

DIAGNÓSTICO DE LA PLOIDÍA DEL EMBRIÓN HUMANO ANALIZANDO LA MORFOCINÉTICA EMBRIONARIA CON TECNOLOGÍA TIME-LAPSE

Óscar González Barreda



Trabajo de Fin de Grado
Grado de Biotecnología

Tutora académica: Cristina Reguant Miranda

Tutor profesional: Enric Güell Penas

Facultad de Enología, URV

Tarragona, 17 de junio de 2019

ÍNDICE

1. INFORMACIÓN DEL CENTRO	1
2. RESUMEN	2
3. INTRODUCCIÓN	3
3.1. MARCO TEÓRICO	3
3.2. DIAGNÓSTICO DE CALIDAD EMBRIONARIA POR EL MÉTODO ASEBIR	5
3.3. DIAGNÓSTICO DE CALIDAD EMBRIONARIA POR TECNOLOGÍA TIME-LAPSE	6
3.4. ALGORITMOS DE SELECCIÓN EMBRIONARIA A PARTIR DE TIME-LAPSE	7
3.5. DIAGNÓSTICO DEL ESTADO DE PLOIDÍA DE LOS EMBRIONES	8
4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	11
5. MATERIALES Y MÉTODOS	12
5.1. ESTIMULACIÓN OVÁRICA, EXTRACCIÓN Y DENUDACIÓN DE OVOCITOS E INSEMINACIÓN	12
5.2. CULTIVO DE LOS EMBRIONES Y TIME-LAPSE	14
5.3. DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL	15
5.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	15
6. RESULTADOS	18
7. DISCUSIÓN	28
8. CONCLUSIONES	32
9. BIBLIOGRAFÍA	33
10. AUTOEVALUACIÓN	36
ANEXOS	38

1. INFORMACIÓN DEL CENTRO

El presente estudio se ha realizado en el Instituto Conceptum (Paseo Sunyer, 49 43202, Reus, España). Se trata de un centro de reproducción asistida de ámbito privado nacido en Reus en 1994. El equipo del Instituto Conceptum está formado por profesionales médicos, biólogos y embriólogos, enfermeras y administrativas que se reúnen alrededor del Dr. Josep M^a Ibarz Batet y del Dr. Javier Ruiz Romero.

Esta empresa se centra en el diagnóstico y el tratamiento de problemas de salud relacionados con la fertilidad en hombres y mujeres. El principal objetivo del centro es acercar las técnicas de reproducción asistida a la provincia de Tarragona y conseguir el embarazo de la forma más sencilla posible, teniendo en cuenta la situación fisiológica y económica de las/los pacientes.

El centro cuenta con todas las instalaciones, material y equipamiento necesario para llevar a cabo sus servicios. Entre las instalaciones se encuentra la recepción, los despachos, una unidad de diagnóstico prenatal, el quirófano, la unidad de ginecología, la unidad de andrología y el laboratorio de reproducción asistida. El presente estudio se ha desarrollado en el laboratorio de reproducción asistida donde trabaja el biólogo especialista. El laboratorio está dividido en tres zonas: el laboratorio de andrología, el laboratorio de fecundación in vitro (FIV) y la zona de informática. En el laboratorio de andrología y en el de FIV se ha realizado la parte práctica del proyecto (preparación de las muestras de semen, fecundación de los ovocitos, incubación de los embriones, monitorización de los embriones por tecnología time-lapse, y biopsia embrionaria para realizar el diagnóstico genético preimplantacional). El procesamiento de todos los datos del proyecto se realizó en la zona de informática.

El Instituto Conceptum pone en gran valor las investigaciones realizadas en el laboratorio, la formación continua y la asistencia a congresos puesto que esto repercute en la mejora del éxito clínico de los servicios de la empresa.

2. RESUMEN

En la fecundación in vitro (FIV), la aneuploidía es la principal causa de fallo de implantación del embrión. Por eso, diagnosticar el estado de ploidía de los embriones y seleccionar los embriones euploides para la implantación es esencial. El estado de ploidía se puede diagnosticar mediante el diagnóstico genético preimplantacional (DGP). Sin embargo, el DGP es una técnica invasiva en la que se requiere la biopsia de una célula del embrión. Por eso, surge la necesidad de buscar nuevas técnicas no invasivas que permitan diagnosticar la ploidía de un embrión. El sistema time-lapse (TL) es un dispositivo de fotografía microscópica que realiza una fotografía del embrión en incubación cada cierto tiempo. Todas las fotografías tomadas se recogen en formato cinematográfico y se obtiene un video del desarrollo del embrión. Mediante la tecnología TL, el embrión está continuamente monitorizado de forma que se puede analizar la morfocinética (MC) y la morfodinámica (MD) de este embrión. Esto permite anotar con exactitud el tiempo en el que ocurre cada parámetro morfocinético (PMC). Hay estudios que evidencian la relación entre la MC y el estado de ploidía del embrión. En este estudio, se analizó mediante tecnología TL la MC de 164 embriones, de los que 68 embriones eran aneuploides y 96 euploides. La ploidía de cada embrión se determinó por DGP a día 3 de desarrollo embrionario. Se encuentran diferencias significativas entre la población de embriones euploides y la de aneuploides respecto a varios PMCs e intervalos entre PMCs. Sabiendo que los embriones euploides son significativamente diferentes a los aneuploides respecto a la MC, se desarrollan dos modelos de predicción del estado de ploidía: un modelo de regresión logística binaria que tiene una exactitud del 70,37% y un modelo de regresión de árbol de decisiones que tiene una exactitud del 71,95%. Ambos modelos se han desarrollado a partir de los intervalos: t3-tNfCc2, t5-tPNf y tSC-tPNf. Estos modelos de predicción son algoritmos de selección embrionaria (ASEs) que permiten la selección de los embriones predichos como euploides para la implantación. Por lo tanto, en este proyecto, mediante TL (una técnica no invasiva), se han desarrollado dos ASEs que predicen el estado de ploidía de los embriones y constituyen una herramienta de asesoramiento y una técnica complementaria al DGP.

Palabras clave: FIV, aneuploidía, embrión, DGP, técnica invasiva, TL, MC, PMC, intervalos, ASEs.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. MARCO TEÓRICO

La reproducción asistida es una disciplina médica que consiste en el diagnóstico y el tratamiento de problemas de fertilidad. Se trata de un conjunto de técnicas o métodos biomédicos que facilitan o sustituyen a los procesos naturales que se dan durante la reproducción. En 1978 nació en Reino Unido el primer bebé concebido mediante fecundación *in vitro*. Para ello, se extrajo un ovocito de la madre y se cultivó junto a un espermatozoide en una placa de laboratorio; el ovocito resultó fecundado y se desarrolló un embrión que se transfirió al útero de la madre. Diez años antes de este nacimiento, se realizaron las primeras investigaciones que dieron lugar a la medicina de la reproducción asistida. Por un lado, se desarrolló y se describió el proceso de extracción de ovocitos y por el otro, se desarrolló el método de fertilización de los ovocitos en el laboratorio. A partir del nacimiento del primer “bebé probeta” se abrió un campo de estudio e investigación totalmente nuevo para tratar los problemas de fertilidad que impedían a parejas o mujeres quedarse embarazadas (*What is Assisted Reproductive Technology? | Reproductive Health | CDC*). La infertilidad se define como una enfermedad del aparato reproductor que dificulta conseguir el embarazo clínico después de 12 meses, como mínimo, de práctica sexual regular y sin protección (Mascarenhas *et al.*, 2012). Además, se ha comprobado que la tasa de infertilidad ha ido en aumento debido al retraso a la hora de decidir concebir ya sea por factores sociales o económicos (Datta *et al.*, 2016).

Dentro de las técnicas de reproducción asistida (TRA) se engloban todos los métodos utilizados para tratar y solventar la infertilidad humana: la fecundación *in vitro* (FIV), la transferencia de embriones (TE) y la inseminación artificial (IA). Por lo tanto, las TRA son todos los procedimientos de manipulación que incluyen gametos y embriones. El paso previo a la aplicación de las TRA es la inducción de la ovulación para estimular los folículos ováricos y así conseguir un número óptimo de ovocitos. Esta estimulación consiste en la administración de las hormonas FSH para el crecimiento folicular y hCG (homóloga de la hormona LH) para provocar el pico de ovulación y conseguir el máximo número de ovocitos maduros. Después de la inducción de la ovulación, se puede realizar IA o FIV. En la IA el semen se procesa en el laboratorio mediante la técnica de gradientes de densidad o de swim-up (Jayaraman *et al.*, 2012) y posteriormente, se introduce en el útero de la mujer

mediante una cánula y se espera que, una vez dentro, el espermatozoide fecunde al ovocito *in vivo*. Las técnicas de FIV son las más complejas e invasivas. Consisten en la extracción de ovocitos femeninos maduros para fecundarlos con espermatozoides previamente seleccionados. La fecundación se produce fuera del organismo de la mujer y los embriones resultantes se transfieren al útero (*You searched for glossary | Reproductive Technology Council*). Las técnicas de FIV se clasifican en dos tipos dependiendo de cómo se lleve a cabo la inseminación de los ovocitos: la FIV clásica o convencional (FIVc) y la microinyección espermática intracitoplasmática (ICSI). En la FIVc los ovocitos y los espermatozoides se cultivan juntos y se espera a que se dé la fecundación espontáneamente. En la ICSI un espermatozoide es introducido directamente dentro del citoplasma del ovocito. Una vez los ovocitos han sido fecundados, se lleva a cabo el cultivo del embrión en una incubadora bajo determinadas condiciones (*You searched for glossary | Reproductive Technology Council*). Durante el periodo de incubación, el embrión pasa por distintas fases de desarrollo (Anexo 1. Embriogénesis y fases de desarrollo del embrión humano preimplantacional), se considera que en estadio de mórula (día 4 de cultivo, aproximadamente) el embrión ya puede ser transferido, aunque los embriones se pueden cultivar hasta estadio de blastocisto (día 5-6) (Asebir, Tempranos and Humanos, 2015).

La FIV se realiza cuando otras TRA no han dado resultado o cuando hay causa conocida de la infertilidad. Es muy común que de un ciclo de FIV resulten dos o más embriones. Transferir dos o tres embriones (3 es el número legal máximo en España, Ley 14/2006 (BOE, 2006)) al útero de la paciente es contraproducente (Basile *et al.*, 2014) porque por un lado, los embarazos múltiples conllevan más complicaciones que los simples como por ejemplo, partos prematuros. Por otro lado, uno de los embriones podría abortar de forma espontánea y podría arrastrar en el aborto a los demás embriones implantados. El objetivo de la FIV es maximizar las tasas de implantación y embarazo sin aumentar las tasas de embarazo múltiple. Para lograr este objetivo, la identificación de los embriones euploides con el mejor potencial de embarazo es importante (Kroener *et al.*, 2012). Por ello, si de un ciclo de FIV se obtienen dos o más embriones, es esencial seleccionar para la transferencia el embrión con más probabilidades de éxito en la implantación. Los

demás embriones evolutivos no seleccionados de un mismo ciclo de FIV pueden ser criopreservados.

Además, a pesar de los grandes avances que se han realizado durante los últimos 30 años en medicina reproductiva (introducción de técnicas innovadoras como ICSI, mejora en los medios de cultivos, introducción del diagnóstico genético preimplantacional, mejoras clínicas en la estimulación ovárica...), la Sociedad para la Tecnología de Reproducción Asistida (STRA), por los registros de la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología (ESHRE), estima que solo el 30% de los embriones que se transfieren resultan en embarazo (Basile *et al.*, 2014). Esta reducida tasa de éxito en la implantación se atribuye a diversas causas, aunque el factor embrionario juega un rol clave (Chawla *et al.*, 2014).

Teniendo en cuenta la reducida tasa de éxito de implantación y los problemas asociados a los embarazos múltiples, la identificación y selección del mejor embrión de un ciclo de FIV se convierte en un aspecto clave de la medicina de la reproducción. Por ello, el diagnóstico de la calidad de los embriones en las técnicas de reproducción asistida es un factor crítico a la hora de obtener éxito en la transferencia e implantación de estos embriones puesto que permite identificar y seleccionar los mejores embriones de un ciclo de FIV.

3.2. DIAGNÓSTICO DE CALIDAD EMBRIONARIA POR EL MÉTODO ASEBIR

La selección del mejor embrión para la transferencia es esencial a la hora de aumentar las probabilidades de éxito en la implantación. No hay un criterio estandarizado para diagnosticar la calidad de un embrión, aunque hasta ahora, la mayoría de las clínicas de reproducción asistida en España siguen el método de diagnóstico de calidad de ASEBIR (Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción). Según el método de diagnóstico de calidad embrionaria de ASEBIR, los embriones se pueden categorizar en 4 tipos (A, B, C y D) siendo A un embrión de calidad óptima y con la máxima capacidad de implantación y D un embrión de mala calidad con probabilidad de implantación baja. La categorización debe realizarse tras las múltiples observaciones estáticas realizadas a lo largo del desarrollo preimplantacional, respetando los intervalos de tiempo post-inseminación establecidos. Esta categorización se basa en criterios de desección morfológicos. La observación morfológica del embrión se realiza a día 1, 2, 3, 4, 5 y 6 después de

la FIV. De esta forma, se tiene en cuenta la morfología del embrión antes y después de llegar al estadio de blastocisto (Asebir, 2015). En general, los parámetros considerados para diagnosticar la calidad de un embrión según ASEBIR son: el número de células, el porcentaje de fragmentación, la presencia de células multinucleadas, la presencia de vacuolas embrionarias, la formación de la mórula y la formación del blastocisto.

