

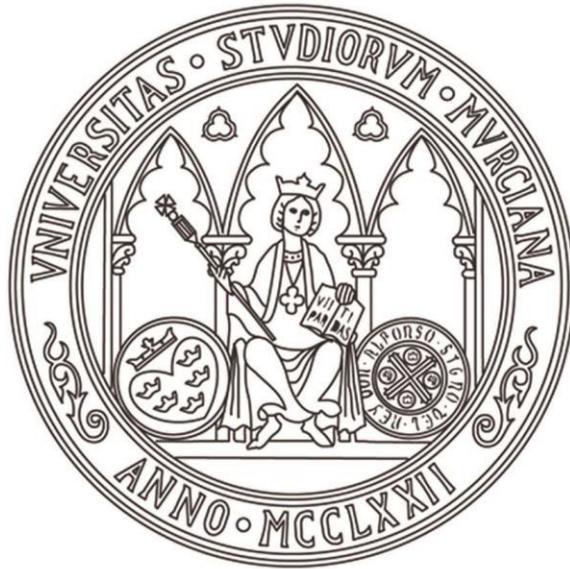


**UNIVERSIDAD DE MURCIA**  
**ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO**  
**TESIS DOCTORAL**

Identificación de polimorfismos en genes relavantes para la  
implantación y el desarrollo embrionario

**D.<sup>a</sup> Nuria Hernández Terrés**  
**2023**





**UNIVERSIDAD DE MURCIA**  
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO  
TESIS DOCTORAL

Identificación de polimorfismos en genes relevantes para la  
implantación y el desarrollo embrionario

Autor: D.<sup>a</sup> Nuria Hernández Terrés

Director/es: D. Manuel Avilés Sánchez





**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD  
DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

*Aprobado por la Comisión General de Doctorado el 19-10-2022*

D./Dña. Nuria Hernández Terrés

doctorando del Programa de Doctorado en

876- Biología y Tecnología de la Salud Reproductiva (Plan 2013)

de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad Murcia, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y titulada:

Identificación de polimorfismos en genes relevantes para la implantación y el desarrollo embrionario

y dirigida por,

D./Dña. Manuel Avilés Sánchez

D./Dña.

D./Dña.

**DECLARO QUE:**

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

*Si la tesis hubiera sido autorizada como tesis por compendio de publicaciones o incluyese 1 o 2 publicaciones (como prevé el artículo 29.8 del reglamento), declarar que cuenta con:*

- *La aceptación por escrito de los coautores de las publicaciones de que el doctorando las presente como parte de la tesis.*
- *En su caso, la renuncia por escrito de los coautores no doctores de dichos trabajos a presentarlos como parte de otras tesis doctorales en la Universidad de Murcia o en cualquier otra universidad.*

Del mismo modo, asumo ante la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada, en caso de plagio, de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Murcia, a 19 de 05 de 2023

Fdo.: Nuria Hernández Terrés

*Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.*

Información básica sobre protección de sus datos personales aportados	
Responsable:	Universidad de Murcia. Avenida teniente Flomesta, 5. Edificio de la Convalecencia. 30003; Murcia. Delegado de Protección de Datos: dpd@um.es
Legitimación:	La Universidad de Murcia se encuentra legitimada para el tratamiento de sus datos por ser necesario para el cumplimiento de una obligación legal aplicable al responsable del tratamiento. art. 6.1.c) del Reglamento General de Protección de Datos
Finalidad:	Gestionar su declaración de autoría y originalidad
Destinatarios:	No se prevén comunicaciones de datos
Derechos:	Los interesados pueden ejercer sus derechos de acceso, rectificación, cancelación, oposición, limitación del tratamiento, olvido y portabilidad a través del procedimiento establecido a tal efecto en el Registro Electrónico o mediante la presentación de la correspondiente solicitud en las Oficinas de Asistencia en Materia de Registro de la Universidad de Murcia

## AGRADECIMIENTOS

He llegado a pensar que este momento no sucedería nunca, el camino ha sido más largo de lo que imaginaba, han ido surgiendo complicaciones, mejores o peores, algunas que recordaré y otras que ya han pasado al olvido, pero al final, aquí estoy, y me llena de orgullo poder poner fin a esta etapa y por fin dar las GRACIAS por toda la ayuda recibida y los innumerables conocimientos compartidos.

Gracias Manolo, mi director de tesis, por confiar en mí y brindarme la oportunidad de trabajar con tu equipo, ha sido todo un honor. Gracias por haberme dedicado tu tiempo y tu paciencia para dar forma a esta tesis. Espero que continúes transmitiendo ese entusiasmo por la investigación que ha sido una de mis principales fuentes de inspiración. Siempre serás un gran referente, gracias.

Gracias Emilio, me encantaría nombrarte mi codirector de tesis que, aunque oficialmente no haya sido posible, sabes que en la práctica has sido eso y mucho más. Fuiste el responsable de que formase parte del proyecto *Embryogene*, y lo cierto es que, desde el primer día, confiaste en mí y en que iba a ser capaz de llevarlo adelante, hasta el punto de conseguir que yo misma me lo creyese y pueda estar hoy aquí, jajaja. Gracias por esos ratos de laboratorio, por transmitirme parte de tus conocimientos, por ayudarme tanto y de nuevo, por tu infinita confianza. Te estaré eternamente agradecida, aunque sigamos teniendo pendiente esa quedada en Torrevieja, en el mar o en el bar.

Gracias al equipo de Tahe que, aunque ahora se llame Next Fertility, para mí siempre será mi querida Tahe, con todos y cada uno de sus miembros, que me han apoyado mucho y con los que he compartido muchísimos momentos inolvidables, aprendiendo sobre reproducción, sobre el trabajo en equipo, sobre la amistad, sobre la familia que eliges. Han sido 9 años de mi vida que han dado para mucho, os llevaré siempre en el corazón. ¡Gracias! Al mismo tiempo, aprovecho para agradecer a todos los pacientes de la clínica que han firmado su consentimiento para participar en este proyecto. No os imagináis lo necesaria que es vuestra colaboración en general para que este tipo de investigaciones puedan salir adelante. ¡Mil gracias, sois unos valientes!

Gracias Leo, podría dedicarte dos hojas de agradecimientos, pero no serían suficientes, ¡y lo sabes! Sin tu colaboración nada de esto habría sido posible. Gracias por tu ayuda incondicional y por todo lo que me has enseñado. Desde los inicios, que empezamos con los espermatozoides, el sistema CASA y el citómetro de flujo, hasta los embriones, la genética, la estadística y los sistemas bioinformáticos. No hay tema que se te resista y al que no sepas plantarle cara, así que no tengo ninguna duda de que tu futuro tiene el triunfo asegurado. Mucha suerte en tu camino, de momento, te libras de mí por un tiempo...jajaja. ¡Gracias infinitas!

Gracias Paula, mi compañera de proyecto, ojalá se me haya pegado un poquito de ti. Has estado siempre dispuesta a ayudarme y animarme, a enseñarme y corregirme, eres todo un ejemplo a seguir y tus explicaciones son siempre tan claras y accesibles que da gusto preguntarte cualquier cosa. El trabajo en el laboratorio no se complica teniéndote cerca. Gracias por estar siempre ahí. Te deseo lo mejor, aquí en Murcia, en Barcelona o donde la ciencia te destine.

Gracias a todos los servicios de apoyo que han estado involucrados en este proyecto y en mi trayectoria a lo largo de estos años, en concreto a Rosa, del área de consultas de reproducción asistida de la Arrixaca, por abrirme las puertas del laboratorio y enseñarme el manejo de las muestras seminales, a Pepe de cultivos celulares y sus clases magistrales sobre cómo funciona el citómetro de flujo, a Anabel de la plataforma de genómica, por introducirme al maravilloso mundo de la secuenciación masiva. Gracias de corazón.

Un agradecimiento especial al grupo de Marbyt (Smart Solutions for Biotechnology), por haber hecho posible el estudio preliminar con IA que presento en esta tesis, y por haber estado siempre tan atentos y a entera disposición para resolver cualquier duda.

También me gustaría agradecer los consejos y el asesoramiento recibido en la última etapa de papeleo y gestión para la entrega de la tesis. Gracias Inmaculada Parrilla. En ese momento, los nervios están a flor de piel, y poder coger el teléfono en cualquier momento y que te respondan con tanta amabilidad, simpatía, profesionalidad y poder resolutivo como el que tú has mostrado, ha

sido todo un lujo que quedará también en el recuerdo. Gracias por transmitirme esa serenidad y tranquilidad que necesitaba.

