constitueix el període de temps que dura el tercer cicle cel·lular.
t8 - t5	Correspon al període de sincronicitat del tercer cicle cel·lular, és a dir, des que s'ha produït la primera divisió del tercer cicle cel·lular fins a l'última.
t8 - t6	Període que correspon a la segona meitat del tercer cicle cel·lular de l'embrió, des de que té sis cèl·lules fins que en té vuit.
t8 - t7	Temps que transcorre entre la sisena i la setena divisió mitòtica.
t2 - tPNf	Temps que transcorre des de que desapareixen els pronuclis del zigot fins que es produeix la primera divisió mitòtica.
t3 - tPNf	Temps que transcorre des de que desapareixen els pronuclis fins que l'embrió consta de tres cèl·lules.
t4 - tPNf	Temps que transcorre des de que desapareixen els pronuclis fins que l'embrió consta de quatre cèl·lules.

**Taula 1S (continuació).** Interval de paràmetres morfofocinètics anotats a partir de la monitorització amb *time-lapse* i el seu significat.

Interval	Significat
t5 - tPNf	Temps que transcorre des de que desapareixen els pronuclis fins que l'embrió consta de cinc cèl·lules.
t6 - tPNf	Temps que transcorre des de que desapareixen els pronuclis fins que l'embrió consta de sis cèl·lules.
t7 - tPNf	Temps que transcorre des de que desapareixen els pronuclis fins que l'embrió consta de set cèl·lules.
t8 - tPNf	Temps que transcorre des de que desapareixen els pronuclis fins que l'embrió consta de vuit cèl·lules.
t9 - t8	Temps que transcorre des de que desapareixen els pronuclis fins que l'embrió consta de nou cèl·lules.
tSC - t8	Temps que transcorre des de que finalitza el tercer cicle cel·lular fins que l'embrió es comença a compactar.
tNfCC2 - t2	Constitueix la interfase de la primera divisió mitòtica del segon cicle cel·lular, és a dir, des de que finalitza el primer cicle cel·lular fins que comença una nova divisió mitòtica.
t3 - tNfCC2	Període que correspon a la primera mitosi del segon cicle cel·lular, en què la primera cèl·lula de l'embrió dona lloc a la tercera, és a dir, és el temps des de que desapareix el nucli de la primera cèl·lula de l'embrió fins que es segmenta i apareix la tercera.
tNfCC3 - t3	Temps que transcorre des de que s'ha originat la tercera cèl·lula de l'embrió fins que desapareix el seu nucli interfàsic per donar lloc a la cinquena cèl·lula. Correspon a la interfase de la primera divisió mitòtica del tercer cicle cel·lular
t5 - tNfCC3	Primera mitosi del tercer cicle cel·lular, en què la tercera cèl·lula de l'embrió dona lloc a la cinquena. És el temps que triga des de que desapareix el nucli de la primera cèl·lula de l'embrió fins que es segmenta i apareix la tercera.
tNfCC2 - tNaCC2	Temps que roman el nucli interfàsic de la primera de dues cèl·lules de l'embrió (després de la divisió del zigot), la qual originarà el tercer blastòmer.
tNfCC3 - tNaCC3	Temps que roman el nucli interfàsic de la cinquena cèl·lula de l'embrió, la qual ha estat originada durant el tercer cicle cel·lular.
t2 - it2	Temps que dura la primera divisió mitòtica, és a dir, des de que la primera cèl·lula comença a originar la segona fins que es distingeixen completament separades.
tNfCC2 - tPNf	Temps que transcorre des de que desapareixen els pronuclis fins que desapareix el nucli interfàsic de la primera cèl·lula d'entre els dos blastòmers, la qual cosa iniciarà el segon cicle cel·lular.
tNfCC3 - tPNf	Temps que transcorre des de que desapareixen els pronuclis fins que desapareix el nucli interfàsic de la quarta cèl·lula, la qual cosa iniciarà el tercer cicle cel·lular.
tPNf - tPB2	Període comprès entre la completa separació del segon corpuscle polar i la desaparició dels pronuclis del zigot.
t2 - tPB2	Període comprès entre la completa separació del segon corpuscle polar i la divisió del zigot que origina els dos primers blastòmers.

**Taula 2S.** Quocients de paràmetres morfocinètics anotats a partir de la monitorització amb *time-lapse* i el seu significat.