A pesar de que el análisis de la morfología es el método de evaluación más común para diagnosticar la calidad del embrión, este método tiene un poder predictivo reducido a la hora de determinar cuál es el embrión con máxima capacidad de implantación (Reignier *et al.*, 2018). Esto se debe, principalmente, a la débil relación entre la morfología del embrión y su estado de ploidía, siendo este estado el factor más crítico a tener en cuenta para determinar el éxito de la implantación (Basile *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2017; Reignier *et al.*, 2018). Además, la evaluación estática morfológica presenta una serie de limitaciones. En primer lugar, a pesar de los esfuerzos de estandarización por establecer criterios y terminologías comunes, el análisis morfológico sigue siendo una estrategia de evaluación muy subjetiva inter- e intra-observador. Por otro lado, no se tiene en cuenta lo que ocurre entre los distintos puntos en los que se realiza la evaluación, es decir, no hay una evaluación de la dinámica de la evolución del embrión. En tercer lugar, la morfología del embrión puede variar ampliamente en unas pocas horas, introduciendo una alta variabilidad en la puntuación del embrión (Minasi *et al.*, 2016). Es decir, la evaluación estática morfológica del embrión propuesta por ASEBIR es un método subjetivo, estático y discontinuo en el que hay que interrumpir la incubación de los embriones para llevar a cabo la observación microscópica de estos.

3.3. DIAGNÓSTICO DE CALIDAD EMBRIONARIA POR TECNOLOGÍA TIME-LAPSE

Debido a las limitaciones inherentes al diagnóstico de calidad embrionaria mediante evaluación morfológica estática, surge la necesidad de usar un método de evaluación que sea no invasivo, y que evalúe los cambios morfológicos en el tiempo (morfodinámica) y la velocidad a la que ocurren estos cambios (morfocinética).

La tecnología time-lapse (TL) es un sistema de captura de imágenes microscópicas incorporado a las incubadoras de embriones. Esta tecnología captura una imagen de los embriones en incubación periódicamente (por ejemplo, cada 5 minutos). Las

imágenes se recogen en formato cinematográfico generando un video que muestra la evolución del embrión en incubación. Es, por lo tanto, un software de análisis de imágenes en el que todos los eventos de desarrollo embrionario que se tienen en consideración se anotan junto con el tiempo correspondiente en el que ocurren estos eventos (Meseguer *et al.*, 2011). Actualmente, hay diferentes modelos de sistema TL, y se pueden clasificar dependiendo de si los componentes de fotografía microscópica van integrados en la incubadora (Embryoscope®) o son introducidos en una incubadora convencional (Primo Vision®) (Gallego, *et al.*, 2019).

El sistema TL permite el estudio morfodinámico y morfocinético del desarrollo embrionario preimplantacional. Con este sistema se pueden evaluar aspectos como los tiempos de división, fenómenos anormales que se lleven a cabo durante las divisiones o las duraciones de los ciclos. Esta tecnología se usa cada vez más en el laboratorio de embriología como parte del tratamiento de reproducción asistida (Montag, 2013). Además, numerosos estudios afirman que la variación de los parámetros morfocinéticos, así como la variación de intervalos de estos parámetros pueden ser usados como marcadores para la predicción del potencial de implantación y del estado de ploidía del embrión (Montag, 2013). Un parámetro morfocinético (PMC) es el tiempo que tarda el embrión en realizar un evento determinado desde el tiempo de inseminación, por ejemplo, tSB es el tiempo que tarda el embrión en comenzar a formar el blastocisto desde el tiempo de inseminación. La terminología respecto a los PMCs no está estandarizada, en este proyecto se sigue la terminología expuesta en la Tabla 1. Cabe destacar, que la tecnología TL ha permitido tener en cuenta eventos dinámicos que se ignoraban en el método de diagnóstico tradicional, por ejemplo el tPNf (tiempo en el que desaparecen los pronúcleos desde el tiempo de inseminación) que ha repercutido en numerosos estudios (Meseguer *et al.*, 2011).

3.4. ALGORITMOS DE SELECCIÓN EMBRIONARIA A PARTIR DE TIME-LAPSE

El análisis de la morfocinética (MC) y morfodinámica (MD) de los embriones por TL resulta en una gran cantidad de datos que pueden aplicarse para desarrollar algoritmos que definan la viabilidad, calidad, estado de ploidía o potencial de implantación de un embrión. Estos algoritmos reciben el nombre de algoritmos de selección embrionaria (ASEs). Meseguer (Gallego *et al.*, 2019) realizó el primer

algoritmo de este tipo en el que se obtuvo una conclusión final relevante: el potencial de implantación. Meseguer introdujo el concepto de PMCs con rangos óptimos, donde la aceleración o el retraso del embrión respecto a estos rangos óptimos dieron como resultado un mal pronóstico. Actualmente, se han desarrollado un número de ASEs considerable, pero la mayoría de ellos presentan limitaciones. La limitación más común es que los algoritmos están hechos a partir de una población de embriones reducida y normalmente de una sola clínica (Kirkegaard *et al.*, 2014; Basile *et al.*, 2015). Se ha estudiado la concordancia entre determinados algoritmos diferentes y solo se ha visto que los ASEs concuerdan entre ellos cuando son una versión posterior de otro (Storr *et al.*, 2018). Además, mientras que la validación interna de los ASEs suele ser exitosa, la validación entre centros independientes no lo es (Gallego *et al.*, 2019). Esto hace que los algoritmos no sean universales ni extrapolables al 100% (Kirkegaard *et al.*, 2014). Petersen (Petersen *et al.*, 2016) propone solucionar este problema desarrollando algoritmos que sean capaces de descartar los embriones con un potencial de implantación reducido. Este tipo de algoritmos se podrían aplicar de forma más general.

Los resultados de MC y MD embrionaria de un estudio de TL de una población considerable podrían aplicarse para desarrollar un ASE que seleccione los embriones euploides y descarte los aneuploides. Puesto que el estado de ploidía es el factor más crítico a la hora de determinar el éxito de implantación, esto supondría un nuevo método de diagnóstico de calidad embrionaria.

3.5. DIAGNÓSTICO DEL ESTADO DE PLOIDÍA DE LOS EMBRIONES

Como se ha mencionado anteriormente, el estado de ploidía del embrión es el factor más crítico a tener en cuenta para determinar el éxito de la implantación (Basile *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2017; Reignier *et al.*, 2018). La ploidía es el número de juegos completos de cromosomas en una célula. Una célula con cualquier número de juegos completos de cromosomas se denomina célula euploide. En el caso de las células somáticas humanas euploides hay dos juegos de cromosomas completos (células diploides), cada uno de ellos compuesto por 22 cromosomas somáticos y un cromosoma sexual. Una célula aneuploide presenta un número anormal de cromosomas, por ejemplo, una célula humana que tiene 45 o 47 cromosomas, en lugar de los 46 habituales. En las técnicas de FIV se obtiene un ratio del 40 al 70% de embriones aneuploides, donde la mayoría de estas anomalías cromosómicas

se traducen en un fallo de implantación (Kroener *et al.*, 2012). Por eso, detectar los embriones aneuploides generados en un ciclo de FIV es esencial para poder descartarlos y quedarse solo con los embriones euploides que son los que tienen mayor potencial de implantación después de la transferencia.

Los embriones aneuploides se detectan mediante el diagnóstico genético preimplantacional (DGP). El DGP pretende estudiar la carga genética de una parte biopsiada del embrión. La biopsia se puede realizar a día 3 (cuando el embrión aún no ha llegado a estadio de mórula y las células no han compactado) o a día 5-6 (cuando el embrión está en estadio de blastocisto). En este último caso, la biopsia se realiza de varias células del trofoectodermo para no dañar la masa interna celular que daría lugar al nuevo individuo. El DGP es, por lo tanto, una técnica invasiva (Zaninovic *et al.*, 2017) porque se tiene que interrumpir la incubación del embrión y manipularlo para biopsiar una célula, lo que requiere un alto grado de especialización por parte del manipulador. La naturaleza invasiva de esta técnica hace reducir las tasas de embarazo cuando las biopsias son realizadas en estadios de división (Zaninovic *et al.*, 2017). Sí que produce un aumento de las tasas de embarazo en mujeres a partir de 37 años, puesto que a partir de 35 años las probabilidades de obtener embriones genéticamente anormales son mucho más elevadas (Zaninovic, *et al.*, 2017) y el DGP es una herramienta que serviría para descartar todos los embriones aneuploides. Además, cabe destacar que el resultado del DGP puede no ser representativo de la totalidad del embrión puesto que hay casos en los que se da mosaicismo (Gallego, *et al.*, 2019).

Las limitaciones y problemas asociados al DGP hacen necesario la búsqueda de nuevos métodos no invasivos que permitan identificar los embriones aneuploides. Debido a la dificultad, comentada anteriormente, de correlacionar la morfología del embrión con el estado de ploidía (Basile *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2017; Reignier *et al.*, 2018) es interesante enfocar la búsqueda de estos nuevos métodos en el estudio dinámico del desarrollo del embrión, es decir, estudiar la MC y la MD (Kroener *et al.*, 2012) y explorar si hay diferencias de MC y MD entre embriones euploides y aneuploides. Actualmente, se han realizado ASEs que relacionan la genética con la MC en los que se han estudiado las diferencias de embriones euploides y aneuploides respecto a PMCs antes del DGP en día 3 (Basile *et al.*, 2014) y respecto a PMCs de embriones que se cultivan hasta estadio de blastocisto

(Campbell *et al.*, 2013). A partir de estos algoritmos se pueden desarrollar modelos de riesgo que permitan clasificar los embriones según su MC en euploides y aneuploides (Gallego *et al.*, 2019).

4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La hipótesis del presente estudio es que los embriones euploides son significativamente distintos a los aneuploides respecto a determinados PMCs. Esto implica que hay unos rangos óptimos de los PMCs considerados, y que dentro de estos rangos óptimos se encuentran los embriones euploides. Los embriones aneuploides, por lo tanto, están en su mayoría fuera de estos rangos óptimos. Esto permite la predicción del estado de ploidía de un embrión.

El objetivo principal de este proyecto es desarrollar un modelo predictivo, mediante un estudio estadístico no invasivo, que permita predecir el estado de ploidía de los embriones a partir de las diferencias morfocinéticas entre embriones euploides y aneuploides. Para ello, lo primero es demostrar la hipótesis: comprobar si los PMCs de los embriones euploides y aneuploides presentan diferencias significativas. También se estudiará si hay diferencias significativas respecto a intervalos de PMCs. Si se demuestra la hipótesis se desarrollará un modelo predictivo compuesto por un modelo de regresión logística binaria y un árbol de decisiones. De esta forma, se pretende generar un nuevo método de diagnóstico no invasivo del estado de ploidía del embrión. Esto supone, la generación de un algoritmo de selección embrionaria que tiene como objetivo seleccionar los embriones predichos como euploides para la transferencia.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Se realiza un estudio estadístico a partir de una población de 200 embriones resultantes de las técnicas de FIVc o de ICSI del Instituto Conceptum (Reus, España) entre los años 2014 y 2019. De estos 200 embriones, para el estudio estadístico, se seleccionan todos aquellos embriones a los que se les ha practicado el DGP (n=96). De estos 96 embriones 64 son aneuploides, 4 embriones dan un resultado de DGP caótico y serán considerados igualmente aneuploides, 13 embriones son euploides, y 15 embriones no dan resultado en el DGP debido a que el material genético no amplifica. Al no conocer si este último grupo de embriones es euploide o aneuploide, se descarta del estudio estadístico. También se seleccionan todos aquellos embriones a los que no se les ha realizado DGP pero han implantado correctamente (KID known implantation data, implantación completa) y han resultado en el nacimiento de un bebé sano (n=83). Estos últimos embriones son considerados como euploides porque, como se ha comentado anteriormente, la ploidía es el factor de riesgo más importante a tener en cuenta en el éxito de la implantación, si un embrión tiene un número anormal de cromosomas el éxito de implantación es altamente reducido. Por otro lado, se descartan del estudio estadístico los embriones que han abortado y a los que no se les ha practicado DGP (n=18), esto es porque aunque la aneuploidía puede ser una de las razones del aborto, en este evento también participan otros factores como el estado de salud de la madre, entonces un embrión abortado sin DGP no está claro si es euploide o aneuploide y por eso es eliminado del estudio. Finalmente, se descartan los embriones a los que no se ha hecho DGP e implantaron pero causando un embarazo ectópico (n=3).

En definitiva, en el estudio estadístico entran 164 embriones del total de 200. De estos 164 embriones, 68 son aneuploides (41,46%), y 96 embriones son euploides (58,54%).