Y como no, tengo que terminar mis agradecimientos con mi familia, la de sangre, la que en realidad me ha aguantado mucho más que la tesis. Me habéis apoyado desde el principio, y gracias a Dios sé que seguiréis haciéndolo toda la vida. Tampoco habría sido capaz de acabar esto sin vuestra confianza, sin vuestra ayuda, sin vuestros ánimos, sin vuestra comprensión, sin vuestro sacrificio: Pilu...menos mal que puedo contar contigo, sabes que, aunque tuviese más opciones, tú seguirías siendo siempre la número uno; Mamá, qué afortunada soy de tenerte, gracias por tu eterna paciencia y por enseñarme cada día; Merce, tú tampoco has dejado de animarme cada mañana, no hay distancia que nos separe; Jose, cuento contigo para que me lleves a la defensa...me debes una; Papá, tú eres mi otro gran referente, al final lo has conseguido, gracias por transmitirme tus valores y sobre todo esa fuerza que me empuja a conseguir lo inconseguible...con todo mi corazón, te dedico gran parte de esta tesis. Es correcto, he dicho "gran parte" porque, en realidad, tengo que hacer mi última mención especial y dedicarle la otra pequeña parte a mi nueva familia, a esa que ha surgido conforme ha ido avanzando esta tesis: a mi hija, Nuri, que apenas tiene un año y medio, y que no ha podido disfrutar de su madre todo lo que su madre hubiese querido, y a mi marido, Raúl, porque nunca le has puesto pega a ninguna de mis decisiones, porque has entendido que esto era importante para mí y me has apoyado desde el minuto cero; sin tu ayuda, no habría sido capaz de pegar este último empujón y conseguir el tiempo necesario para acabar. Gracias, cariño, ¿¿cómo te quiero tanto??

Muchísimas gracias a todos los que os habéis cruzado en mi camino durante este viaje y habéis aportado vuestro granito de arena, espero que pronto nos volvamos a encontrar y de una forma u otra os pueda compensar.



## RESUMEN

- Antecedentes y objetivos:

Con la incorporación de las técnicas de reproducción asistida para tratar el problema de la infertilidad humana, surge el reto de combatir la pérdida de embarazo temprano. El embrión juega un papel clave en la eficiencia de la implantación que, unido a la necesidad de reducir el número de embriones a transferir, conduce por un lado a la mejora de las condiciones de cultivo y desarrollo embrionario, y por otro, al avance de las técnicas de selección embrionaria. Con este último propósito, el objetivo principal de esta tesis ha sido la identificación de polimorfismos (SNPs) propios del embrión relacionados con la infertilidad, susceptibles de convertirse en biomarcadores genéticos. Posteriormente, los resultados obtenidos fueron integrados en un sistema de Inteligencia Artificial (IA), junto con otros parámetros derivados del ciclo reproductivo de los pacientes, con el objeto de crear una herramienta de selección embrionaria capaz de predecir el éxito de la implantación y el desarrollo embrionario temprano.

- Métodos:

Se elaboró primeramente un panel compuesto por 27 genes cuyos SNPs podrían influir en el desarrollo embrionario humano y estar relacionados con el fallo de implantación y muerte embrionaria temprana, teniendo en cuenta el fenotipo que presentan modelos KO de ratón estudiados previamente para esos genes. El panel seleccionado ha sido investigado en 134 muestras de ADN procedentes de biopsia de trofoectodermo de embriones euploides. Los embriones procedían de un tratamiento de ICSI con PGT-A, y su destino era la transferencia uterina, tras la cual se realizó el seguimiento gestacional hasta el nacimiento. Para llevar a cabo la secuenciación masiva de las muestras de ADN y el análisis bioinformático de los resultados, se utilizó la metodología de *Ion Torrent*. Posteriormente, se estudiaron las secuencias proteicas, características estructurales y funcionales de las proteínas, así como los fenotipos asociados utilizando las bases de datos disponibles (Uniprot, GeneCards, Ensembl, MGI,

ClinVar y OMIM). Se procedió a la identificación de SNPs deletéreos considerando la mutación existente, genotipo, localización del gen, posible efecto dañino y prevalencia en la población, comparando estos datos con los resultados clínicos obtenidos de la transferencia embrionaria y su posterior evolución. Finalmente, todos los datos fueron integrados en un sistema de IA, junto con otros relativos al ciclo reproductivo de los pacientes, edad, procedencia de los gametos, morfología y cinética de los embriones.

- Resultados y conclusiones:

Tras la evaluación de los SNPs se identificaron varios genes que podrían estar implicados en el desarrollo embrionario temprano y/o el periodo periimplantacional humano, entre ellos: *RAE1*, *F2* y *GDF3*. De ellos se han detectado 3 SNPs con posible efecto deletéreo en homocigosis del gen *F2*: chr11:46749646C>T, chr11:46750236A>T y chr11:46751102T>A; y otros dos en heterocigosis de los genes *RAE1*, chr20:55941902C>\*, y *GDF3*, chr20:55941902C>\*. El diseño del panel ha sido esencial para su identificación, y tras la verificación correspondiente, estos SNPs podrían ser utilizados como biomarcadores de fallo postimplantacional. La identificación de la mutación generada *de novo* en el gen *PIKFYVE*, chr2:209179025A>\*, pone de manifiesto la necesidad de verificar el genotipo embrionario mediante PCR convencional y secuenciación de Sanger. En cuanto al sistema de IA, el algoritmo basado en el árbol de toma de decisiones ha sido el más adecuado, ocupando la meta-variable genética PC1 la segunda posición entre las más representativas. La aplicación de la IA presenta resultados esperanzadores, aunque, al igual que con la identificación de SNPs deletéreos, es necesario aumentar el número de muestras a analizar para obtener resultados y conclusiones más relevantes.

## ABSTRACT

- Background and objectives:

The use of Assisted Reproduction Treatments in human fertility brings the challenge of combating early pregnancy loss. The embryo plays a key role in the efficiency of implantation which, together with the need to reduce the number of embryos to be transferred, leads, on the one hand, to the improvement of culture conditions and embryonic development, and, on the other, to the advancement of embryo selection techniques. Following the latter, the main object for this project was to identify embryo polymorphisms (SNPs) related to infertility, in order to use them as biomarkers. Secondary, the results obtained were integrated into an Artificial Intelligent (AI) system adding extra data from the reproductive cycle of the recruited patients, with the aim of creating a tool for embryo selection, able to predict the success of embryo implantation and early embryonic development.

- Methods:

First, a panel composed of 27 genes, whose SNPs could be involved in human embryonic development, implantation failure and early embryonic loss was created. The genetic profile of those genes had previously been reported in mouse knock-out models. The selected panel was researched in 134 DNA samples from trophoctoderm biopsies of euploid embryos. The embryos came from an ICSI treatment with PGT-A, and their destination was uterine transfer, while the gestational evolution was followed up until birth. To carry out the massive sequencing of the DNA samples and the bioinformatics analysis of the results, the Ion Torrent technology was used. The sequences, structural and functional characteristics of the proteins, as well as the associated phenotypes were studied using the available databases (Uniprot, GeneCards, Ensembl, MGI, ClinVar and OMIM). We proceeded to identify deleterious SNPs, considering the mutation, genotype, location of the gene, the possible harmful effect and its prevalence in the population. We compared these results with the clinical ones obtained from the embryo transfer and follow-up evolution. Finally, all the data was integrated into an AI system, together with other data which belongs to the reproductive cycle of the patients, age, origin of gametes, morphology and kinetics of the embryos.

- Results and Conclusions:

After evaluating the SNPs, several genes that could be involved in human early embryonic development and/or the peri-implantation period were identified. These included *RAE1*, *F2* and *GDF3*. From them, three SNPs with a possible deleterious effect have been detected in homozygotes on *F2*: chr11:46749646C>T, chr11:46750236A>T and chr11:46751102T>A; another two were heterozygous on *RAE1*: chr20:55941902C>\*, and *GDF3*: chr20:55941902C>\*. The panel design has been a key to identify them, and after verification, these polymorphisms could be used as biomarkers for embryonic post implantation failure. *The novo* mutation that was identified on *PIKFYVE* (chr2:209179025A>\*) shows the necessity to verify the embryo genotype using conventional PCR and Sanger sequencing. Regarding the AI model, the algorithm based on the decision-making tree has been the best choice, and the genetic meta-variable PC1 being in second place amongst the most representative. Results using AI systems brings hope, although, as well as deleterious SNPS identification, the need of increasing the number of tested samples to obtain further representative conclusions is required.