Quocient	Significat
$t_{NFCC3} - t_3 / t_{NFCC2} - t_2$	Ràtio entre la interfase de la primera divisió mitòtica del tercer cicle cel·lular i la interfase de la primera divisió mitòtica del segon cicle cel·lular.
$t_5 - t_{NFCC3} / t_3 - t_{NFCC2}$	Ràtio entre la primera mitosi del tercer cicle cel·lular i la primera mitosi del segon cicle cel·lular.
$t_5 - t_3 / t_5 - t_2$	Ràtio entre el període entre la primera divisió mitòtica del primer cicle cel·lular i la primera divisió mitòtica del segon cicle cel·lular i el període entre la primera divisió mitòtica del primer cicle cel·lular i la primera divisió mitòtica del tercer cicle cel·lular.
$t_5 - t_2 / t_5 - t_3$	Ràtio entre el període entre la primera divisió mitòtica del primer cicle cel·lular i la primera divisió mitòtica del tercer cicle cel·lular i el període entre la primera divisió mitòtica del primer cicle cel·lular i la primera divisió mitòtica del segon cicle cel·lular.
$t_8 - t_5 / t_4 - t_3$	Ràtio entre el període de sincronicitat del tercer cicle cel·lular fins a l'última i període de sincronicitat del segon cicle cel·lular.
$t_3 - t_{NFCC2} / t_2 - t_{PNf}$	Ràtio entre la primera mitosi del segon cicle cel·lular i el temps que transcorre des de que desapareixen els pronuclis del zigot fins que es produeix la primera divisió mitòtica.
$t_3 - t_{NFCC2} / t_5 - t_{NFCC3}$	Ràtio entre la primera mitosi del segon cicle cel·lular i la primera mitosi del tercer cicle cel·lular.
$t_3 - t_{PNf} / t_3 - t_{NFCC2}$	Ràtio entre el temps que transcorre des de que desapareixen els pronuclis fins que l'embrió consta de tres cèl·lules i la primera mitosi del segon cicle cel·lular.
$t_5 - t_{NFCC3} / t_2 - t_{PNf}$	Ràtio entre la primera mitosi del tercer cicle cel·lular i el temps que transcorre des de que desapareixen els pronuclis del zigot fins que es produeix la primera divisió mitòtica.
$t_5 - t_3 / t_3 - t_2$	Ràtio entre el període entre la primera divisió mitòtica del primer cicle cel·lular i la primera divisió mitòtica del segon cicle cel·lular i el període de la primera divisió mitòtica del segon cicle cel·lular.
$t_5 - t_4 / t_3 - t_2$	Ràtio entre el període de la primera divisió mitòtica del tercer cicle cel·lular i el període de la primera divisió mitòtica del segon cicle cel·lular.
$t_8 - t_4 / t_4 - t_2$	Ràtio entre el tercer i el segon cicle cel·lular.

## Annex 2. Mitjana de les variables d'estudi i significança estadística

**Taula 3S.** Valors de la mitjana i la desviació estàndard de tots els paràmetres, intervals i quocients utilitzats per a la creació del model predictiu segons el grup d'estudi (aneuploide o nascut). La significança estadística està establerta a  $p < 0.05$  (NS: no significatiu; a: t-test, per variables amb distribució normal; b: U de Mann-Whitney, per variables amb distribució no normal).

Paràmetre, interval o quocient	Mitjana $\pm$ SD (h) Aneuploide	Mitjana $\pm$ SD (h) Nascut	<i>p</i> -valor
$t_0$	-	-	-
$t_{PB2}$	$3.28 \pm 1.30$	$2.80 \pm 1.00$	-
$t_{PNa}$	$7.14 \pm 1.09$	$4.59 \pm 2.84$	-
$t_{PNf}$	$23.23 \pm 2.54$	$21.64 \pm 2.66$	$< 0,05^a$
$t_Z$	$23.67 \pm 2.59$	$22.09 \pm 2.80$	$< 0,05^a$

**Taula 3S (continuació).** Valors de la mitjana i la desviació estàndard de tots els paràmetres, intervals i quocients utilitzats per a la creació del model predictiu segons el grup d'estudi (aneuploide o nascut). La significança estadística està establerta a  $p < 0.05$  (NS: no significatiu; a: t-test, per variables amb distribució normal; b: U de Mann-Whitney, per variables amb distribució no normal).