5.1. ESTIMULACIÓN OVÁRICA, EXTRACCIÓN Y DENUDACIÓN DE OVOCITOS E INSEMINACIÓN

Para obtener los embriones con los que se realiza el estudio estadístico se han llevado a cabo las técnicas de FIV. Para ello, en primer lugar, se tienen que extraer los ovocitos de la mujer. Para la extracción de ovocitos, previamente, hay que realizar una estimulación ovárica de forma que se aumenten las posibilidades de obtener un número grande de ovocitos maduros en los ovarios. La estimulación

ovárica se realiza administrando FSH y hCG y monitorizando el proceso mediante ecografía de los ovarios y análisis de sangre. Cuando se han desarrollado los ovocitos en los ovarios, se lleva a cabo la punción folicular transvaginal. Esto consiste en realizar una punción de los ovarios para aspirar el líquido folicular donde están los ovocitos. Estos ovocitos se guardan en la incubadora en medio de cultivo de gametos (G-IVF +, Vitrolife, Suecia).

A continuación, los ovocitos que vayan a ser fecundados por ICSI deben ser denudados, es decir, se debe eliminar la corona radiada que los envuelve. La denudación se realiza de forma mecánica mediante una cánula absorbiendo y expulsando los ovocitos en un medio con enzima hialuronidasa (medio HYASE-10X™, Vitrolife, Suecia) que degrada el ácido hialurónico que da consistencia a la matriz de la corona radiada. Los ovocitos que son destinados a FIVc no tienen que ser denudados, puesto que el acrosoma del espermatozoide ya va provisto de hialuronidasa. Una vez los ovocitos se han denudado, se puede proceder a su selección. Se seleccionan los ovocitos maduros (los que tienen un corpúsculo polar) y se descartan los ovocitos inmaduros (los que no tienen corpúsculo) y los anómalos.

Los ovocitos maduros denudados son inseminados por ICSI. En este proceso, se colocan los ovocitos en una gota de medio de manipulación de gametos (medio G-MOPS™, Vitrolife, Suecia) en una placa de ICSI. En otra gota de PVP en la misma placa, se coloca una microgota de semen previamente capacitado. En la placa de ICSI se deposita aceite OVOIL (Vitrolife, Suecia) de forma que se cubran las gotas de medio donde están los gametos; así se impide la evaporación de las gotas, la contaminación y se mantiene la temperatura. A continuación, se lleva a cabo la micromanipulación en el microscopio invertido de ICSI (Nikon DIAPHOT 200). Con la micropipeta de ICSI se absorbe un espermatozoide (se debe absorber aquel que tenga mejores características morfológicas y móviles). Con la micropipeta holding, se fija el ovocito. Después, se inyecta la micropipeta de ICSI dentro del citoplasma del ovocito atravesando la zona pelúcida y se expulsa el espermatozoide que se había absorbido anteriormente. Finalmente, se retira la micropipeta de ICSI con precaución y se obtiene el ovocito fecundado. En el caso de que la inseminación sea por FIVc, el ovocito sin denudar se coloca en una gota de medio de FIV en una placa de FIVc cubierta con aceite OVOIL. En esta misma gota se introduce el semen previamente capacitado y se espera a que se lleve a cabo la fecundación

espontáneamente. Las técnicas de FIV siempre se realizan en ausencia de luz. Los ovocitos fecundados resultantes de las técnicas de FIV deben cultivarse en la incubadora.

5.2. CULTIVO DE LOS EMBRIONES Y TIME-LAPSE

Los ovocitos fecundados se cultivan en placas de TL. Las placas TL son placas con unos pocillos en el centro. En cada pocillo se deposita un ovocito fecundado, los pocillos están cubiertos por una gota de medio G1/G2 o G-TL (Vitrolife, Suecia) y la gota está cubierta por aceite OVOIL. Los ovocitos fecundados en las placas TL se cultivan en las incubadoras (Labotect C200 y Heraeus) bajo las siguientes condiciones: ausencia de luz, 37°C, 6.2% de CO₂ y 94% de humedad relativa. El tiempo de cultivo varía entre embriones. En los embriones a los que se ha realizado DGP el tiempo de cultivo en la mayoría fue de 120-144 horas. Los embriones a los que no se realizó DGP el tiempo de cultivo fue en la mayoría de 72-96 horas.

Las incubadoras donde se realiza el cultivo de los embriones llevan incorporado un sistema TL Primo Vision. La tecnología TL permite la monitorización del cultivo de los embriones. Mediante este sistema se evalúan los eventos morfodinámicos y la MC que se da durante la evolución del embrión. El sistema TL realiza una fotografía microscópica cada 5 minutos, luego las fotografías se recogen en formato cinematográfico. Esto permite tener en consideración una serie de PMCs. En la Tabla 1 se exponen los PMCs evaluados en este estudio. Mediante el software PrimoVision viewer se ha marcado el tiempo al que ocurre cada PMC en cada embrión. Los PMCs están calculados en horas y relativizados respecto al tiempo medio de la ICSI en todos los embriones. Además, también se calculó los intervalos entre los distintos parámetros, destacando los intervalos: t_3-t_2 y t_5-t_3 , ya que corresponden al ciclo celular 2 (Cc2) y 3 (Cc3), respectivamente. También cabe destacar la fase S y la fase M del Cc2: $t_{NfCc2}-t_2$ y t_3-t_{NfCc2} , respectivamente; y la fase S y la fase M del Cc3: $t_{NfCc3}-t_3$ y t_5-t_{NfCc3} , respectivamente. Los PMCs de cada embrión, recogidos gracias al software Primo Vision, se importan a un archivo Excel, luego todos los archivos Excel de los embriones se combinan para tener todos los PMCs de todos los embriones en un mismo documento. Esto facilita el estudio estadístico.

Como el cultivo se ha realizado con distintos medios (G1/G2 o G-TL), se ha comprobado que no hay diferencias significativas entre los PMCs de embriones cultivados en un medio o en otro.

5.3. DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL

El DGP se ha realizado a día 3 de incubación, cuando las células aún no han compactado. Para realizar esta técnica es necesario interrumpir la incubación de los embriones puesto que hay que biopsiar una célula. El embrión que tiene que ser biopsiado se pasa de la placa de TL a una placa con una gota de medio de biopsia sin Ca^{2+} ni Mg^{2+} (G-PGD™, Vitrolife, Suecia). En la misma placa se coloca una gota de ácido separada de la anterior, luego todo se cubre con aceite OVOIL. La placa con los embriones a biopsiar se coloca en el microscopio de ICSI y se lleva a cabo la micromanipulación. En primer lugar, con la micropipeta de ICSI se absorbe ácido de la gota de ácido, luego se fija el embrión a biopsiar con la micropipeta holding. A continuación, mediante la micropipeta de ICSI se expulsa ácido, con precaución, sobre la zona pelúcida del embrión. Se pretende que el ácido destruya la zona pelúcida dejando un hueco a través del cual se pueda biopsiar una célula. Una vez generado el hueco, se introduce la micropipeta de ICSI a través de este y se biopsia una célula. El proceso descrito se denomina *hatching assistant* químico. La célula biopsiada se criopreserva y se envía a la empresa Bioarray que realiza el DGP y envía los resultados. Los resultados del DGP pueden ser: euploide, aneuploide, caótico o no amplifica. Además, también informan sobre el sexo del embrión, y si el embrión es aneuploide, informan sobre el tipo de aneuploidía.

5.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se ha realizado la media y la desviación estándar para cada parámetro e intervalo de todos los embriones euploides y de todos los aneuploides. Se ha realizado un gráfico de líneas para visualizar cómo evoluciona la población de embriones euploides y la de aneuploides respecto a la media de tiempo de cada PMC. Para visualizar como es la distribución de la población de embriones respecto a cada parámetro e intervalo se realizaron histogramas. En función de la distribución de la población se ha aplicado el test t-student o la U de Mann-Whitney con el objetivo de determinar si hay diferencias significativas respecto cada parámetro e intervalo entre la población de embriones euploides y la de aneuploides. Se ha calculado el índice de desviación de la población de embriones euploides y de la de aneuploides para

ver cuáles son los parámetros e intervalos más conservados y comprobar si entre parámetros conservados de embriones euploides y aneuploides hay diferencias significativas. Se han representado diagramas de dispersión comparando parámetros entre sí, intervalos entre sí, y parámetros entre intervalos. Los PMCs e intervalos usados en estos diagramas serán los más conservados. Estos diagramas de dispersión se han hecho diferenciando la población de embriones euploides de la de aneuploides para comprobar si alguna de las comparaciones da como resultado a las dos poblaciones de embriones separadas. A continuación, se han realizado modelos de regresión logística binaria multivariada con distintos PMCs e intervalos mediante *machine learning* para generar un modelo de predicción. La sensibilidad y especificidad de estos modelos se ha expresado mediante la graficación de la curva ROC y el valor AUC. Finalmente, se han realizado árboles de regresión con las combinaciones de PMCs e intervalos que han dado más sensibilidad y exactitud en el modelo de regresión logística y se ha calculado el p-valor y la exactitud de cada árbol. Todos los estudios estadísticos se han realizado con R software y XLSTAT software tomando como valores significativos aquellos que tienen $p\text{-valor} < 0,05$.

Tabla 1. PMCs y su significado.

PMC	Significado
tPB2	Tiempo de aparición del segundo corpúsculo polar.
tPNa	Tiempo de aparición de los pronúcleos.
tPNf	Tiempo en el que empiezan a desaparecer los pronúcleos.
tZ	Tiempo en el que los pronúcleos han desaparecido totalmente.
it2	Tiempo en el que el embrión intenta realizar la primera división mitótica.
t2	Tiempo en el que el embrión completa la primera división mitótica. Se obtiene un embrión de dos células. Se considera el final del Cc1 y el inicio del Cc2. Es el inicio de la fase S del Cc2.
tNaCc2	Tiempo en el que aparece el primer núcleo del Cc2.
tNfCc2	Tiempo en el que desaparece el primer núcleo del Cc2. Se considera el final de la fase S y el inicio de la fase M del Cc2.
t3	Tiempo en el que el embrión completa la segunda división mitótica. Se obtiene un embrión de 3 células. Se considera el final del Cc2 y el inicio del Cc3. Es el final de la fase M del Cc2 y el inicio de la fase S del Cc3.
t4	Tiempo en el que el embrión completa la tercera división mitótica. Se obtiene un embrión de 4 células.
tNaCc3	Tiempo en el que aparece el primer núcleo en el Cc3.
tNfCc3	Tiempo en el que desaparece el primer núcleo del Cc3. Es el final de la fase S y el inicio de la fase M del Cc3.
t5	Tiempo en el que el embrión completa la cuarta división mitótica. Se obtiene un embrión de 5 células. Se considera el final del Cc3 y el inicio del Cc4. Es el final de la fase M del Cc3.
t6	Tiempo en el que el embrión completa la quinta división mitótica. Se obtiene un embrión de 6 células.
t7	Tiempo en el que el embrión completa la sexta división mitótica. Se obtiene un embrión de 7 células.
t8	Tiempo en el que el embrión completa la séptima división mitótica. Se obtiene un embrión de 8 células.
t9	Tiempo en el que el embrión completa la octava división mitótica. Se obtiene un embrión de 9 células.
tSC	Tiempo en el que las células del embrión comienzan a compactar. Se considera el final del Cc4 y el tiempo en el que se empieza a formar la mórula.
tM	Tiempo en el que se forma la mórula completamente.
tSB	Tiempo en el que se empieza a formar el blastocelo y por lo tanto, se empieza a formar el blastocisto.
tB	Tiempo en el que se forma el blastocisto.
tE	Tiempo en el que se produce la primera expansión del blastocisto sobre la zona pelúcida.
tH	Tiempo en el que se empieza a realizar <i>hatching</i> (eclosión de la zona pelúcida y liberación del blastocisto).

Ciray (Ciray *et al.*, 2014) ha sido el referente para seleccionar los PMCs a evaluar y para su nomenclatura. Todos los PMCs son los tiempos del evento en concreto respecto al tiempo medio de la ICSI. Los PMCs están ordenados de arriba abajo según ocurren en el tiempo.

6. RESULTADOS

A partir del análisis de la evolución de los embriones mediante el sistema TL se obtienen una gran cantidad de datos. Esto es porque para cada embrión se han podido establecer los tiempos a los que ocurre cada PMC que se ha considerado en este estudio (Tabla 1). Además, a esto hay que sumarle el cálculo de los intervalos entre PMCs. Una vez se tienen todos estos datos, se puede calcular la media de tiempo de cada PMC e intervalo respecto a la población de embriones aneuploides y la población de embriones euploides (Tabla 2, Anexo2). Una vez calculadas las medias, se realiza un gráfico de líneas que muestra la evolución en el tiempo de cada población respecto a cada media de tiempo de PMC (Fig. 1). Este gráfico sirve para comprobar visualmente si hay diferencias entre la población de embriones euploides y la de aneuploides respecto a los PMCs. En la Fig. 1 se observa como la población de embriones aneuploides tiene para cada media de PMC un valor de tiempo más elevado respecto a la población de embriones euploides, es decir, un embrión aneuploide tarda de media más en alcanzar un PMC determinado que lo que tarda un embrión euploide. Esto se traduce en que la evolución de los embriones aneuploides va retrasada respecto a la evolución de los euploides. También se puede observar que este retraso en la evolución de la población de embriones aneuploides respecto a la de euploides se va incrementando a medida que avanza el tiempo.