## INDICE

1.	INTRODUCCIÓN .....	1
2.	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	6
2.1.	Infertilidad humana .....	6
2.1.1.	Definición .....	6
2.1.2.	Epidemiología y factores de riesgo .....	7
2.1.3.	Factor causal e influencia genética .....	10
2.1.3.1.	Infertilidad femenina .....	11
2.1.3.2.	Infertilidad masculina .....	13
2.2.	Desarrollo embrionario temprano .....	14
2.2.1.	Evolución y actualidad de los estudios de investigación .....	14
2.2.2.	Periodo preimplantacional .....	17
2.2.2.1.	Fecundación .....	18
2.2.2.2.	Formación del cigoto .....	23
2.2.2.3.	Primeras divisiones embrionarias: Segmentación .....	24
2.2.2.4.	Formación de la mórula .....	25
2.2.2.5.	Formación del blastocisto .....	27
2.2.2.6.	Características morfocinéticas y clasificación ASEBIR .....	28
2.2.2.7.	Diferencias y similitudes entre la especie humana y murina .....	35
2.2.3.	Implantación embrionaria .....	40
2.2.4.	Periodo postimplantación .....	45
2.3.	Técnicas de selección embrionaria .....	48
2.4.	Relevancia de genes relacionados con el fallo de implantación y el desarrollo embrionario temprano .....	54
3.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	60
3.1.	Objetivo principal .....	60
3.2.	Objetivos específicos .....	60
4.	MATERIAL Y MÉTODOS .....	61
4.1.	Comité ético .....	61
4.2.	Selección de genes .....	61
4.3.	Población de estudio .....	62

4.4.	Tratamiento de Reproducción Asistida.....	63
4.4.1.	Estimulación ovárica controlada .....	63
4.4.2.	Punción folicular y captación de ovocitos .....	64
4.4.3.	Identificación, aislamiento y desnudación de ovocitos.....	64
4.4.4.	Procesado del eyaculado.....	66
4.4.5.	Microinyección espermática (ICSI) .....	68
4.4.6.	Análisis de la calidad embrionaria.....	69
4.4.7.	Biopsia Embrionaria.....	70
4.4.8.	Criopreservación de embriones .....	70
4.4.9.	Test genético preimplantacional de Aneuploidías.....	71
4.4.10.	Preparación endometrial.....	72
4.4.11.	Desvitrificación embrionaria.....	73
4.4.12.	Transferencia embrionaria .....	74
4.4.13.	Diagnóstico y seguimiento de embarazo .....	74
4.5.	Obtención de las muestras para secuenciar .....	75
4.6.	Secuenciación masiva.....	76
4.6.1.	Diseño del panel genético dirigido Ampliseq™ .....	76
4.6.2.	Preparación de las librerías .....	81
4.6.3.	Templado y secuenciación.....	82
4.6.4.	Análisis Bioinformático.....	83
4.6.5.	Cultivo embrionario monitorizado mediante la tecnología en tiempo real (Time-lapse).....	83
4.7.	Obtención y purificación del material genético de los hisopos bucales de los progenitores. ....	84
4.8.	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional.....	85
4.9.	Elaboración de un método de predicción de embarazo mediante IA .....	86
4.9.1.	Selección de datos.....	87
4.9.2.	Selección de variables .....	91
4.9.3.	Preprocesamiento de los datos.....	91
4.9.4.	Entrenamiento, validación y selección del modelo de clasificación .....	92
5.	RESULTADOS .....	95
5.1.	Muestra poblacional .....	95
5.1.1.	Dotación cromosómica de los embriones .....	95

5.1.2.	Clasificación de los embriones.....	99
5.1.3.	Rango de edades en las receptoras .....	100
5.2.	Análisis in silico de genes de interés .....	101
5.3.	Análisis de resultados y selección de marcadores polimórficos. ....	102
5.4.	Análisis de mutaciones.....	102
5.4.1.	Tipo de mutaciones.....	102
5.4.2.	Mutaciones no deletéreas en el desarrollo embrionario temprano.....	104
5.4.3.	Mutaciones potencialmente deletéreas en el desarrollo embrionario temprano .....	104
5.4.4.	Detección del polimorfismo chr2:209179025A>* del gen PIKFYVE mediante PCR convencional y secuenciación de Sanger a partir las muestras de ADN embrionario y progenitores .....	106
5.4.5.	Otras mutaciones potencialmente deletéreas en el desarrollo embrionario temprano presentes en embriones negativos. ....	107
5.4.6.	Otros hallazgos de interés .....	110
5.4.7.	Esquema proteico de las mutaciones relevantes.....	114
5.5.	Método de selección embrionaria mediante IA.....	117
5.5.1.	Selección del modelo de clasificación embrionaria.....	117
5.5.2.	Aplicación del modelo Decision Tree .....	118
6.	DISCUSIÓN.....	120
6.1.	Selección embrionaria y PGT-A .....	120
6.2.	Muestra poblacional .....	122
6.3.	Panel Ampliseq.....	124
6.4.	Inteligencia artificial aplicada a las TRA .....	138
7.	CONCLUSIONES .....	141
8.	ABREVIATURAS .....	142
9.	ANEXO .....	145
10.	BIBLIOGRAFÍA.....	148

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Evolución de la política de transferencia embrionaria FIV/ICSI.....	2
<b>Figura 2.</b> Ejemplo de genes alterados en diferentes patologías durante el proceso de maduración ovocitaria, fecundación, desarrollo embrionario y establecimiento del embarazo.....	12
<b>Figura 3.</b> Representación de la espermatogénesis fisiológica y patológica indicando algunos de los genes patológicos involucrados en cada anomalía .....	13
<b>Figura 4.</b> Embrión humano. Estados de Carnegie 1-23.....	15
<b>Figura 5.</b> Desarrollo folicular en el ovario, ovulación, fertilización y transporte embrionario hasta implantación en el útero .....	17
<b>Figura 6.</b> Hiperactivación del espermatozoide basal .....	19
<b>Figura 7.</b> Mecanismos de fertilización. ....	21
<b>Figura 8.</b> Cambios dinámicos en la metilación del ADN durante el desarrollo en mamíferos .....	23
<b>Figura 9.</b> Ovocito metafase II.....	29
<b>Figura 10.</b> Cigoto (A) y primera división embrionaria (B).....	30
<b>Figura 11.</b> Embrión en 4 células (A) y 8 células (B).....	32
<b>Figura 12.</b> Blastocisto expandido (A) y blastocisto eclosionando (B).....	34
<b>Figura 13.</b> Gradación embrionaria en estadio D+5/D+6 según criterios de ASEBIR 2021.....	34
<b>Figura 14.</b> Desarrollo preimplantacional en el ratón (A) y en el embrión humano (B)	36
<b>Figura 15.</b> Compactación y polarización en el ratón durante el estadio de 8 células.	38
<b>Figura 16.</b> Implantación humana.....	41
<b>Figura 17.</b> Comparación del desarrollo embrionario en el ratón y el ser humano desde la preimplantación hasta el inicio de la gastrulación .....	46
<b>Figura 18.</b> Representación gráfica de los cambios morfocinéticos durante el desarrollo embrionario. ....	49
<b>Figura 19.</b> Comparación de análisis de aneuploidías realizado en blastocisto a partir de células de trofoectodermo biopsiadas y ADN libre en el medio de cultivo .....	53

<b>Figura 20.</b> Factores genéticos responsables de alteraciones en el ovocito y desarrollo embrionario descubiertos recientemente.....	55
<b>Figura 21.</b> Comparación del desarrollo embrionario en el ser humano y el ratón hasta el final de la gastrulación. ....	56
<b>Figura 22.</b> Morfología del embrión wild-type en E9.5 y 10.5 comparado con el homocigoto mutante de Hsp90 $\beta$ en E9.5 y E10.5 .....	58
<b>Figura 23.</b> Representación esquemática de capacitación espermática mediante centrifugación con gradientes de densidad .....	67
<b>Figura 24.</b> Esquema de preparación de librerías con la tecnología Ion AmpliSeq™..	81
<b>Figura 25.</b> Representación del flujo de trabajo de Ion Torrent.....	82
<b>Figura 26.</b> Estructura final de la tabla de datos.....	92
<b>Figura 27.</b> Representación de rango de edades en función del resultado clínico RNV. ....	100
<b>Figura 28.</b> Representación de rango de edades según la procedencia de gameto femenino.....	101
<b>Figura 29.</b> PCR convencional de la región que incluye el polimorfismo chr2:209179025A>* del gen PIKFYVE sobre las muestras del embrión P4E3 y sus progenitores. ....	106
<b>Figura 30.</b> Cromatograma de secuenciación de Sanger correspondiente al ADN de los progenitores y del embrión P4E3 incluyendo el polimorfismo chr2:209179025A>* de PIKFYVE.....	107
<b>Figura 31.</b> Esquema proteico del <b>gen PIKFYVE</b> y su mutante.....	114
<b>Figura 32.</b> Esquema proteico del <b>gen F2</b> y sus mutantes .....	114
<b>Figura 33.</b> Esquema proteico del <b>Gen MYO18A</b> y su mutante .....	115
<b>Figura 34.</b> Esquema proteico del <b>Gen ABCA1</b> y sus mutantes .....	115
<b>Figura 35.</b> Esquema proteico del <b>Gen NR5A2</b> y sus mutantes .....	116
<b>Figura 36.</b> Esquema proteico del <b>Gen MMACHC</b> y sus mutantes. ....	116
<b>Figura 37.</b> Esquema proteico del <b>Gen RAE1</b> y la variante mutante .....	117
<b>Figura 38.</b> Matriz de confusión con el set de datos test.....	119
<b>Figura 39.</b> Estructura del árbol de decisiones entrenado.....	119