Paràmetre, interval o quocient	Mitjana $\pm$ SD (h) Aneuploide	Mitjana $\pm$ SD (h) Nascut	<i>p</i> -valor
it2	26.14 $\pm$ 3.55	24.13 $\pm$ 2.83	< 0,05 <sup>b</sup>
t2	26.63 $\pm$ 3.53	24.85 $\pm$ 2.86	< 0,05 <sup>b</sup>
tNaCC2	28.26 $\pm$ 3.81	26.24 $\pm$ 3.09	-
tNfCC2	36.18 $\pm$ 4.47	33.80 $\pm$ 3.58	< 0,05 <sup>b</sup>
t3	38.02 $\pm$ 4.58	35.73 $\pm$ 3.57	< 0,05 <sup>b</sup>
t4	39.28 $\pm$ 4.92	36.74 $\pm$ 4.73	< 0,05 <sup>b</sup>
tNaCC3	40.35 $\pm$ 5.11	37.75 $\pm$ 4.78	-
tNfCC3	51.11 $\pm$ 6.58	47.49 $\pm$ 5.13	< 0,05 <sup>b</sup>
t5	52.50 $\pm$ 6.83	49.22 $\pm$ 5.23	< 0,05 <sup>b</sup>
t6	54.29 $\pm$ 7.97	50.69 $\pm$ 5.46	< 0,05 <sup>b</sup>
t7	57.43 $\pm$ 10.11	52.84 $\pm$ 7.13	< 0,05 <sup>b</sup>
t8	60.61 $\pm$ 11.35	55.45 $\pm$ 8.55	< 0,05 <sup>b</sup>
t9	76.19 $\pm$ 9.57	66.34 $\pm$ 14.98	-
tSC	89.15 $\pm$ 7.38	75.33 $\pm$ 21.99	-
t3 - t2	11.38 $\pm$ 2.37	10.88 $\pm$ 1.16	< 0,05 <sup>b</sup>
t4 - t3	1.27 $\pm$ 1.61	1.01 $\pm$ 2.01	< 0,05 <sup>b</sup>
t4 - t2	12.65 $\pm$ 2.20	11.89 $\pm$ 2.55	< 0,05 <sup>b</sup>
t5 - t2	25.87 $\pm$ 4.92	24.48 $\pm$ 3.00	< 0,05 <sup>b</sup>
t5 - t3	14.48 $\pm$ 3.30	13.68 $\pm$ 2.39	< 0,05 <sup>b</sup>
t5 - t4	13.22 $\pm$ 3.72	12.66 $\pm$ 2.50	NS <sup>b</sup>
t8 - t2	34.16 $\pm$ 10.11	30.86 $\pm$ 7.02	< 0,05 <sup>b</sup>
t8 - t3	22.73 $\pm$ 9.74	20.15 $\pm$ 6.78	NS <sup>b</sup>
t8 - t4	21.43 $\pm$ 9.31	19.21 $\pm$ 6.18	NS <sup>b</sup>
t8 - t5	8.54 $\pm$ 9.06	6.56 $\pm$ 6.08	NS <sup>b</sup>
t8 - t6	7.04 $\pm$ 8.97	5.11 $\pm$ 5.53	NS <sup>b</sup>
t8 - t7	3.65 $\pm$ 5.39	2.81 $\pm$ 4.28	NS <sup>b</sup>
t2 - tPNf	3.41 $\pm$ 2.30	3.21 $\pm$ 0.86	NS <sup>b</sup>
t3 - tPNf	14.79 $\pm$ 3.59	14.09 $\pm$ 1.49	< 0,05 <sup>b</sup>
t4 - tPNf	16.06 $\pm$ 3.73	15.10 $\pm$ 3.05	< 0,05 <sup>b</sup>
t5 - tPNf	29.27 $\pm$ 5.76	27.71 $\pm$ 3.41	< 0,05 <sup>b</sup>
t6 - tPNf	31.06 $\pm$ 8.86	29.18 $\pm$ 3.83	< 0,05 <sup>b</sup>

**Taula 3S (continuació).** Valors de la mitjana i la desviació estàndard de tots els paràmetres, intervals i quocients utilitzats per a la creació del model predictiu segons el grup d'estudi (aneuploide o nascut). La significança estadística està establerta a  $p < 0.05$  (NS: no significatiu; a: t-test, per variables amb distribució normal; b: U de Mann-Whitney, per variables amb distribució no normal).