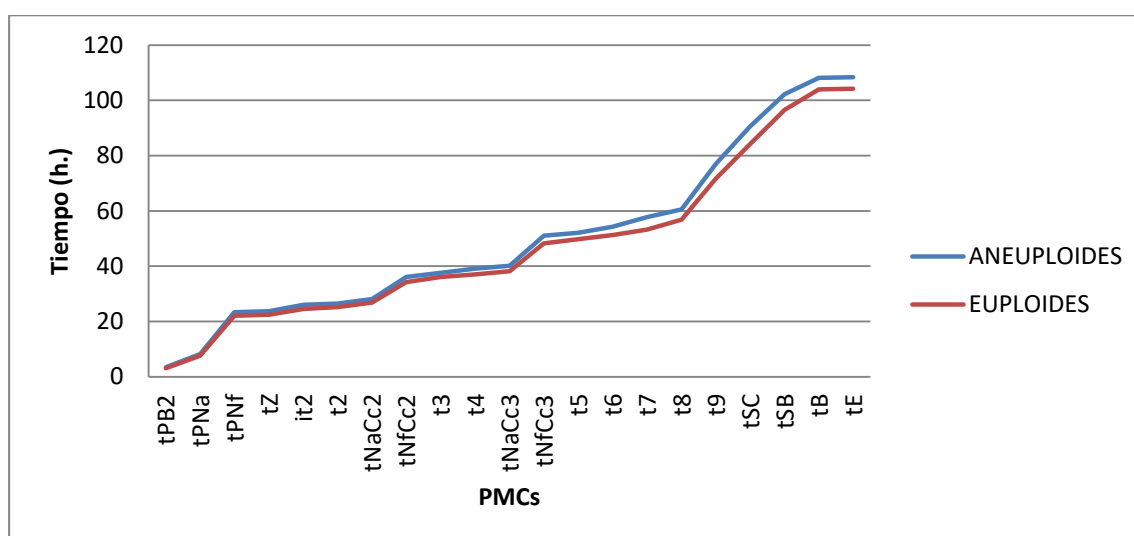


Fig. 1. Gráfico de líneas. En el eje X están los PMCs ordenados de izquierda a derecha según ocurren en el tiempo. En el eje Y se representa el tiempo en horas. El gráfico muestra la evolución de la población de embriones euploides (línea roja) y la de aneuploides (línea azul) respecto a la media de tiempo de cada PMC (Tabla 2, Anexo 2).

Tabla 2. Medias y desviaciones estándar de cada PMC e intervalo respecto a la población de embriones aneuploides y a la de embriones euploides.

PMC	Embriones aneuploides		Embriones euploides		n total	p-valor
	Media $\pm$ D.E. (h.)	n	Media $\pm$ D.E. (h.)	n		
tPNf	23,43 $\pm$ 2,40	68	22,11 $\pm$ 2,57	96	164	<0,05
it2	26,08 $\pm$ 2,53	67	24,53 $\pm$ 2,64	96	163	<0,05
t2	26,50 $\pm$ 2,55	67	25,21 $\pm$ 2,66	96	163	<0,05
tNaCc2	28,14 $\pm$ 3,10	65	26,84 $\pm$ 2,85	94	159	<0,05
tNfCc2	36,09 $\pm$ 2,99	63	34,30 $\pm$ 3,38	95	158	<0,05
t3	37,67 $\pm$ 3,44	68	36,16 $\pm$ 3,45	96	164	<0,05
t4	39,09 $\pm$ 3,47	68	37,08 $\pm$ 3,67	96	164	<0,05
tNaCc3	40,13 $\pm$ 3,52	64	38,19 $\pm$ 3,80	92	156	<0,05
tNfCc3	51,06 $\pm$ 4,96	64	48,25 $\pm$ 4,99	91	155	<0,05
t5	52,11 $\pm$ 5,73	68	49,76 $\pm$ 5,22	93	161	<0,05
t8	60,53 $\pm$ 10,85	63	56,89 $\pm$ 9,67	90	153	<0,05
t9	76,94 $\pm$ 10,23	56	71,68 $\pm$ 10,30	67	123	<0,05
tSC	90,49 $\pm$ 7,35	35	84,17 $\pm$ 8,78	49	84	<0,05
Intervalos entre PMCs						
t3-t2	11,19 $\pm$ 2,75	67	10,95 $\pm$ 1,50	96	163	<0,05
t4-t2	12,62 $\pm$ 2,03	67	11,87 $\pm$ 1,76	96	163	<0,05
t5-t2	25,65 $\pm$ 5,07	67	24,67 $\pm$ 3,50	93	160	<0,05
t8-t5	8,64 $\pm$ 9,15	63	7,31 $\pm$ 6,95	90	153	n.s.
t3-tPNf	14,24 $\pm$ 2,63	68	14,04 $\pm$ 1,62	96	164	n.s.
t5-tPNf	28,68 $\pm$ 5,04	68	27,77 $\pm$ 3,61	96	164	n.s.
tSC-tPNf	66,85 $\pm$ 6,99	35	61,53 $\pm$ 8,31	49	84	<0,05
tSC-t9	12,94 $\pm$ 7,23	35	10,35 $\pm$ 6,32	48	83	n.s.
t3-tNfCc2	1,81 $\pm$ 0,45	63	1,93 $\pm$ 0,52	95	158	n.s.
t5-tNfCc3	1,73 $\pm$ 0,82	64	1,70 $\pm$ 0,61	91	155	n.s.

En esta tabla solo se muestran algunos de los PMCs e intervalos evaluados. La tabla completa está en el Anexo 2.

D.E.: desviación estándar.

Los valores de los PMCs que se han usado para calcular la media de cada PMC se marcaron mediante el software Primo Vision viver y se relativizaron al tiempo medio de la ICSI. La media de la duración de los tiempos de todos los PMCs está calculada en horas.

La diferencia entre medias es significativa si p-valor<0.05, n.s. significa que la diferencia entre medias no es significativa.

Una vez se ha comprobado que la evolución de los embriones euploides es diferente a la de aneuploides, es interesante comprobar si estas diferencias son significativas. Para ello, en primer lugar se realizan histogramas (Fig. 2) en los que se observa la

distribución de la población de embriones euploides y aneuploides respecto a cada PMC o intervalo. Esto se ejemplifica en la Fig. 2A donde se observa que la población total de embriones se distribuye normalmente respecto a t6. En cambio, en la Fig. 2B la población total de embriones se distribuye de forma no paramétrica respecto al intervalo tSB-t8. Si la distribución es normal se aplica el test t-student para comprobar si las diferencias son significativas, si la distribución no es paramétrica se aplica la U de Mann-Withney.

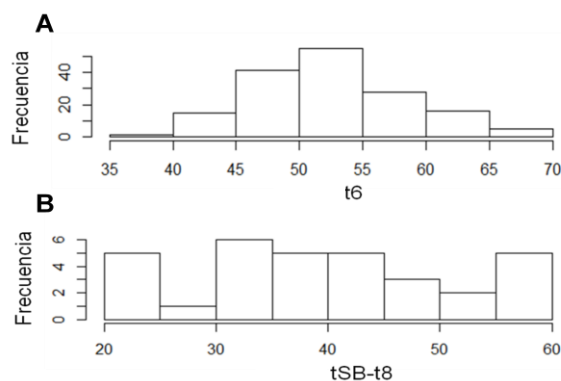


Fig. 2. Distribución de la población total de embriones respecto al PMC t6 (A) y al intervalo tSB-t8 (B). En A la distribución de la población es normal, en B la distribución es no paramétrica.

Como se muestra en la Tabla 2 (Anexo 2), las diferencias entre las poblaciones de embriones euploides y aneuploides son significativas en la mayoría de los PMCs. En el caso de los intervalos no se observan tantas diferencias significativas. La presencia de estas diferencias significativas hace pensar que los embriones pueden ser clasificados en euploides o aneuploides respecto a rangos óptimos de PMCs o de intervalos de PMCs.

A continuación, se calcula el índice de desviación estándar (D.E./media) de cada uno de los PMCs e intervalos para ver cuáles son los más conservados. Esto se hace para la población de embriones euploides y para la de embriones aneuploides. Se obtiene que los más conservados para la población de aneuploides son: tSB, tSC, tNfCc2, tNaCc2, t4, tSB-tPNf, t3, tSB-t2 y t2. Para la población de embriones euploides los PMCs e intervalos más conservados son: tSB, t3, tNfCc2, t4, tNaCc2, tNfCc3, tSC, t5, t2, tNaCc2 e it2. Después, se realizan diagramas de dispersión en los que se representa la población de embriones euploides y la de aneuploides respecto a dos de los PMCs más conservados y que además presenten diferencias significativas entre la población de embriones euploides y la de aneuploides. Lo

mismo se hace respecto a dos de los intervalos más conservados y respecto a una combinación de un intervalo conservado y un PMC conservado. El objetivo de estos gráficos es visualizar la población de embriones euploides y la de aneuploides y ver si estas poblaciones están bien diferenciadas respecto a dos variables, si se da este caso, estas dos variables se podrían usar para predecir el estado de ploidía de un embrión. Se hacen una gran cantidad de diagramas de dispersión que se ejemplifican en la Fig. 3. Como se puede observar en la Fig. 3, las poblaciones no se pueden diferenciar claramente respecto a dos variables. Se deduce, por lo tanto, que dos PMCs o dos intervalos o una combinación de uno de cada uno no son suficientes para separar con claridad las dos poblaciones.

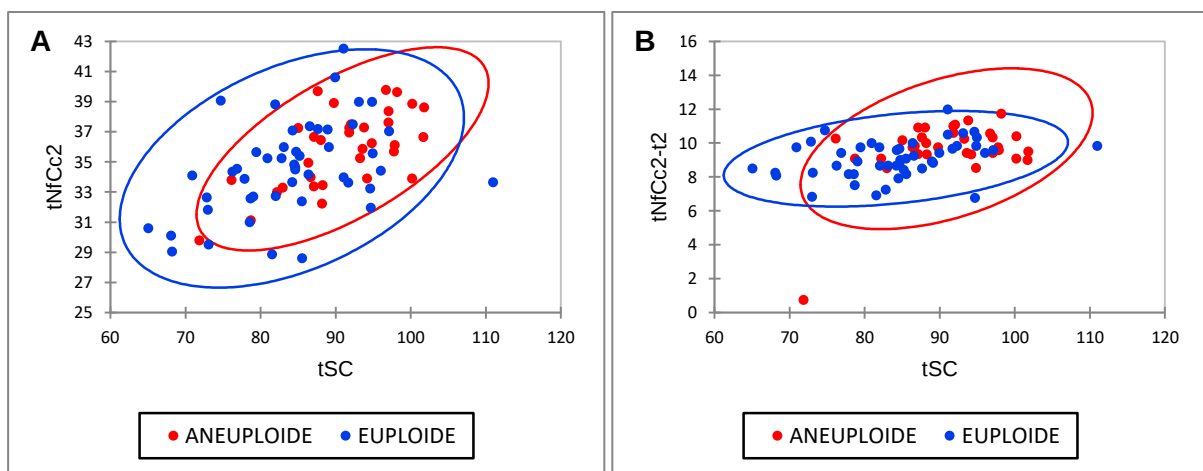


Fig. 3. Diagramas de dispersión. Se muestra la dispersión de la población de embriones euploides (azul) y aneuploides (rojo) respecto a los PMCs tNfCc2 y tSC (A) y respecto a tNfCc2-t2 y tSC (B). Las elipses tienen un intervalo de confianza del 95%.

A continuación, como no se ha podido separar claramente a las dos poblaciones de embriones mediante la representación de los diagramas de dispersión respecto a dos variables (PMCs o intervalos), se realizan modelos de regresión logística binaria mediante *machine learning* con el objetivo de determinar algún PMC o intervalo que sea capaz de clasificar a los embriones en euploides o aneuploides.

La regresión logística binaria es un tipo de análisis de regresión utilizado para predecir el resultado de una variable categórica (embrión euploide o aneuploide) en función de las variables independientes o predictivas (PMCs e intervalos). Se modela, por lo tanto, la probabilidad de que un embrión sea euploide o aneuploide como función de los PMCs y los intervalos. En primer lugar, se realiza el modelo de regresión logística binaria usando solo una variable (un PMC o un intervalo), en este

caso, it2 puesto que es un valor que da diferencia significativa de medias (Tabla 2) y además es un valor bastante conservado en las dos poblaciones. El modelo de regresión queda representado en la Fig.4 y los parámetros resultados de este modelo se encuentran en la Tabla 3. Como se observa en la Tabla 3 el p-valor de it2 es <0,001 lo que significa que este PMC puede ser usado como una variable independiente para clasificar la población de embriones en euploides y aneuploides. A partir de los valores expresados en la columna de Valor de la Tabla 3 se puede deducir la ecuación de predicción.