## INDICE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Clasificación del embrión temprano en D+2 y D+3 según criterios ASEBIR.	31
<b>Tabla 2.</b> Esquema de gradación de la etapa de mórula D+4 según criterios de ASEBIR .....	33
<b>Tabla 3.</b> Tasas de embarazos y partos después de realizar PGT según los registros de la SEF (2020) .....	54
<b>Tabla 4.</b> Clasificación embrionaria del blastocisto según criterios de ASEBIR (2015)	69
<b>Tabla 5.</b> Listado de genes y polimorfismos que se incluyeron en el panel Ampliseq™	78-80
<b>Tabla 6.</b> Condiciones empleadas para las amplificaciones por PCR a partir de ADN.....	86
<b>Tabla 7.</b> Datos clínicos, morfológicos y cinéticos para IA.....	88-90
<b>Tabla 8.</b> Contingencia de la dotación cromosómica de los embriones obtenidos a partir de ovocitos propios o donados.....	95
<b>Tabla 9.</b> Datos clínicos de los pacientes que participaron en el estudio.....	96-98
<b>Tabla 10.</b> Descripción de los resultados clínicos por embrión.....	99
<b>Tabla 11.</b> Contingencia de la $\beta$ -hCG y los RNV con relación al origen de los ovocitos.....	100
<b>Tabla 12.</b> Clasificación de las mutaciones en función de su manifestación a nivel genético.....	103
<b>Tabla 13.</b> Descripción de mutaciones potencialmente deletéreas en el desarrollo embrionario temprano.....	105
<b>Tabla 14.</b> Descripción de mutaciones potencialmente deletéreas cuando aparecen en homocigosis.....	108-109
<b>Tabla 15.</b> Polimorfismos catalogados como deletéreos en homocigosis o sin previa descripción en gnomAD, localizados en embriones heterocigotos que han evolucionado hacia $\beta$ -hCG positiva.....	111-112
<b>Tabla 16.</b> Embriones con más de una mutación potencialmente deletérea identificada.....	113
<b>Tabla 17.</b> Puntuación balanceada de los distintos modelos de clasificación probados.....	118

## 1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, el problema de la infertilidad alcanza una magnitud global, cada vez más común, y de mayor trascendencia en la sociedad (Inhorn, 2015). Millones de parejas en todo el mundo se enfrentan a diario ante la dificultad de tener hijos, con las penurias que ello conlleva tanto a nivel cultural, social, de pareja e individual (López Villaverde, 2014).

Su estudio epidemiológico permite estimar el impacto que provoca en la población, y a su vez contribuye a dilucidar sus causas; datos que son imprescindibles a la hora de crear protocolos de prevención y sensibilización orientados a la población infértil, que ayuden a abordar este problema con una mayor conciencia (Boedt et al., 2021).

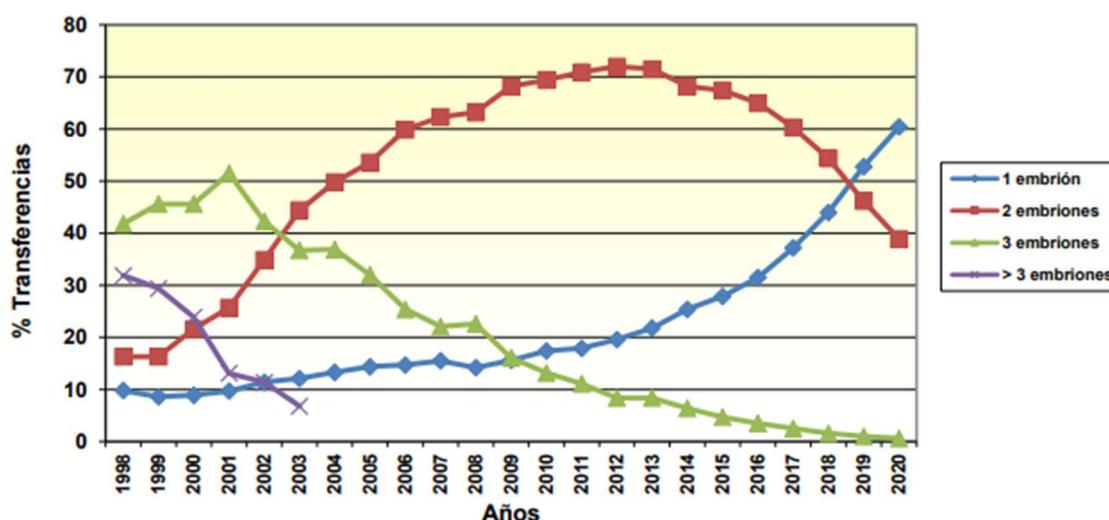
Una de las principales causas que ha incrementado la tasa de infertilidad, ha sido el efecto provocado por el retraso de la edad de la mujer hacia la búsqueda del primer embarazo que, ligado al retraso de la edad masculina hacia el mismo fin, repercuten de manera negativa sobre la fertilidad (Rubio et al., 2019; Busnelli, 2020; INE, 2021). La plena incorporación de la mujer al mundo laboral y la posibilidad de poder desarrollar su faceta profesional ha sido uno de los beneficios conseguidos, entre otras cosas, gracias al control de la fertilidad. Sin embargo, ello ha actuado en contra de la edad biológica para procrear, comenzando una lucha constante que hoy en día la ciencia todavía no es capaz de solventar por completo, continuando la búsqueda de nuevas estrategias de estudio que marquen el futuro en la investigación de la infertilidad (Eijkemans et al., 2014; Duffy, 2021).

Las Técnicas de Reproducción Asistida (TRA) se han convertido en una herramienta fundamental para solucionar gran parte del problema de la infertilidad, produciéndose un incremento casi exponencial de la demanda y de los servicios ofrecidos por las clínicas de Fecundación In Vitro (FIV) en las últimas décadas (Collins, 2002; Vérguez, 2020; Pérez, 2022). Muchas mujeres incapaces de concebir de forma natural han logrado un embarazo viable gracias a las TRA, con más de 8 millones de niños nacidos gracias a ellas (Faddy et al., 2018; Biggers, 2012; Chambers, 2021). Aun así, los resultados continúan siendo

poco eficientes, con tasas de implantación que oscilan en torno al 30% a nivel mundial (Ajduk & Zernicka-Goetz, 2012; Polanski et al., 2014; Pérez, 2022).

Entre los escenarios que podemos encontrar tras un tratamiento de reproducción asistida (ausencia de embarazo, embarazo único o múltiple), el embarazo múltiple constituía un gran problema hace tan solo unos años. En el año 2007, el 2,5% de las transferencias en Europa incluían 4 o más embriones, y tan solo el 21,4% era de un único embrión, lo que ocasionaba un alto porcentaje de embarazos múltiples (de Mouzon et al., 2012). El embarazo múltiple está asociado a una serie de complicaciones adversas: al aumento de los costes en la asistencia médica, un mayor riesgo de morbilidad y mortalidad tanto en la madre como en los recién nacidos, y un estrés adicional de las parejas afectadas entre otros (Ombelet et al., 2005). Todo ello ha promovido que las sociedades reproductivas adopten una serie de guías que fomenten la transferencia de un único embrión, evitando en la medida de lo posible el embarazo múltiple, especialmente en mujeres que exceden los 35 años (Luke & Brown, 2007; Matzuk et al., 2008; Tiitinen, 2012; Okun & Sierra, 2014).

En España, en los últimos 20 años se ha conseguido reducir el índice de los embriones transferidos en más de uno, siendo 1,4 la media de embriones transferidos en ciclos de FIV en fresco en el año 2020, comparado con el 2,5 que se registró en el 2002 (**Figura 1**) (S.E.F, 2002; S.E.F, 2020).



**Figura 1.** Evolución de la política de transferencia embrionaria FIV/ICSI. SEF 1998-2020 (Fuente: Registro SEF 2020).

Por otro lado, con la incorporación de las TRA en la clínica diaria, surge otro gran problema a resolver: la pérdida de embarazo temprano. Su diagnóstico y tratamiento se ha convertido en uno de los mayores retos en las clínicas de reproducción asistida (RA) (Bashiri et al., 2018). Existe un gran número de pacientes con fallos repetidos de implantación asociado a una edad materna avanzada, factores uterinos, factor embrionario, a causas multifactoriales, aunque, lamentablemente, en la mayoría de los casos no se consigue evidenciar su etiología (Polanski et al., 2014; Kim & Kim, 2017; Busnelli, 2020).

El embrión juega un papel clave en la eficiencia de la implantación humana que, unido a la necesidad de reducir el número de embriones por transferencia, conduce por un lado a la mejora de las condiciones de cultivo, para obtener embriones con mayor potencial de desarrollo e implantación, y por otro, a una exigencia en la mejora de los criterios de selección embrionaria, para conseguir métodos fiables que permitan la transferencia de un único embrión (Ajduk & Zernicka-Goetz, 2012; Vallejos et al., 2022).

La evaluación morfológica convencional de los embriones es el método de selección embrionario más utilizado desde los inicios de la reproducción asistida, pero sigue siendo muy limitado. Existen otros métodos, entre ellos algunos más invasivos como el diagnóstico genético preimplantacional de aneuploidías (PGT-A, en inglés *Preimplantation Genetic Testing for Aneuploidies*), dirigidos a conseguir la selección del mejor embrión a transferir, y así mejorar las tasas de implantación y recién nacido vivo.

Debido a mi interés en el estudio de factores que mejoren los resultados de infertilidad en la pareja, me uní al proyecto de investigación *Embryogene*, para enfocar mi tesis en el **factor embrionario** y su papel en el éxito reproductivo, dirigido a la búsqueda de nuevas herramientas que aporten información sobre la viabilidad y el potencial del desarrollo embrionario, ayudando a elegir así el embrión con mayores posibilidades de implantación, con el fin de aportar un granito de arena en la mejora de los resultados de las TRA.