Paràmetre, interval o quocient	Mitjana $\pm$ SD (h) Aneuploide	Mitjana $\pm$ SD (h) Nascut	<i>p</i> -valor
t7 - tPNf	34.31 $\pm$ 9.61	31.38 $\pm$ 5.78	< 0,05 <sup>b</sup>
t8 - tPNf	37.58 $\pm$ 10.70	34.07 $\pm$ 7.44	< 0,05 <sup>b</sup>
t9 - t8	16.04 $\pm$ 8.96	13.73 $\pm$ 6.78	-
tSC - t8	29.17 $\pm$ 10.30	23.62 $\pm$ 10.61	-
tNfCC2 - t2	9.70 $\pm$ 1.78	8.96 $\pm$ 1.12	< 0,05 <sup>b</sup>
t3 - tNfCC2	1.88 $\pm$ 0.43	1.93 $\pm$ 0.37	NS <sup>b</sup>
tNfCC3 - t3	12.95 $\pm$ 2.86	11.96 $\pm$ 2.29	< 0,05 <sup>b</sup>
t5 - tNfCC3	1.74 $\pm$ 0.79	1.70 $\pm$ 0.43	NS <sup>b</sup>
tNfCC2 - tNaCC2	8.07 $\pm$ 2.11	7.56 $\pm$ 1.51	-
tNfCC3 - tNaCC3	10.76 $\pm$ 2.98	9.99 $\pm$ 2.48	-
t2 - it2	0.47 $\pm$ 0.25	0.72 $\pm$ 0.57	< 0,05 <sup>b</sup>
tNfCC2 - tPNf	13.09 $\pm$ 3.27	12.16 $\pm$ 1.40	< 0,05 <sup>b</sup>
tNfCC3 - tPNf	27.95 $\pm$ 5.22	25.99 $\pm$ 3.27	< 0,05 <sup>b</sup>
tPNf - tPB2	19.95 $\pm$ 2.62	18.84 $\pm$ 2.53	< 0,05 <sup>a</sup>
t2 - tPB2	23.35 $\pm$ 3.08	22.07 $\pm$ 2.74	< 0,05 <sup>b</sup>
tNfCC3 - t3 / tNfCC2 - t2	1.45 $\pm$ 1.17	1.36 $\pm$ 0.25	NS <sup>b</sup>
t5 - tNfCC3 / t3 - tNfCC2	0.96 $\pm$ 0.42	0.90 $\pm$ 0.22	NS <sup>b</sup>
t5 - t3 / t5 - t2	0.56 $\pm$ 0.08	0.56 $\pm$ 0.04	NS <sup>a</sup>
t5 - t2 / t5 - t3	1.83 $\pm$ 0.47	1.81 $\pm$ 0.13	NS <sup>a</sup>
t8 - t5 / t4 - t3	17.99 $\pm$ 45.17	15.31 $\pm$ 19.54	NS <sup>b</sup>
t3 - tNfCC2 / t2 - tPNf	0.6 $\pm$ 0.16	0.63 $\pm$ 0.15	NS <sup>a</sup>
t3 - tNfCC2 / t5 - tNfCC3	1.26 $\pm$ 0.61	1.20 $\pm$ 0.40	NS <sup>b</sup>
t3 - tPNf / t3 - tNfCC2	8.28 $\pm$ 2.16	7.54 $\pm$ 1.50	< 0,05 <sup>b</sup>
t5 - tNfCC3 / t2 - tPNf	0.56 $\pm$ 0.26	0.55 $\pm$ 0.15	NS <sup>b</sup>
t5 - t3 / t3 - t2	1.41 $\pm$ 0.87	1.27 $\pm$ 0.21	NS <sup>b</sup>
t5 - t4 / t3 - t2	1.20 $\pm$ 0.62	1.18 $\pm$ 0.21	NS <sup>b</sup>
t8 - t4 / t4 - t2	1.68 $\pm$ 0.65	1.68 $\pm$ 0.56	NS <sup>b</sup>