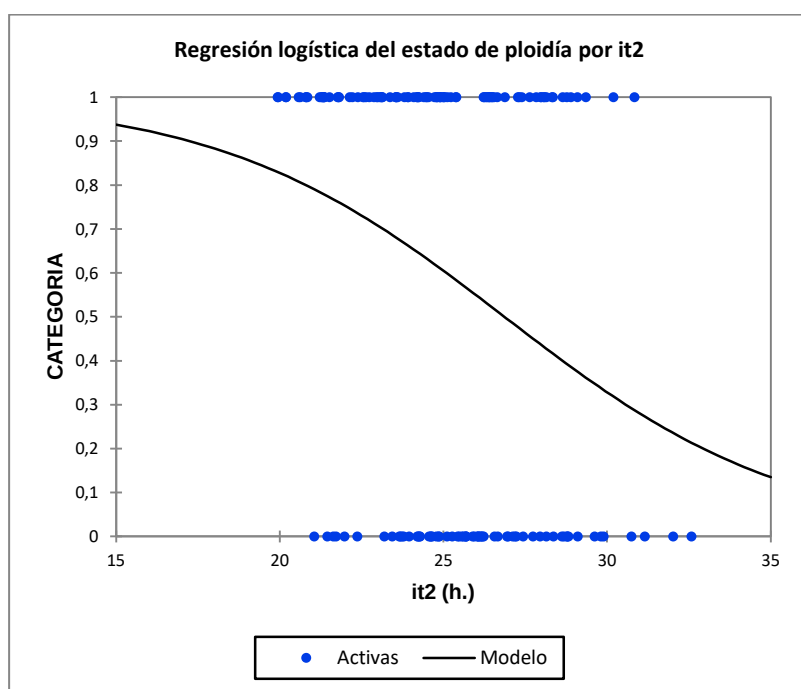


Fig. 4. Modelo de regresión logística binaria. El eje Y se refiere las variables categóricas donde 1 es euploide y 0 es aneuploide; los puntos azules en 1 son la población de embriones euploides, los puntos azules en 0 son la población de embriones aneuploides. En el eje X se representa el tiempo en horas.

Tabla 3. Parámetros del modelo de regresión logística binaria usando como variable independiente it2

Fuente	Valor	P-valor (Chi²)
Intercepción	6,136	<0.001
it2	-0,228	<0.001

P-valor<0,001 es muy significativo.

La ecuación de predicción resultante de este modelo de regresión es:

$$\text{Predicción del estado de ploidía} = \frac{1}{1 + e^{-(6.14 - 0.23 \cdot it2)}}$$

La ecuación anterior se aplica de la siguiente forma: se escoge un caso clínico de un embrión que haya sido monitorizado mediante TL. Gracias a la monitorización TL se puede obtener el valor de it_2 del embrión en cuestión. Este valor se sustituye en la ecuación. Si el resultado de la predicción del estado de ploidía es mayor de 0,5, la ecuación predice que el embrión es euploide, si el resultado es menor que 0,5, se predice que el embrión será aneuploide. Esto se ejemplifica en la gráfica de la Fig. 4, donde en el eje Y por encima de 0,5 los embriones son euploides y por debajo aneuploides. Si se aplica la ecuación anterior a todos los embriones del estudio estadístico de los cuales ya se sabe su estado de ploidía, se obtiene la matriz de confusión expresada en la Tabla 4. En la matriz de confusión de la Tabla 4, se puede observar que el modelo predice los embriones aneuploides con un porcentaje de acierto del 34.33% y los euploides en un 79.17%. El total de los embriones predichos correctamente es del 60.74%.

Tabla 4. Matriz de confusión resultante de la regresión logística binaria usando como variable independiente it_2 .

de \ a	ANEUPLOIDE	EUPLOIDE	Total	% correcto
ANEUPLOIDE	23	44	67	34,33%
EUPLOIDE	20	76	96	79,17%
Total	43	120	163	60,74%

La sensibilidad y especificidad de este modelo se expresa mediante la curva ROC (Fig. 5). Cuanto más específico y sensible sea el modelo de regresión más cercano a 1 será el área de debajo de la curva (AUC). En este caso, el valor de AUC es de 0,66.

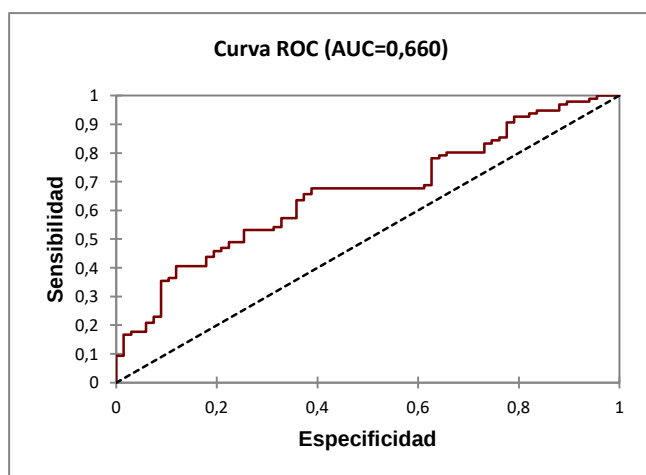


Fig. 5. Curva ROC resultante del modelo de regresión logística binaria usando la variable independiente it_2 . El área de debajo de la curva (AUC) es 0.66.

El modelo de regresión binaria expuesto anteriormente presenta ciertas limitaciones como que la predicción correcta de los embriones aneuploides es bastante defectuosa, además de que según la curva ROC (Fig. 5) el modelo es poco sensible y específico. Este modelo se ha desarrollado, aparte de usando it2 como variable independiente, usando otras variables conservadas y que presentaban diferencias significativas y en todos los casos se obtiene resultados peores o parecidos al modelo anterior. Estos resultados evidencian que no se puede predecir el estado de ploidía de un embrión a partir de una sola variable independiente. Esto corrobora los resultados de la Fig. 3: no se puede predecir el estado de ploidía de un embrión usando solo dos variables porque las poblaciones de los dos tipos de embriones no se visualizan separadas claramente en los diagramas de dispersión.

Por eso, a continuación, se realiza un modelo de regresión logística binaria usando una combinación de 3 variables independientes. Este modelo se realiza con diferentes combinaciones y las que dan mejores resultados son: la combinación 1 (tSC-tPNf, t5-yPNf y t3-tNfCc2) y la combinación 2 (tSC-t9, t5 y t3-tNfCc2).

Tabla 5. Parámetros modelo del modelo de regresión logística binaria obtenidos a partir de las variables independientes de la combinación 1 (tSC-tPNf, t5-tPNf y t3-tNfCc2) y de la combinación 2 (tSC-t9, t5 y t3-tNfCc2).

COMBINACIÓN 1			COMBINACIÓN 2		
Fuente	Valor	P-valor	Fuente	Valor	P-valor
Intercepción	7,94	<0.05	Intercepción	6,785	<0.05
t3-tNfCc2	1,66	<0,05	t5	-0,124	<0.05
t5-tPNf	-0,02	n.s.	t3-tNfCc2	0,564	n.s.
tSC-tPNf	-0.16	<0.001	tSC-t9	-0,100	<0.05

P-valor<0,05 es significativo, p-valor<0,001 es muy significativo.
n.s. es no significativo.

De la combinación 1 se puede observar en la Tabla 5 que tSC-tPNf y t3-tNfCc2 son significativos y que, por lo tanto, influyen en la clasificación de los embriones según su estado de ploidía. En el caso de la combinación 2, las variables que influyen en la clasificación son t5 y tSC-t9. A partir de las columnas de Valor de la Tabla 5, se pueden deducir las ecuaciones de predicción de ambos modelos.

Ecuación de predicción del estado de ploidía a partir de la combinación 1:

$$\text{Predicción del estado de ploidía} = \frac{1}{1 + e^{-(7,94 - 0,02 \cdot (t5 - tPNf) - 0,16 \cdot (tSC - tPNf) + 1,66 \cdot (t3 - tNfCc2))}}$$

Ecuación de predicción del estado de ploidía a partir de la combinación 1:

$$\text{Predicción del estado de ploidía} = \frac{1}{1 + e^{-(6.79 - 0.12 \cdot t5 + 0.56 \cdot (t3 - tNfCc2) - 0.10 \cdot (tSC - t9))}}$$

Aplicando las ecuaciones anteriores a los embriones del estudio estadístico, se obtiene la matriz de confusión del modelo de regresión logística binaria con de cada una de las combinaciones (Tabla 6).

Tabla 6. Matriz de confusión resultante de la regresión logística binaria usando como variables independientes la combinación 1 (tSC-tPNf, t5-tPNf y t3-tNfCc2) y la combinación 2 (tSC-t9, t5 y t3-tNfCc2).

COMBINACIÓN 1				
de \ a	ANEUPLOIDE	EUPLOIDE	Total	% correcto
ANEUPLOIDE	19	14	33	57,58%
EUPLOIDE	10	38	48	79,17%
Total	29	52	81	70,37%
COMBINACIÓN 2				
de \ a	ANEUPLOIDE	EUPLOIDE	Total	% correcto
ANEUPLOIDE	18	15	33	54,55%
EUPLOIDE	8	39	47	82,98%
Total	26	54	80	71,25%

En el modelo de predicción generado por regresión logística binaria usando como variables independientes la combinación 1 se predicen correctamente el 57,58% de embriones aneuploides y el 79,17% de embriones euploides. En total, el porcentaje de acierto es del 70,37%. En cambio, si las variables independientes que se usan son las de la combinación 2, se predicen correctamente el 54,55% de embriones aneuploides y el 82,98% de embriones euploides y el porcentaje total de acierto es del 71,25%.

La especificidad y sensibilidad de cada modelo quedan representadas en las gráficas de la Fig. 6. En la Fig. 6 se puede observar como el modelo de regresión que usa la combinación 1 tiene mayor especificidad y sensibilidad (AUC=0,765) respecto al modelo que usa la combinación 2 (AUC=0,712). Además, el modelo que usa la combinación 1 también predice con más acierto los embriones que son

aneuploides (Tabla 6). A pesar de esto, el modelo que usa la combinación 2 tiene mayor porcentaje de acierto total y de acierto de embriones euploides (Tabla 6).

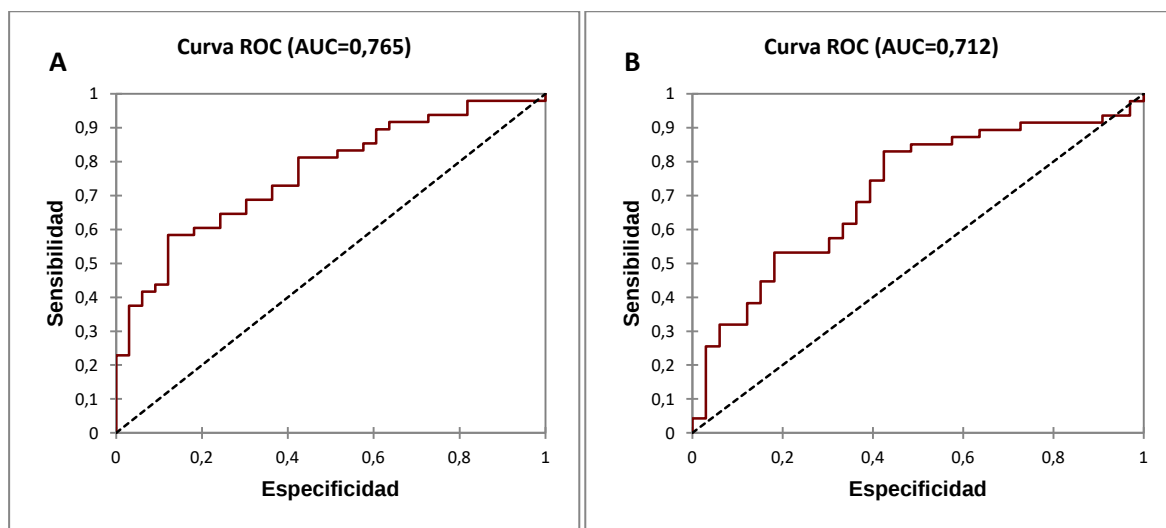


Fig. 6. Curvas ROC resultantes de los modelos de regresión logística binaria usando las variables independientes de la combinación 1 (A) y de la combinación 2 (B).

Los resultados obtenidos de los dos modelos de regresión anteriores son satisfactorios, y en este proyecto se va a usar el modelo de regresión obtenido a partir de las variables independientes de la combinación 1 ya que es más específico y sensible y las variables que usa son muy interesantes: t3-tNfCc2 es el tiempo que dura la fase M del Cc2, t5-tPNf es el tiempo que pasa desde que desaparecen los pronúcleos hasta que el embrión acaba el ciclo celular 3 y tSC-tPNf es el tiempo que pasa desde que desaparecen los pronúcleos hasta que acaba el ciclo celular 4.

A partir de las variables de la combinación 1 se construye un modelo de regresión de árbol de decisión. Un árbol de decisión es un modelo predictivo estadístico que permite mostrar de forma visual un algoritmo que solo contiene instrucciones de control condicional. Según este modelo de predicción, se comprueba si los valores de los PMCs e intervalos escogidos para construir el árbol son mayores o menores respecto a un tiempo determinado. En función de si se cumple el condicional o no, la población de embriones se va distribuyendo por unas ramas u otras del árbol. Si las variables escogidas son adecuadas para diferenciar la población de embriones euploides de la de aneuploides, a medida que se vaya distribuyendo la población se irán acumulando un tipo de embriones u otro en cada hoja.