*Embryogene* es un proyecto concedido por el Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial (CDTI) a la Universidad de Murcia en colaboración con la clínica de fertilidad Next Fertility Murcia, en la que tuve el placer de trabajar

durante 9 años y que me permitió formar parte de este estudio realizando la recopilación de las muestras. Posteriormente, participé en el procesado de los resultados con el equipo de la Universidad de Murcia, dando forma a esta Tesis Doctoral.

Diferentes estudios realizados en ratón han identificado un gran número de genes que muestran un papel relevante en el desarrollo temprano del embrión y su implantación, entre ellos *Grp94* (Wanderling et al., 2007), *Hsp90β* (Voss et al., 2000), *Calreticulina* (Guo et al., 2002;), *Zp4* (Stetson et al., 2012), *Lif* (Rosario et al., 2014), *Padl6* (Yurttas et al., 2008) o *Trim59* (Su et al., 2018). Para lograr el éxito reproductivo, es necesario que miles de genes se coordinen entre sí, y el fallo en cualquier eslabón de esta cadena puede desencadenar la infertilidad. Aun así, ninguno de estos genes se analiza en los cribados genéticos que se utilizan para seleccionar el embrión a transferir en las clínicas de reproducción asistida (Matzuk & Lamb, 2008).

Teniendo en cuenta estos motivos, para la realización de este estudio se elaboró un panel de genes cuyos polimorfismos (también SNPs del inglés *Single-nucleotide Polymorphisms*) podrían ser relevantes en el desarrollo embrionario y estar relacionados con el fallo de implantación y la muerte embrionaria temprana. El panel seleccionado ha sido estudiado en muestras de ADN que provenían de biopsias embrionarias cuyo destino era el análisis genético de aneuploidías. Estas muestras fueron cedidas por la clínica de reproducción asistida (RA) bajo consentimiento firmado por sus participantes anónimos. Los embriones biopsiados con resultado negativo en aneuploidías estaban destinados a ser transferidos, por lo que se ha tenido acceso a los datos de implantación y posterior evolución del embarazo.

El propósito era, por un lado, mejorar la comprensión del fundamento genético del desarrollo embrionario temprano, intentando dar respuesta a la gran pérdida de embriones que sucede en el tracto genital femenino y no llega a implantar; y por otro, incluir un nuevo método de selección embrionaria basada en la identificación de mutaciones que puedan ser responsables del fallo de implantación y de la muerte embrionaria temprana.

Por último, dada la relevancia que está adquiriendo la Inteligencia Artificial (IA) en el campo de la biotecnología médica, además de en otros muchos ámbitos, se decidió colaborar con la empresa Marbyt (Smart Solutions for Biotechnology) para realizar una prueba de IA. La idea era establecer una estrategia para intentar resolver la compleja tarea de clasificación de embriones de acuerdo con su potencial para acabar generando embarazo o no. Para ello se utilizaron los datos obtenidos en este proyecto. Gracias al poder de la IA, se procedió a diseñar un modelo que fuese capaz de clasificar nuevas muestras en embarazo o no a partir de datos conocidos. Esta prueba piloto, aunque con resultados esperanzadores, se realizó con un número limitado de datos para estudiar el potencial de la técnica, por lo que hace falta más trabajo e investigación para sacar conclusiones más robustas.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Infertilidad humana

#### 2.1.1. Definición

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define la infertilidad como la incapacidad de lograr un embarazo clínico después de un periodo de 12 meses de relaciones sexuales de forma regular y sin protección, o bien debido a un fallo en la capacidad de una persona para reproducirse como individuo, o con su pareja (Zegers-Hochschild et al., 2017).

Esta situación no supone un riesgo vital para el individuo, ni compromete su integridad física, sin embargo, fue catalogada por la OMS como enfermedad del sistema reproductivo en el año 2009, considerando el deterioro que produce en la calidad de vida de las personas afectadas, las repercusiones médicas, psicológicas y sociales (Zegers-Hochschild et al., 2009; López Villaverde, 2014).

La comunidad científica ha sufrido muchos años de controversias en cuanto a la nomenclatura común a utilizar en RA, lo que ha ido frenando la posibilidad de estandarizar y comparar los procedimientos entre los diferentes países. En el año 2008, se convocó una reunión en la sede de la OMS de Ginebra con setenta y dos profesionales clínicos, epidemiólogos, científicos básicos y sociales, que revisaron el ya existente glosario de terminología en TRA elaborado por el Comité Internacional de Monitorización de Tratamientos de Reproducción Asistida (ICMART) en el año 2006, y propusieron nuevas recomendaciones y terminologías que fueron incluidas en el glosario revisado y aceptadas con carácter internacional. Su última revisión se llevó a cabo en el año 2017 (Zegers-Hochschild et al., 2017).

A efectos clínicos, la propia lengua española diferencia los términos de esterilidad (como la dificultad para conseguir embarazo) e infertilidad (como la dificultad para conseguir embarazo de un recién nacido vivo), aunque, en la práctica, son equiparables y han sido aceptados actualmente como sinónimos en el Diccionario de la Real Academia de la Lengua Española (Habbema et al., 2004; Vander Borght y Wyns, 2018; SSPA, 2022; RAE, 2023). De ahora en adelante, se utilizará el término infertilidad en el presente trabajo.

Dentro de la infertilidad se distingue:

- a. La infertilidad primaria, que describe a la pareja que nunca ha podido lograr el embarazo de un recién nacido vivo.
- b. La infertilidad secundaria, en la que la mujer tiene una historia previa de al menos un embarazo clínico, pero que no es capaz de concebir de nuevo (Vander Borgh & Wyns, 2018).

Establecer el tiempo estimado para lograr el embarazo también ha sido motivo de polémica en la sociedad científica, proponiendo periodos de uno o dos años si se consideraba el punto de vista clínico, 5 años el epidemiológico, o 7 años el demográfico, en el que se priorizan los recién nacidos vivos y los periodos de estudio son siempre mayores (Mascarenhas et al., 2012; Schoenwolf et al., 2022).

Con todo ello, la Sociedad Española de Fertilidad (SEF) establece los mismos criterios que la OMS en cuanto al tiempo estimado en el que una pareja se considera infértil, aunque recomienda que los estudios de infertilidad se lleven a cabo en periodos inferiores al año si existen factores predisponentes asociados como la edad avanzada, anomalías menstruales, cirugías del aparato reproductor, u otras causas que supongan un riesgo sobre la fertilidad y justifiquen el inicio de estos estudios cuanto antes. (Rancel, 2017; Vérguez, 2020).

#### 2.1.2. Epidemiología y factores de riesgo

El conocimiento de la epidemiología de la infertilidad es esencial para mejorar los tratamientos y promover las políticas de prevención (Gurunath et al., 2011; Mascarenhas et al., 2012; Winters & Walsh, 2014). En los estudios realizados hasta la fecha, de nuevo aparecen controversias conceptuales, convirtiéndolo en un verdadero reto para los investigadores (López Villaverde, 2014; Inhorn & Patrizio, 2015, Cox et al., 2022).

Se han llegado a estimar diversas cifras de infertilidad en la población como 48,5 millones de parejas (Mascarenhas et al., 2012), 72,4 millones de parejas (Boivin et al., 2007) o 186 millones de individuos (Rutstein & Shah, 2004).

Los últimos estudios presentados por la OMS estiman que una de cada seis personas ha padecido infertilidad en algún momento de su vida. La

prevalencia de vida se define como la proporción de la población que ha experimentado infertilidad en algún momento de su vida, estimada en 17,5%; y el periodo de prevalencia, como la proporción de la población que padece infertilidad en un determinado momento o intervalo de tiempo, actual o pasado, estimado en un 12,6% (WHO, 2023)

Estos porcentajes pueden variar en función del nivel de desarrollo del país, la cultura, factores ambientales o influencias socioeconómicas, encontrando diferencias incluso entre regiones de un mismo país (Boivin et al., 2007; Ombelet et al., 2008; Vander & Wyns, 2018). Así la OMS ha estimado que la prevalencia de vida es mayor en Occidente (23,2%) y menor en el Mediterráneo Oriental (10,7%), y el periodo de prevalencia es más alto en la Región Africana (16,4%) que en el Mediterráneo (10,0%) (WHO, 2023).

Independientemente de la cifra, la infertilidad se ha convertido en un problema global, alcanzando una gran magnitud que tiene consecuencias demográficas notables e importantes implicaciones en la salud (Rutstein & Shah, 2004; Agarwal, 2015).

Un factor importante que merece consideración es la eficiencia reproductiva de la especie humana, la cual es muy baja si se compara con la de la mayoría de los mamíferos, que incluso pueden llegar a triplicarla (Jarvis, 2016). En algunas especies de roedores la eficiencia reproductiva puede superar el 90% (Zinaman, 1996; Stevens, 1997). En humano, en condiciones fisiológicas se estima que tan solo un 20-25% de las parejas que aparentemente no sufren ninguna anomalía a nivel reproductivo logran quedarse gestantes durante el primer ciclo. Teniendo en cuenta este dato, se podría estimar que un 74% de las parejas sin problemas reproductivos podrían alcanzar el embarazo tras 6 meses intentándolo, un 93% a los 12 meses, y el 100% a los 24 meses (Evers, 2002; Teklenburg et al., 2010).

Sin embargo, estas estimaciones vuelven a perder valor si se considera uno de los factores de riesgo que más daño está causando actualmente a la fertilidad: la edad, sobre todo en la mujer. Tanto la edad como el tiempo de búsqueda de embarazo son factores importantes que han sido relacionados con el pronóstico del éxito reproductivo (Rico, 2022). En el caso de la mujer, se ha

descrito por varios autores que la probabilidad de que un embarazo llegue a término en el primer ciclo comienza a disminuir a partir de los 31 años, acelerándose el proceso al alcanzar los 35 (van Noord-Zaadstra et al., 1991; Pellicer et al., 1995; Qi et al., 2014; Liu & Case, 2017; Rico, 2022). Este deterioro en el varón se aprecia un poco más tarde, pero también es evidente (Schwartz et al., 1983; Spira et al., 1985; Egbert & Pearson, 2002), observándose *a priori* un detrimento de los parámetros seminales. Estos cambios repercuten en los resultados del ciclo reproductivo, sumando nuevos riesgos de salud a la descendencia (Mazur & Lipshultz, 2018; Jimbo et al., 2022; Kaltsas et al., 2023).

Recientes estudios moleculares relacionados con el deterioro del aparato reproductor femenino comienzan a descifrar mecanismos genéticos involucrados en el envejecimiento ovárico, detectando marcadores genéticos implicados en la regulación de la menopausia como *CHEK2*, *GNRH1*, *HMCES*, *ZCCHC2* ó *ZNF518A*, que pueden ayudar a proponer nuevas estrategias de tratamiento para frenar el proceso de envejecimiento (Horikoshi et al., 2018; Ruth et al., 2021).

Otros factores de riesgo muy presentes en la sociedad actual, y que también afectan negativamente a los resultados reproductivos produciendo daños a veces irreparables en las células germinales, vienen determinados por el propio estilo de vida de las personas, por el consumo excesivo de tabaco, alcohol, drogas, ejercicio o estrés, por la exposición a factores medioambientales como agentes físicos, sustancias químicas, tóxicos o los llamados disruptores endocrinos, cualquiera de ellos puede estar presentes en los trabajos diarios y la vida cotidiana de uno o ambos miembros de la pareja (Dorfman, 2008; López Villaverde, 2014; Gunes et al., 2018; Garolla et al., 2021; Green et al., 2021). Las alteraciones del peso corporal, tanto la obesidad como la anorexia, también son factores que influyen negativamente sobre el éxito de las TRA, por lo que previamente a su realización, los profesionales recomiendan mejorar el índice de masa corporal (BMI) de las pacientes (Best et al., 2015; Boutari et al., 2020). Aunque, lamentablemente, en ocasiones el retraso que supone alcanzar un BMI adecuado supone el deterioro añadido que causa el envejecimiento por la edad, por lo que en mujeres que sobrepasan los 38 años, estas decisiones son más complejas y están menos definidas (Rafael et al., 2023).

Por todo ello, a la hora de realizar un estudio de infertilidad, la correcta anamnesis es imprescindible, ya que la infertilidad constituye un problema multifactorial en la mayoría de los casos, y puede afectar a uno o ambos miembros de la pareja por igual. La SEF recomienda estudiar a la pareja por separado y en su conjunto, para precisar al máximo el origen de la enfermedad (Rancel, 2017).

### 2.1.3. Factor causal e influencia genética

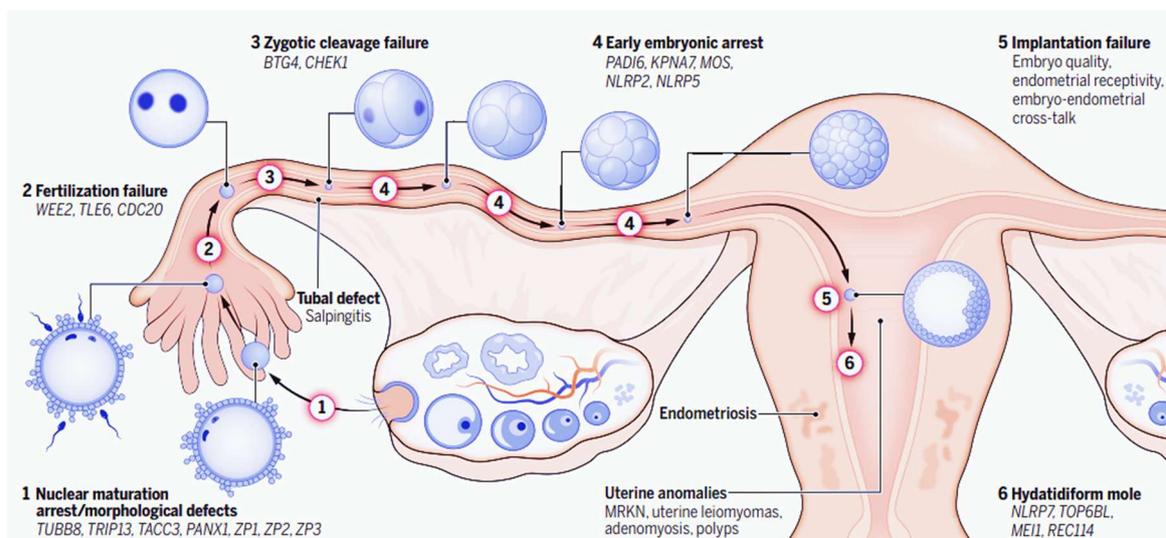
La casuística de la infertilidad tiene muchas condiciones asociadas, entre ellas la producción de los gametos masculino y femenino y su correcta interacción durante la fecundación; el ambiente propicio de las trompas de Falopio, que servirán de escenario de la fecundación y posterior desarrollo embrionario temprano; o la correcta conformación de la cavidad uterina, en la que tendrá lugar la implantación eutócica del embrión (Coy et al., 2012; Hart, 2016; Jiand & Li, 2021). Cualquier alteración anatómica, fisiológica o genética, así como la influencia de factores ambientales puede provocar la reducción de la capacidad reproductiva, o llegar a anularla por completo (Masoumi et al., 2015; Deyheul et al., 2017). Por ello, en medicina reproductiva se prefiere la denominación de factor causal frente a causas para todos aquellos trastornos que contribuyen a la infertilidad (Lepage & Epelboin, 2019; S.E.F., 2012).

El principal responsable de la infertilidad en la pareja está asociado a origen femenino, se estima que supone un 50% de las causas relacionadas con la infertilidad, un 20-30% tendrían origen masculino y un 20-30% mixto (Agarwal et al., 2015). De todas formas, puede llegar a existir hasta un 30% de casos en los que no se evidencie el origen de la infertilidad en el individuo o en la pareja, denominándose a esta infertilidad como inexplicable o idiopática (Ray et al., 2012; Gunn & Bates, 2016; Mol & Hart, 2020; Wang et al., 2020).

Gracias a los recientes avances tecnológicos de secuenciación del genoma humano completo (WGS del inglés *Whole Genome Sequencing*), se prevé una nueva era de conocimiento en la que probablemente se asignen causas genéticas, epigenéticas o ambientales a gran parte de la infertilidad idiopática actual (Tournaye et al., 2017; Bracke, 2018, Krausz, 2018).

### 2.1.3.1. Infertilidad femenina

Dentro de la infertilidad femenina podemos encontrar problemas relacionados con la ovulación, también conocidos como problemas del **factor ovárico**, que pueden llegar a afectar a más del 25% de las mujeres en edad reproductiva (Carson & Kallen, 2021). La anovulación crónica es una de las alteraciones más frecuentes en la consulta ginecológica, como la producida por el síndrome de ovario poliquístico, un trastorno endocrino cuya prevalencia ha ido *in crescendo* en los últimos años (Che et al., 2023; Chaudhuri, 2023). Está asociado a causas multifactoriales, involucrando a varios genes y predisponiendo a otras alteraciones posteriores como diabetes mellitus tipo 2, o problemas cardiovasculares, dato que manifiesta la enorme complejidad en la casuística de la infertilidad (Hajivandi et al., 2020; Greenwood et al., 2020; Zehravi et al., 2021). Con el uso de las TRA, se describió en 1986 el síndrome del fólculo vacío (Coulam, 1986), que se define como el fallo completo en la obtención de ovocitos tras una estimulación ovárica. Su incidencia puede llegar al 7% en pacientes sometidas a tratamientos de fecundación *in vitro* (Revelli et al., 2017), y su causa está relacionada con mutaciones en las glicoproteínas de la zona pelúcida conocidas como ZPs, entre ellas la ZP1, ZP2 y ZP3 (**Figura 2**) (Zhang et al., 2021; Zhou et al., 2022). Modelos de ratón *knock out* (KO) de *Zp3* son completamente infértiles (Chen et al., 2017).



**Figura 2.** Ejemplo de genes alterados en diferentes patologías durante el proceso de maduración ovocitaria, fecundación, desarrollo embrionario y establecimiento del embarazo (Fuente: Sang et al., 2023).