El árbol de decisión resultante está en la Fig. 7. Como se puede observar, la población total de embriones se va distribuyendo en función de si el valor de tiempo de los intervalos $t_{SC-tPNf}$, t_5-tPNf y $t_3-tNfCc2$ es mayor o menor que el condicional expuesto en la Fig. 7. En las últimas hojas del árbol se puede observar como la proporción de un tipo de embriones (euploides o aneuploides) es mayor respecto al otro tipo. Este árbol tiene una exactitud del 71,95% y un $p\text{-valor} < 0,001$, esto significa que este árbol puede ser usado para clasificar la población de embriones según su estado de ploidía. Con este árbol se puede predecir el estado de ploidía de un embrión. Por ejemplo, si un embrión presenta $t_{SC-tPNf}$ menor a 64 horas y un $t_3-tNfCc2$ mayor o igual a 1,8 horas, según el árbol de decisiones este embrión será euploide, y además, esto se puede decir con gran seguridad, puesto que el 91% de embriones que cumplen estos condicionales son euploides.

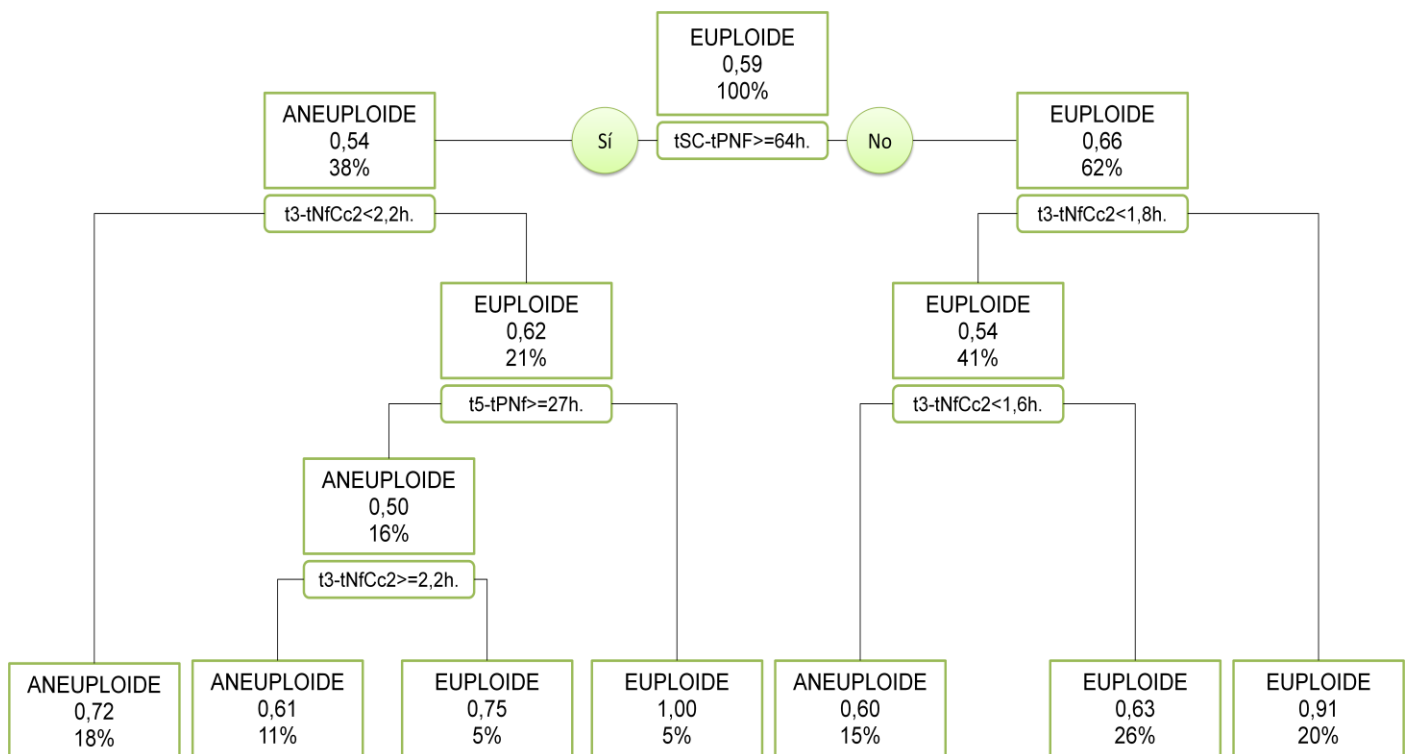


Fig. 7. Árbol de decisiones. Este árbol se ha construido a partir de los valores de las variables independientes $t_3-tNfCc2$, t_5-tPNf y $t_{SC-tPNf}$ de cada embrión. Si un embrión cumple el condicional se desplaza por las ramas de la izquierda, si no, lo hace por las ramas de la derecha. En una hoja, el letrero marca el tipo mayoritario de embriones que hay en ese recuadro. La proporción se refiere a la proporción del tipo mayoritario de embriones de una hoja. El porcentaje se refiere a la cantidad de población total de embriones que hay en cada hoja. Por ejemplo, en la hoja de abajo del todo a la derecha hay un 20% de la población total de embriones y de este 20%, hay una proporción de 0,91 embriones euploides respecto 0,09 aneuploides. Esto se traduce en lo siguiente: siguiendo el algoritmo de este árbol, es probable que el 20% de embriones de una clínica tengan un $t_{SC-tPNf}$ menor a 64 horas y un $t_3-tNfCc2$ mayor o igual a 1,8 horas, y que de este 20% la gran mayoría de embriones serán euploides, en concreto 9,1 embriones euploides de cada 10.

7. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que t3-tNfCc2, t5-tPNf y tSC-tPNf son variables esenciales a la hora de desarrollar un modelo de predicción del estado de ploidía de los embriones. En el caso del modelo de regresión logística, se obtiene un porcentaje de acierto del 70,37% y en el del árbol de regresión el porcentaje de acierto es del 71,95%. Ambos modelos predicen con más exactitud los embriones euploides, mientras que son más defectuosos en la predicción de los embriones aneuploides. Esto se puede comprobar observando el árbol de regresión (Fig. 7). Las hojas de abajo del todo que predicen embriones euploides, lo hacen con una mayor proporción de este tipo de embriones (0,75, 1 y 0,91) y solo una hoja predice embriones euploides en una proporción del 0,63. En cambio, las hojas de abajo del todo que predicen embriones aneuploides lo hacen con proporciones más reducidas donde la más alta solo llega al 0,72 y las otras 3 rondan la proporción de 0,6. Cabe mencionar que el análisis de la MC mediante el sistema TL aun es una técnica inexacta y con escasa validación como modelo predictivo (debido, principalmente, a la reciente implantación de la tecnología TL en los laboratorios de embriología hace unos 10 años). Por eso, la predicción de la aneuploidía es un aspecto a mejorar con la mejora de las técnicas de análisis TL y los modelos predictivos desarrollados en este estudio se enfocan como herramientas de selección de embriones euploides. De esta forma, se da más importancia a los valores predictivos de la euploidía que tienen un porcentaje de acierto mayor y que, por lo tanto, darán como resultado un mayor número de verdaderos positivos.

Los intervalos que se han usado (t3-tNfCc2, t5-tPNf y tSC-tPNf) para construir los modelos de predicción de este estudio se corresponden con estudios previos de modelación de riesgo de aneuploidías en embriones (Campbell *et al.*, 2013; Basile *et al.*, 2014). Campbell (Campbell *et al.*, 2013) determinó que muchos embriones aneuploides presentaban un retraso de la evolución a partir de tSC, es decir, en las fases tardías de evolución del embrión preimplantacional. De hecho, encontró diferencias significativas en tSC, tSB y tB entre la población de embriones euploides y la de aneuploides. A partir de tSB y tB, realizó un modelo de riesgo en el que clasificaba a los embriones según el riesgo bajo, medio o alto de padecer aneuploidías. Se intuye que el retraso a partir de tSC se debe a que a partir de este tiempo, hay un aumento de la actividad metabólica, hay activación génica y se están

produciendo muchas divisiones celulares muy rápido. Si hay anomalías cromosómicas, como en el caso de los embriones aneuploides, todos estos procesos se podrían retrasar debido a procesos celulares de detección de errores genéticos y a la actuación del sistema de reparación. Campbell mencionaba tSC como uno de los PMCs a tener en cuenta a la hora de construir un modelo de riesgo, y en este estudio se ha seleccionado tSC-tPNf como uno de los intervalos determinantes para predecir la ploidía del embrión. También se podría haber seleccionado tSB o tB, pero la población de embriones de este estudio que alcanzaba estos PMCs era muy reducida (Anexo 2) y, por lo tanto, se perdía demasiada fiabilidad.

Basile (Basile *et al.*, 2014) desarrolló un modelo de riesgo de aneuploidías con sus propios datos y determinó que las diferencias significativas entre embriones euploides y aneuploides estaban en t5, t5-t2, t3-t2 y t5-t3 y seleccionó t5-t2 y t5-t3 para desarrollar su modelo de riesgo. En este caso, las variables t3-tNfCc2 y t5-tPNf se corresponden con la propuesta de Basile de que las diferencias significativas entre embriones euploides y aneuploides se encuentran en las fases de desarrollo temprano del embrión preimplantacional. Campbell (Campbell *et al.*, 2013) argumenta que en los primeros estadios de división, al producirse divisiones mucho más espaciadas en el tiempo, a pesar de que haya anomalías cromosómicas, los embriones aneuploides no se salen del rango normal de tiempo en el que se pueden realizar las primeras divisiones y, por lo tanto, no se pueden observar diferencias significativas. Sin embargo, los resultados del estudio de Basile (Basile *et al.*, 2014) rebaten este argumento. Además, el estudio de Basile se apoya en una $n=502$, mientras que el de Campbell en una $n=98$, lo que da más poder estadístico y fiabilidad a Basile. Por otra parte, el retraso de los embriones aneuploides en las fases tempranas de desarrollo se debe, principalmente, a que el ovocito ya presenta anomalías cromosómicas de serie, por lo tanto, una vez fecundado, la maquinaria de división celular que se debe activar en los embriones aneuploides se ve retrasada debido a estas anomalías. Con todo y eso, las causas del retraso de la evolución de un embrión aun están por estudiarse más profundamente.

Como se ha comentado anteriormente, los dos algoritmos de riesgo de aneuploidías desarrollados hasta el momento (Campbell *et al.*, 2013; Basile *et al.*, 2014) difieren en los PMCs o intervalos escogidos respecto a fases tempranas o tardías de la

evolución del embrión. En este estudio, en cambio, se observan diferencias significativas tanto en fases tempranas como en tardías, por lo tanto, los resultados de este proyecto se pueden apoyar en el estudio de Basile y en el de Campbell. Además, los intervalos escogidos (t3-tNfCc2, t5-tPNf y tSC-tPNf) resultan muy interesantes puesto que demuestran que los embriones aneuploides presentan una evolución retrasada respecto a los euploides desde la fase M del Cc2 y que este retraso se mantiene en el final del Cc3 y del Cc4.

Por otro lado, como argumenta Basile (Basile *et al.*, 2014), si uno de los PMCs o intervalos que se usan para construir el modelo de predicción están por encima del día 3 y la biopsia para el DGP se realiza a día 3, el modelo predictivo dará el resultado después del DGP. Esto, sin embargo, no supone un problema puesto que los algoritmos desarrollados en este proyecto son una técnica complementaria al DGP, no una técnica sustitutiva. Esto se debe a que el objetivo de los algoritmos desarrollados es la selección de los embriones euploides, mientras que el DGP es una técnica que sirve para la desección de los embriones aneuploides. Además, el DGP es una técnica que puede dar falsos positivos y falsos negativos debido a la existencia de mosaicismo en algunos embriones. De hecho, Lawrenz (Lawrenz *et al.*, 2019) estudió la concordancia de resultado de DGP practicando una biopsia de un embrión a día 3 y una biopsia del trofoectodermo del mismo embrión en estadio de blastocisto. Este estudio demostró que solo el 59,5% de los resultados presentaban concordancia, mientras que el 40,4% eran discordantes comparando una biopsia con otra y que en la mayoría de casos en los que los resultados eran discordantes, los embriones habían pasado de ser diagnosticados como aneuploides a diagnosticarse como euploides. Sabiendo esto, una técnica complementaria al DGP podría servir para confirmar el resultado del DGP. De la misma forma, sería muy interesante realizar un estudio prospectivo de aquellos embriones que se han diagnosticado como aneuploides por DGP a día 3, y que los algoritmos propuestos en este proyecto los han diagnosticado como euploides. Este estudio consistiría en rebiopsiar los embriones en estadio de blastocisto para volver a hacer el DGP y ver si el resultado del DGP del blastocisto concuerda más con el primer resultado de DGP o con la predicción de los algoritmos. De esta forma, se podría comprobar si los algoritmos desarrollados en este proyecto, que tienen en cuenta tSC-tPNf (un intervalo que cuenta con un PMC más allá de día 3), son capaces de predecir

correctamente los embriones mosaicos diagnosticados como aneuploides por DGP a día 3, y diagnosticados como euploides por DGP a día 5.

Por otro lado, cabe destacar el potencial de la tecnología TL como técnica no invasiva para el diagnóstico del estado de ploidía de los embriones. Mediante este sistema se pueden anotar con bastante exactitud los PMCs a evaluar en el estudio y analizar las diferencias entre unos embriones y otros. Permite el estudio continuo del embrión desde la inseminación del ovocito hasta la formación del blastocisto y gracias a ello, se pueden calcular intervalos como los usados en los modelos predictivos de este estudio. Gracias a los intervalos calculados a partir del TL se han desarrollado dos ASEs de embriones euploides con un 70,37% (modelo de regresión logística binaria) y un 71,95% de exactitud (modelo de árbol de regresión). A continuación, hacen falta estudios prospectivos que confirmen la exactitud de los ASEs con casos clínicos y que aumenten la *n* de la que parten los algoritmos.

Finalmente, se tiene que mencionar que estos algoritmos son difícilmente extrapolables a otras clínicas de reproducción asistida que no sean el Instituto Conceptum (Reus, España) puesto que, como se ha mencionado anteriormente, la variación intrínseca y extrínseca (respecto a ambiente de laboratorio, medios usados, técnicas practicadas, sistema TL, incubadoras, variación intra- e interindividual en anotar los PMCs, ...) es un factor muy importante a tener en cuenta en la falta de concordancia de un ASE entre clínicas. Por ello, es interesante realizar estudios como el presentado en este proyecto pero en el que se aglutinen datos de muchos centros, entonces se partiría de una *n* mucho más grande. Esto da más fiabilidad estadística y el ASE obtenido podría aplicarse de forma más general puesto que es el resultado de los datos de muchas clínicas distintas. Otra propuesta a tener en cuenta sería el desarrollo de un algoritmo de desección de los embriones aneuploides, es decir, un algoritmo que sea capaz de predecir con gran exactitud los embriones aneuploides y que esto sirva para descartarlos a la hora de realizar la transferencia. Según Petersen (Petersen *et al.*, 2016), los algoritmos de desección son más fácilmente extrapolables.

8. CONCLUSIONES

El diagnóstico del estado de ploidía mediante la tecnología TL es un método no invasivo que no debe considerarse en ningún momento una técnica sustitutiva del DGP. Sin embargo, puede considerarse una buena herramienta para la selección de los embriones euploides en pacientes fuera del grupo de riesgo que no requieren DGP o en pacientes que sí lo requieren pero que por motivos económicos, legales, sociales o culturales, lo rechazan. Por lo tanto, se trata de una herramienta de asesoramiento. En estos pacientes, el uso de los ASEs desarrollados en el presente estudio podría aumentar las probabilidades de éxito de la implantación.

En los pacientes a los que sí se realiza el DGP al embrión, los ASEs deben ser considerados como técnicas complementarias de selección embrionaria. Por una parte, con el DGP se descartarían los embriones aneuploides y por otra, con el ASE se podrían seleccionar aquellos que tengan más probabilidades de ser euploides, por ejemplo, si de varios embriones diagnosticados como euploides por el DGP, uno presenta $t_{SC-tPNf} \geq 64h.$, $t_3-tNfCc2 \geq 2,2h.$ y $t_5-tPNf < 27h.$, escogeríamos este, puesto que según el árbol de decisiones (Fig. 7) tiene el 100% de posibilidades de ser euploide.

Para concluir, queda demostrado que a partir del análisis de la MC de los embriones por TL se pueden desarrollar modelos de predicción del estado de ploidía con porcentajes de acierto considerables. A pesar de ello, y de que el estado de ploidía es el factor más crítico a tener en cuenta en la viabilidad del embrión, también intervienen muchos más factores. Por eso, los algoritmos desarrollados en este estudio solo intervienen en cierta medida en el diagnóstico de la viabilidad del embrión. Si se quiere garantizar un buen diagnóstico de la viabilidad de un embrión, a los algoritmos desarrollados, habría que sumar el DGP, el análisis de la metabolómica, proteómica, de las concentraciones de oxígeno y de los miRNAs, el estudio de la morfología, y el estudio del estado de las mitocondrias.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Asebir, C., Tempranos, E. and Humanos, B. (2015) 'Cuadernos de embriología clínica'.
- Basile, N. *et al.* (2014) 'Increasing the probability of selecting chromosomally normal embryos by time-lapse morphokinetics analysis', *Fertility and Sterility*. Elsevier Inc., 101(3), pp. 699-704.e1. doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.12.005.
- Basile, N. *et al.* (2015) 'The use of morphokinetics as a predictor of implantation: A multicentric study to define and validate an algorithm for embryo selection', *Human Reproduction*, 30(2), pp. 276–283. doi: 10.1093/humrep/deu331.
- BOE (2006) 'Ley 14/20106, De 26 De Mayo, Sobre Técnicas De Reproducción Humana Asistida.', *Boletín Oficial del Estado*, pp. 1–21. Available at: <https://www.boe.es/buscar/pdf/2006/BOE-A-2006-9292-consolidado.pdf>.
- Campbell, A. *et al.* (2013) 'Modelling a risk classification of aneuploidy in human embryos using non-invasive morphokinetics', *Reproductive BioMedicine Online*. Reproductive Healthcare Ltd., 26(5), pp. 477–485. doi: 10.1016/j.rbmo.2013.02.006.
- Chawla, M. *et al.* (2014) 'Morphokinetic analysis of cleavage stage embryos and its relationship to aneuploidy in a retrospective time-lapse imaging study', *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 32(1), pp. 69–75. doi: 10.1007/s10815-014-0372-3.
- Ciray, H. N. *et al.* (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. doi: 10.1093/humrep/deu278.
- Datta, J. *et al.* (2016) 'Prevalence of infertility and help seeking among 15 000 women and men', *Human Reproduction*, 31(9), pp. 2108–2118. doi: 10.1093/humrep/dew123.
- Gallego, R. *et al.* (2019) 'Time-lapse imaging: the state of the art', *Biology of Reproduction*. doi: 10.1093/biolre/iox035.
- Jayaraman, V. *et al.* (2012) 'Sperm processing by swim-up and density gradient is effective in elimination of sperm with DNA damage', *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 29(6), pp. 557–563. doi:

10.1007/s10815-012-9742-x.

- Kirkegaard, K. *et al.* (2014) 'Limitations of a time-lapse blastocyst prediction model: A large multicentre outcome analysis', *Reproductive BioMedicine Online*. Reproductive Healthcare Ltd., 29(2), pp. 156–158. doi: 10.1016/j.rbmo.2014.04.011.
- Kroener, L. *et al.* (2012) 'The effect of timing of embryonic progression on chromosomal abnormality', *Fertility and Sterility*, 98(4), pp. 876–880. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.06.014.
- Lawrenz, B. *et al.* (2019) 'The clinicians ' dilemma with mosaicism — an insight from inner cell mass biopsies', 34(6), pp. 998–1010. doi: 10.1093/humrep/dez055.
- Mascarenhas, M. N. *et al.* (2012) 'National, Regional, and Global Trends in Infertility Prevalence Since 1990: A Systematic Analysis of 277 Health Surveys', *PLoS Medicine*, 9(12), pp. 1–12. doi: 10.1371/journal.pmed.1001356.
- Meseguer, M. *et al.* (2011) 'The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation', *Human Reproduction*, 26(10), pp. 2658–2671. doi: 10.1093/humrep/der256.
- Minasi, M. G. *et al.* (2016) 'Correlation between aneuploidy, standard morphology evaluation and morphokinetic development in 1730 biopsied blastocysts: A consecutive case series study', *Human Reproduction*, 31(10), pp. 2245–2254. doi: 10.1093/humrep/dew183.
- Montag, M. (2013) 'Morphokinetics and embryo aneuploidy: Has time come or not yet?', *Reproductive BioMedicine Online*. Reproductive Healthcare Ltd., 26(6), pp. 528–530. doi: 10.1016/j.rbmo.2013.03.011.
- Petersen, B. M. *et al.* (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. doi: 10.1093/humrep/dew188.
- Reignier, A. *et al.* (2018) 'Can time-lapse parameters predict embryo ploidy? A systematic review', *Reproductive BioMedicine Online*. Elsevier Ltd, 36(4), pp. 380–387. doi: 10.1016/j.rbmo.2018.01.001.
- Storr, A. *et al.* (2018) 'Time-lapse algorithms and morphological selection of

day-5 embryos for transfer: a preclinical validation study', *Fertility and Sterility*. Elsevier Inc., 109(2), pp. 276-283.e3. doi: 10.1016/j.fertnstert.2017.10.036.

- *What is Assisted Reproductive Technology? | Reproductive Health | CDC* (no date). Available at: <https://www.cdc.gov/art/whatis.html>
- *You searched for glossary | Reproductive Technology Council* (no date). Available at: <https://www.rtc.org.au/?s=glossary&searchsubmit=>
- Zaninovic, N. et al. (2017) 'Assessment of embryo morphology and developmental dynamics by time-lapse microscopy: is there a relation to implantation and ploidy?', *Fertility and Sterility*. Elsevier Inc., 108(5), pp. 722–729. doi: 10.1016/j.fertnstert.2017.10.002.
- Zhang, J. et al. (2017) 'Morphokinetic parameters from a time-lapse monitoring system cannot accurately predict the ploidy of embryos', *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. Journal of Assisted Reproduction and Genetics, 34(9), pp. 1173–1178. doi: 10.1007/s10815-017-0965-8.

10. AUTOEVALUACIÓN

Con la realización de este estudio se pretendía tener un mayor conocimiento de la medicina de la reproducción asistida, en concreto, de todo aquello que engloba al laboratorio de embriología. Por lo tanto, entre las expectativas estaba: aumentar mi conocimiento sobre la biología de la reproducción humana, puesto que es un ámbito que no se desarrolla mucho durante el grado; hacer un ejercicio de redacción original y adecuado con el propósito del trabajo de fin de grado; ampliar mis conocimientos sobre estadística y lo que es más importante, saber aplicarlos al mundo de la biología; comprender la importancia de la formación continua mediante la lectura de artículos, revistas y la asistencia a congresos para conocer los temas más de moda y conocer otros interesantes para realizar nuevos estudios; por último, saber discernir la información interesante de un artículo para la realización de este estudio, y trabajar la búsqueda y la citación de la bibliografía.

Las expectativas se han cumplido en su totalidad. La búsqueda de una gran cantidad de artículos en Pubmed me ha permitido conocer de primera mano la base de datos y cuáles son las palabras clave más interesantes a buscar cuando se quiere obtener información sobre la biología de la reproducción asistida humana. Gracias a la lectura de muchos artículos he aprendido a saber buscar la información de mi interés dentro de estos artículos y a interpretar un gran número de tablas y gráficos. De la misma forma, la búsqueda bibliográfica resulta en una ampliación de mis conocimientos sobre la biología de las técnicas de reproducción asistida. Por otro lado, el ejercicio de redacción de un texto largo original, me ha permitido mejorar mis técnicas de redacción y adaptarlas al ámbito del trabajo de fin de grado. Además, la realización de este trabajo ha repercutido en dos aspectos muy importantes: la mejora de los conocimientos de estadística y la desenvoltura al laboratorio. Por una parte, he aprendido a trabajar con programas estadísticos como R software o XLSTAT, en ambos programas he aprendido a aplicar la estadística a la biología de mi trabajo y a comprender por qué y cómo se aplica esta estadística. Finalmente, por otra parte, he desarrollado desenvoltura y confianza en el ambiente del laboratorio y en el trabajo que allí se realiza.

En mi opinión, el estudio tiene una buena estructura y está bien desarrollado y los resultados obtenidos son prometedores. El trabajo de fin de grado me ha supuesto una oportunidad para desarrollar en mayor o menor medida todas las expectativas

comentadas anteriormente. Además, tener que realizar este trabajo ha sido un punto muy influyente en la búsqueda de la realización de prácticas en una empresa externa. Por ello, valoro muy positivamente este ejercicio y creo que es una oportunidad que me ha servido para desarrollar una serie de habilidades y conocimientos muy interesantes cara al mundo profesional y científico.

ANEXOS

ANEXO 1. Embriogénesis y fases de desarrollo del embrión humano preimplantacional.

Día 1

Una vez se ha inseminado un ovocito secundario maduro por las técnicas de FIV, si la inseminación es exitosa, el ovocito secundario resulta fecundado (Fig. 8A) y acaba la segunda meiosis dando lugar a la aparición del segundo corpúsculo polar (Fig. 8B) unas 3 horas después de la inseminación.

El resultado es un embrión unicelular o cigoto. Unas 4 o 5 horas más tarde se pueden visualizar los dos pronúcleos (uno del óvulo y el otro del espermatozoide) (Fig. 8C). Los dos pronúcleos desaparecen a las 23,5 horas después de la inseminación. Esto se debe a que la estructura nuclear se desintegra y el material genético se prepara para la primera división mitótica.