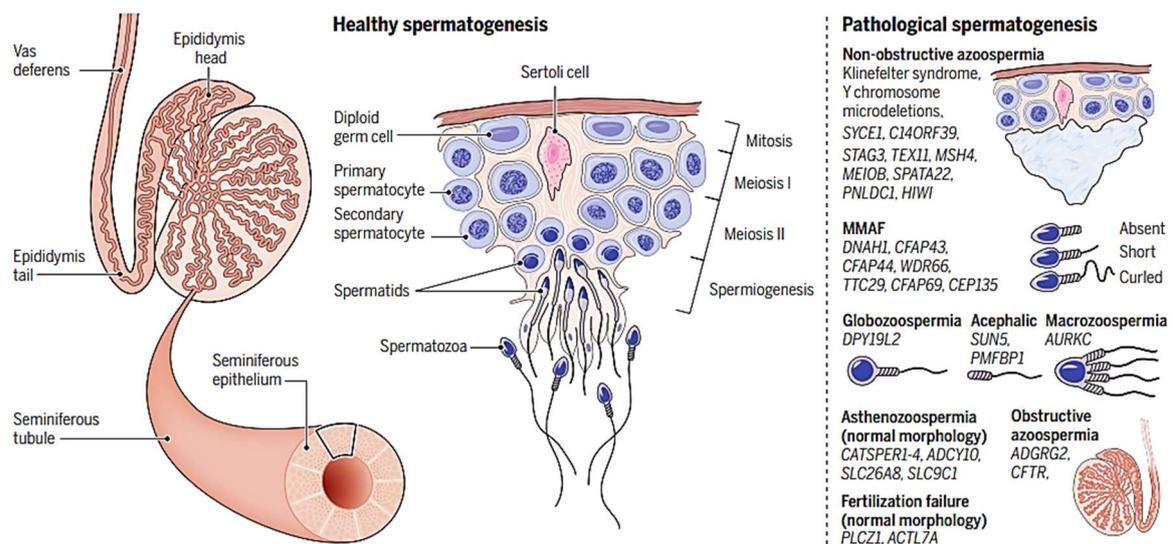
Los problemas en las trompas de Falopio o **factor tubárico** pueden representar un 25-40% de las causas de infertilidad (Zou et al., 2022), produciendo alteración de la estructura ciliar debido a infecciones o inflamaciones (Hart, 2016), o por obstrucción de las trompas que impide la libre circulación de los gametos y puede tener origen infeccioso, tumoral, congénito como la fibrosis quística, endometriosis (EMs), etc (Kroon et al., 2011; Carlson, 2019). La inflamación crónica de la capa epitelial de las trompas de Falopio se conoce como salpingitis, y es considerada la causa más común de infertilidad por factor tubárico; en ella se han involucrado bacterias como *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae*, que son enfermedades de transmisión sexual (ETS) (Tsevat et al., 2017).

Por último, el **factor uterino** puede encontrarse en un 10-15% de las mujeres que buscan embarazo. Puede ocurrir tanto por la ausencia de útero, como por la presencia de un útero no funcional, y entre su etiología encontramos malformaciones congénitas como el síndrome de Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (MRKH), proliferación de miomas o pólipos, adherencias, endometritis, etc (Magendzo, 2010; SEGO, 2017; Thurston et al., 2019; Busnelli et al., 2020; Walker & Tobler, 2021; Sang et al., 2023). El endometrio participa en la recepción del embrión promoviendo la implantación, la progresión del crecimiento embrionario, la decidualización y el desarrollo hasta la formación de la placenta. La alteración de su función afectará la ventana de implantación, desencadenando su interrupción y causando infertilidad (Shan et al., 2023). Alteraciones en la expresión de genes endometriales como *BMI1* o *HDAC3*, han demostrado afectar a la receptividad uterina (Xin et al., 2018; Kim et al., 2019). Otra de las causas que puede disminuir la receptividad endometrial es la EMs. Se calcula que un 30-50% de las mujeres con EMs son infértiles, y dentro de la población infértil, un 20-50% es diagnosticada de EMs. Es una alteración ginecológica muy compleja, multisistémica y heterogénea; caracterizada por la presencia de glándulas y estroma endometrial localizado de forma ectópica fuera de la cavidad uterina (Barnhart et al., 2002; Shan et al., 2023). Se produce un desequilibrio hormonal que afectará el desarrollo de todos los mecanismos que debe poner en marcha el endometrio uterino durante el periodo de implantación

(Marquardt et al., 2019). Se han descrito varios genes implicados en el origen de la EMs, aunque su estudio continúa siendo un reto (Zondervan et al., 2020).

### 2.1.3.2. Infertilidad masculina

La infertilidad masculina ha incrementado su incidencia en las últimas décadas, observándose un notable empeoramiento de la calidad seminal (Sengupta et al., 2017; Levine et al., 2022). Puede llegar a existir hasta un 50% de casos en los que no se encuentra causa aparente, y son referidos como infertilidad idiopática (Tournaye et al., 2017; Barrat et al., 2017; Bracke, 2018). A gran parte de esta infertilidad idiopática ya se le ha asignado origen genético, teniendo en cuenta los miles de genes involucrados en la espermatogénesis (**Figura 3**) (Krausz, 2011; Capalbo et al., 2021; Agarwal et al., 2021, Sang et al., 2023).



**Figura 3.** Representación de la espermatogénesis fisiológica y patológica indicando algunos de los genes patológicos involucrados en cada anomalía (Fuente: Sang et al., 2023).

La alteración de la producción de espermatozoides puede verse afectada por diferentes factores congénitos o adquiridos, y estos pueden actuar a nivel pretesticular, posttesticular o directamente a nivel testicular (Krausz, 2011). Dentro de cada categoría, puede haber factores genéticos asociados, algunos de los cuales se identifican durante el diagnóstico clínico del varón infértil (Krausz, 2011; Krausz & Riera-Escamilla, 2018) realizando pruebas que detectan anomalías cromosómicas (cariotipo y microdeleciones del cromosoma

Y) en pacientes que presentan oligozoospermia moderada/severa o azoospermia; o estudiando mutaciones en genes concretos de pacientes con condiciones específicas de enfermedad (Dimitriadis et al., 2017).

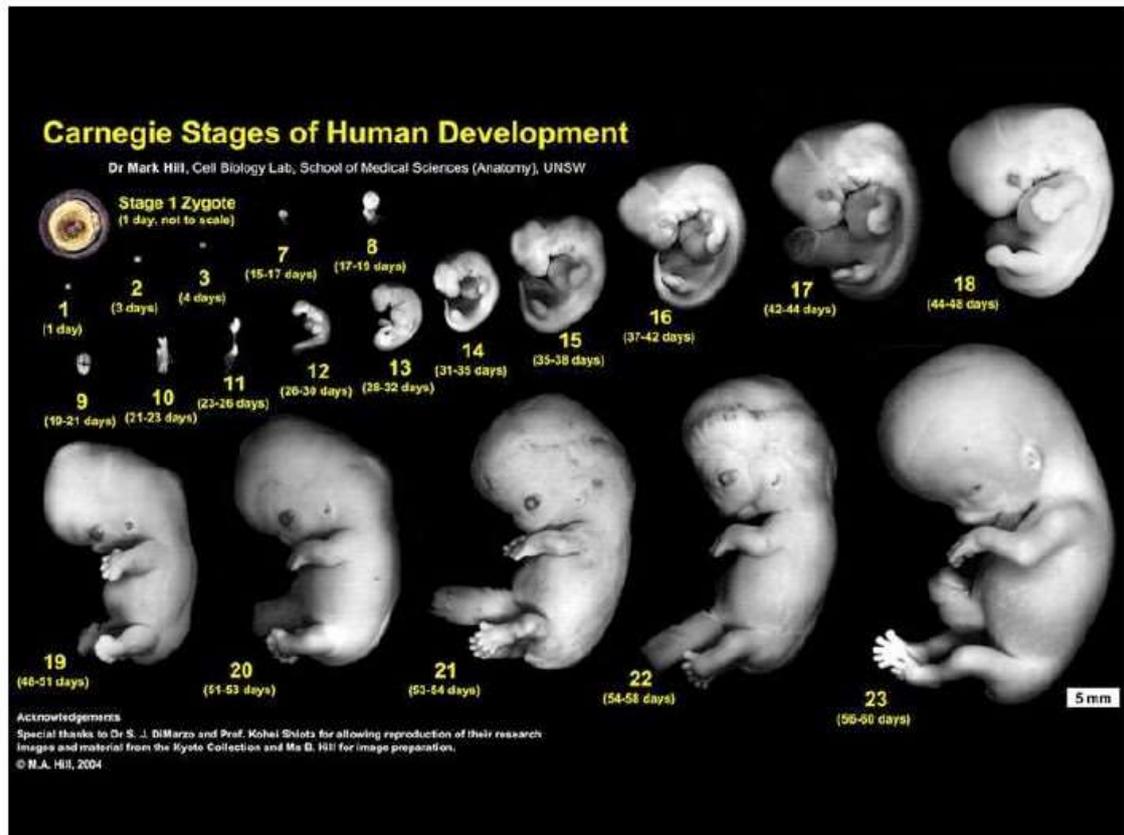
## 2.2. Desarrollo embrionario temprano

### 2.2.1. Evolución y actualidad de los estudios de investigación

Al contrario de lo que ocurre con otros animales de reproducción externa, el proceso natural de fecundación del ser humano y posterior desarrollo embrionario, tiene lugar en el interior del aparato reproductor femenino, lo que dificulta su observación y estudio *in vivo* (Gasser et al., 2014).