Día 2

La primera división mitótica (t2) se suele producir al inicio del día 2 de desarrollo, después de la fecundación. Después de la división, se obtiene un embrión de dos células (Fig. 8D) y se empieza la fase S del ciclo celular 2, la estructura nuclear vuelve a organizarse y aparecen los núcleos de ambas células (tNfCc2). Cuando los núcleos de las dos células desaparecen quiere decir que la estructura nuclear se ha desorganizado y que la célula se prepara para mitosis, por tanto se termina la fase S y empieza la fase M del ciclo celular 2.

Se produce la segunda división mitótica unas 36 horas después de la fecundación y se obtiene un embrión de 3 células. Casi seguidamente (1 hora después) se produce la tercera división mitótica y se obtiene un embrión de 4 células (Fig. 8E). El embrión de 4 células se estabiliza durante unas 10 o 12 horas.

Día 3

Al inicio del día 3 de desarrollo se produce la cuarta división mitótica y se obtiene un embrión de 5 células.

Cuando acaba el día 3 de desarrollo, el embrión se suele componer de 8 células (Fig. 8F). Aunque a las 72 horas de desarrollo después de la fecundación hay mucha variación entre el número de células de los embriones. Hay algunos que aun tienen 5 células y hay otros que ya tiene más de 9 (Fig. 8G).

Día 4

A las 84 horas después de la fecundación las células empiezan a compactar y a formar la mórula (Fig. 9H).

Cuando acaba el día 4 de desarrollo, la mórula empieza a reorganizarse y se empieza a formar el blastocele (Fig. 8I), por lo tanto, se empieza a formar el blastocisto.

Día 5 y 6

Antes de que acabe el día 5 de desarrollo embrionario, el blastocisto suele estar totalmente formado (Fig. 9J). En el blastocisto se distingue el trofoectodermo que dará lugar a la placenta, y la masa interna celular que da lugar al feto. Durante el día 5 o 6 el blastocisto empezará a aumentar de tamaño, se producirá una expansión del blastocisto sobre la zona pelúcida y acabará eclosionándola (Fig. 8K).

Cabe mencionar que todos los tiempos a los que ocurren los distintos eventos descritos en este anexo proceden de las medias de PMCs de los embriones euploides calculadas con los datos obtenidos por monitorización TL al laboratorio. Todas las medias de de PMCs de los embriones euploides están recogidas en el Anexo 2.

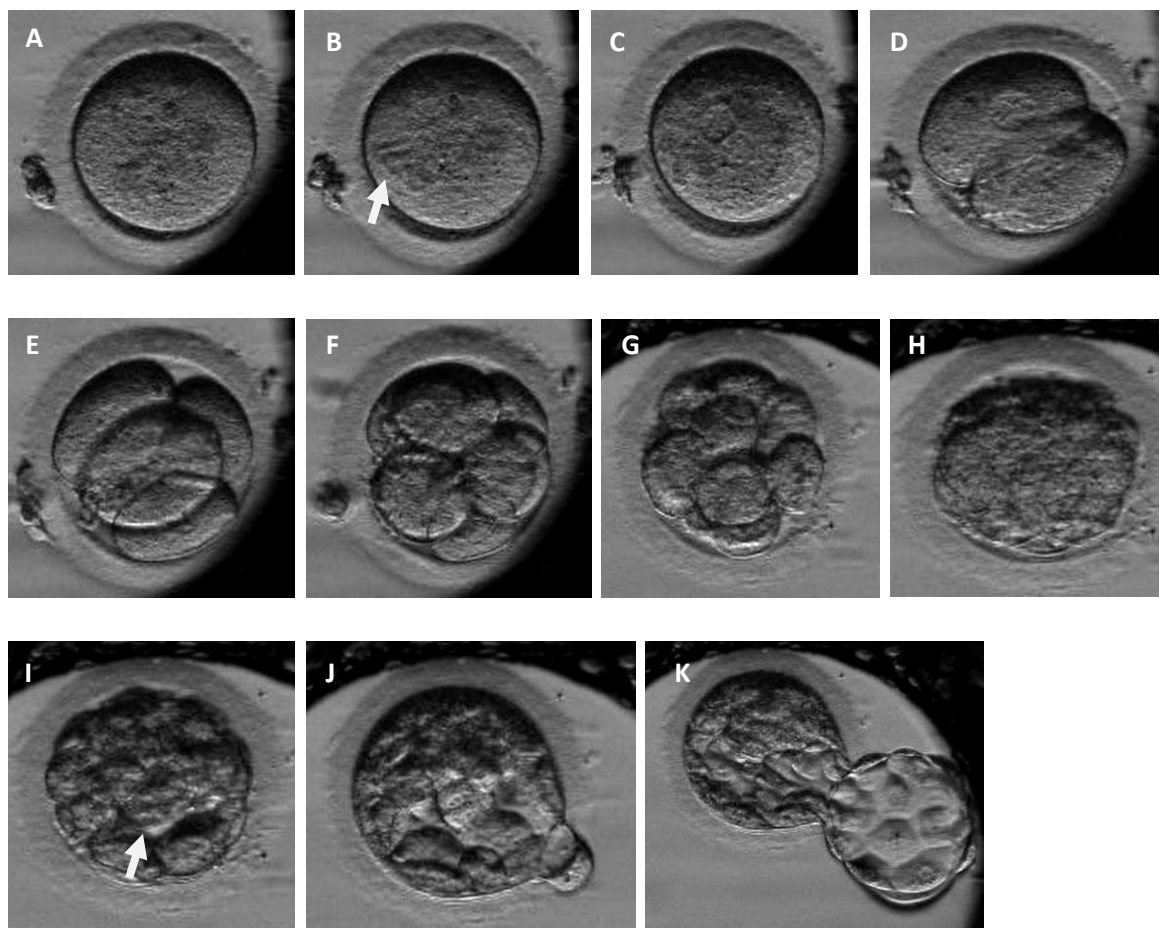


Fig. 8. Secuencia de imágenes de las fases del desarrollo de un embrión preimplantacional. (A) ovocito secundario fecundado por un espermatozoide mediante ICSI. (B) Visualización del primer y segundo corpúsculo polar (la flecha señala la situación de los corpúsculos) en el embrión unicelular o cigoto. (C) Visualización de los pronúcleos. (D) Embrión de dos células en el que se visualizan los núcleos de cada una de ellas. (E) Embrión de cuatro células en las que se puede visualizar el núcleo. (F) Embrión de 8 células. (G) Embrión de 12 células. (H) Embrión que ha compactado, estadio de mórula. (I) Formación del blastocelo (la flecha señala el sitio donde se empieza a formar el blastocisto), se empieza a formar el blastocisto. (J) Blastocisto totalmente formado. (K) Expansión y eclosión del blastocisto de la zona pelúcida a través del hueco que se había realizado para biopsiar una célula para DGP.

Estas imágenes proceden de la monitorización de la incubación de un embrión mediante tecnología TL PrimoVision.

Anexo 2. Tabla de medias y desviaciones estándar de cada PMC e intervalo respecto a la población de embriones aneuploides y a la de embriones euploides.

PMC	Embriones aneuploides		Embriones euploides		n total	p-valor
	Media $\pm$ D.E. (h.)	n	Media $\pm$ D.E. (h.)	n		
tPB2	3,48 $\pm$ 1,07	68	3,07 $\pm$ 1,19	92	160	<0,05
tPNa	8,25 $\pm$ 1,91	68	7,64 $\pm$ 1,75	95	163	<0,05
tPNf	23,43 $\pm$ 2,40	68	22,11 $\pm$ 2,57	96	164	<0,05
tZ	23,78 $\pm$ 2,44	68	22,44 $\pm$ 2,60	96	164	<0,05
it2	26,08 $\pm$ 2,53	67	24,53 $\pm$ 2,64	96	163	<0,05
t2	26,50 $\pm$ 2,55	67	25,21 $\pm$ 2,66	96	163	<0,05
tNaCc2	28,14 $\pm$ 3,10	65	26,84 $\pm$ 2,85	94	159	<0,05
tNfCc2	36,09 $\pm$ 2,99	63	34,30 $\pm$ 3,38	95	158	<0,05
t3	37,67 $\pm$ 3,44	68	36,16 $\pm$ 3,45	96	164	<0,05
t4	39,09 $\pm$ 3,47	68	37,08 $\pm$ 3,67	96	164	<0,05
tNaCc3	40,13 $\pm$ 3,52	64	38,19 $\pm$ 3,80	92	156	<0,05
tNfCc3	51,06 $\pm$ 4,96	64	48,25 $\pm$ 4,99	91	155	<0,05
t5	52,11 $\pm$ 5,73	68	49,76 $\pm$ 5,22	93	161	<0,05
t6	54,25 $\pm$ 6,10	68	51,28 $\pm$ 5,58	93	161	<0,05
t7	57,73 $\pm$ 10,21	67	53,27 $\pm$ 6,46	92	159	<0,05
t8	60,53 $\pm$ 10,85	63	56,89 $\pm$ 9,67	90	153	<0,05
t9	76,94 $\pm$ 10,23	56	71,68 $\pm$ 10,30	67	123	<0,05
tSC	90,49 $\pm$ 7,35	35	84,17 $\pm$ 8,78	49	84	<0,05
tSB	102,19 $\pm$ 7,56	15	96,57 $\pm$ 8,93	18	33	<0,05
tB	108,13 $\pm$ 6,94	8	103,99 $\pm$ 9,51	6	14	n.s.
tE	108,36 $\pm$ 6,95	8	104,20 $\pm$ 9,53	6	14	n.s.
Intervalos entre PMCs						
t3-t2	11,19 $\pm$ 2,75	67	10,95 $\pm$ 1,50	96	163	<0,05
t4-t3	1,43 $\pm$ 2,08	68	0,92 $\pm$ 1,30	96	164	n.s.
t4-t2	12,62 $\pm$ 2,03	67	11,87 $\pm$ 1,76	96	163	<0,05
t5-t2	25,65 $\pm$ 5,07	67	24,67 $\pm$ 3,50	93	160	<0,05
t5-t3	14,44 $\pm$ 3,32	68	13,77 $\pm$ 2,78	93	161	n.s.
t5-t4	13,01 $\pm$ 4,06	68	12,85 $\pm$ 2,92	93	161	n.s.
t8-t5	8,64 $\pm$ 9,15	663	7,31 $\pm$ 6,95	90	753	n.s.
t8-t6	6,71 $\pm$ 8,87	63	5,81 $\pm$ 6,38	90	153	n.s.
t8-t7	3,37 $\pm$ 5,18	63	3,68 $\pm$ 5,37	90	153	n.s.
t8-t4	21,40 $\pm$ 9,17	64	20,14 $\pm$ 7,61	90	154	n.s.
t8-t2	34,29 $\pm$ 10,03	62	31,88 $\pm$ 8,45	90	152	n.s.
t8-t3	22,84 $\pm$ 9,76	63	21,04 $\pm$ 8,04	90	153	n.s.
t2-tPNf	3,07 $\pm$ 0,57	67	3,09 $\pm$ 0,68	96	163	n.s.
t3-tPNf	14,24 $\pm$ 2,63	68	14,04 $\pm$ 1,62	96	164	n.s.

t4-tPNf	15,67±2,15	68	14,96±1,91	96	164	<0,05
t5-tPNf	28,68±5,04	68	27,77±3,61	93	161	n.s.
t6-tPNf	30,83±5,45	68	29,29±4,11	93	161	n.s.
t7-tPNf	34,32±9,66	67	31,32±5,40	92	159	<0,05
t8-tPNf	37,24±10,18	63	34,98±8,75	90	153	n.s.
t9-t8	15,75±9,16	55	14,27±8,13	66	121	n.s.
tSCt8	29,52±10,94	35	24,32±10,30	48	83	<0,05
tSC-tPNf	66,85±6,99	35	61,53±8,31	49	84	<0,05
tSCt2	63,80±6,97	35	58,31±8,18	49	84	<0,05
tSC-t9	12,94±7,23	35	10,35±6,32	48	83	n.s.
tSB-tSC	12,39±4,44	14	14,54±5,48	18	32	n.s.
tSB-t9	24,91±7,25	15	23,16±8,13	18	33	n.s.
tSB-t8	41,12±11,46	15	38,01±11,25	17	32	n.s.
tSB-t2	75,93±7,02	15	70,34±8,52	18	33	<0,05
tSB-tPNf	79,04±7,10	15	73,49±8,49	18	33	<0,05
tNfCc2-t2	9,81±1,64	63	9,12±1,16	95	158	<0,05
t3-tNfCc2	1,81±0,45	63	1,93±0,52	95	158	n.s.
tNfCc3-t3	13,07±2,70	64	12,25±2,36	91	155	n.s.
t5-tNfCc3	1,73±0,82	4	1,70±0,61	91	95	n.s.
tNfCc2-tNaCc2	8,10±1,90	63	7,48±1,61	93	156	<0,05
tNfCc3-tNaCc3	10,93±2,65	64	10,27±2,48	89	153	n.s.
t2-it2	0,42±0,28	67	0,68±0,55	96	163	<0,05

D.E.: desviación estándar.

Los valores de los PMCs que se han usado para calcular la media de cada PMC se marcaron mediante el software Primo Vision viver y se relativizaron al tiempo medio de la ICSI. La media de la duración de los tiempos de todos los PMCs está calculada en horas.

La diferencia entre medias es significativa si p-valor<0.05, n.s. significa que la diferencia entre medias no es significativa.