Las primeras publicaciones relevantes realizadas con restos embrionarios humanos datan del año 1883, realizadas por Foster y colaboradores. Posteriormente, en 1887, Franklin Mall se hizo pionero de la creación de la colección *Carnegie*, aunque no fue hasta 1941 cuando Hertig y Rock detallaron con imágenes las primeras etapas del desarrollo embrionario (Hertig, 1945; Rock & Hertig, 1948; Gasser et al., 2014). Se describieron 23 etapas durante el desarrollo embrionario conocidas como los estadios de *Carnegie*, conseguidos mediante cortes histológicos del útero de mujeres embarazadas que fueron sometidas a histerectomías durante diferentes fases del embarazo (**Figura 4**) (Hertig et al., 1956).

Este trabajo supone toda una enciclopedia en la que han contribuido diversos investigadores y que, actualmente, tiene completa accesibilidad de forma virtual gracias al “proyecto humano virtual” que comenzó en el año 2000, con el objetivo de recrear la morfología de las secciones microscópicas de cada espécimen para hacerlo accesible a investigadores, profesores y estudiantes interesados en embriología humana (Gasser et al., 2014). La clasificación detalla el desarrollo embrionario en base a características morfológicas externas, desde el día 1 (estadio 1) hasta el día 60 de desarrollo (estadio 23), momento en que el embrión pasa a denominarse feto (<https://www.ehd.org/virtual-human-embryo/>).



**Figura 4.** Embrión humano. Estados de Carnegie 1-23 (Fuente: UNSW.EDU.AU)

Actualmente, estos trabajos se consideran extraordinarios e irrepetibles. Las muestras de tejido embrionario son difíciles de adquirir técnicamente, y a su vez, son investigaciones que tropiezan con numerosas trabas éticas y jurídicas, obligando a continuar el camino por otras vías que se han ido abriendo gracias a los continuos avances de las TRAs, la extrapolación de investigaciones permitidas con otros animales o la embriología humana sintética, entre otras (Wong et al., 2010; Niakan 2012; Holmberg et al., 2012; Shao et al., 2017; de Oliveira Rodrigues et al.,2020).

El periodo previo a la implantación embrionaria, los mecanismos de autoorganización y las diferentes etapas del desarrollo embrionario temprano hasta el estadio de blastocisto han sido ampliamente estudiados *ex vivo* gracias a las TRA (Edwards et al., 1970; Steptoe et al., 1971; Niakan and Eggan, 2013; Iwata et al., 2014; Marcos et al., 2015; Petropoulos et al., 2016; Zhu et al., 2018; Wong et al., 2010). Sin embargo, una vez se transfiere al útero materno, el embrión continúa su evolución permaneciendo de nuevo inaccesible al ojo

humano lo que dificulta de nuevo su estudio *in vivo* (Rossant, 2018; Firmin et al., 2022).

El grupo de investigación de Magdalena Zernicka ha logrado cultivar embriones humanos hasta los 14 días de desarrollo a partir de células madre, extrapolando el protocolo de cultivo que utilizaban en ratones. Comparando los resultados de este experimento con la serie *Carnegie*, se ha comprobado que las características clave de la embriogénesis humana tienen lugar en ausencia de tejidos maternos, lo que revela el gran poder de autoorganización del embrión en esta etapa (Shahbazi et al., 2016).

La política internacional que rige las investigaciones del desarrollo embrionario en el ser humano limita los estudios *in vitro* a los primeros 14 días de desarrollo (Pera, 2017). Actualmente, existen protocolos de cultivo utilizados en especies de primates no humanos que han conseguido prolongar el estudio hasta día 25 de desarrollo (Zhai et al., 2022; Gong et al., 2023). Como consecuencia, la regla de los 14 días en humanos comienza a generar controversias dentro de la comunidad científica, incitando a llevar a cabo una posible extensión (Peng et al., 2022).

La aplicación de la ingeniería genética en otros modelos de mamíferos, especialmente en el ratón (modelos KO), han proporcionado conocimientos claves sobre la fase temprana del desarrollo embrionario en la especie humana, incluyendo el periodo pos-implantacional (Bedzhov et al., 2014; Bedzhov & Zernicka-Goetz, 2014).

Durante el desarrollo embrionario preimplantacional, hay muchos mecanismos comunes entre la especie humana y murina que han permitido su comparación (Niakan, 2012; Schulz, 2019), aunque otros dispares limitan la completa extrapolación (Rossant et al., 2003; Berg et al., 2011; Rossant, 2015; Plant & Zeleznik, 2014; Ortega et al., 2018).

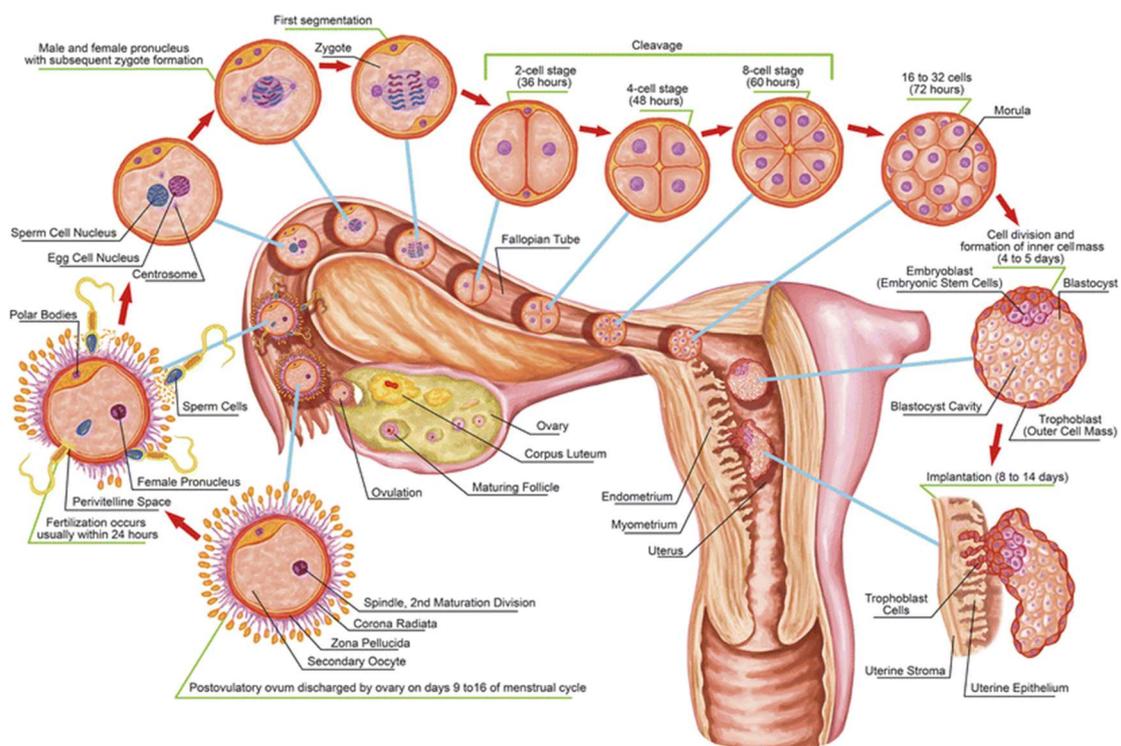
Los avances en el campo de la genética, transcriptómica y la mejora de los métodos de análisis de datos han ayudado a sumar piezas al puzzle, de los que se espera que generen nuevas estrategias en la intervención terapéutica de la pérdida de embarazo temprano (Godini & Fallahi, 2018; Ortega, 2018; Shahbazi, 2020).

La biología sintética combina los principios de la biología de células madre, biología del desarrollo y ciencias de la ingeniería, construyendo tejidos embrionarios y embriones funcionales *in vitro* que imitan características moleculares y estructurales del modelo *in vivo*. Permite disgregar el ensamblaje de los patrones celulares embrionarios y estudiarlos de forma individual, descifrando funciones y conexiones del enorme inventario de genes que participan en la formación del individuo (Davies, 2017; Shahbazi et al., 2019; Tarazi et al., 2022).

La elaboración de “blastoides”, estructuras similares a los embriones humanos a partir de células madre pluripotenciales, aunque con limitaciones, es otra alternativa capaz de imitar gran parte de los acontecimientos que suceden durante el desarrollo embrionario (Yu et al., 2021).

### 2.2.2. Periodo preimplantacional

El periodo de tiempo comprendido entre la fecundación del ovocito y la implantación embrionaria se denomina “periodo preimplantacional”, y tiene una duración aproximada de una semana en la especie humana (**Figura 5**) (Niakan et al., 2012).



**Figura 5.** Desarrollo folicular en el ovario, ovulación, fertilización y transporte embrionario hasta implantación en el útero (Fuente: Mundy & Vilchez, 2018)

El estudio dinámico y la comprensión de los eventos que se suceden durante esta etapa tiene grandes implicaciones en nuestra especie, entre ellas el avance de las TRA o las terapias basadas en células madre embrionarias (Niakan et al., 2012; Meistermann et al., 2021).

#### 2.2.2.1. Fecundación

La fecundación es el proceso biológico mediante el cual dos células germinales haploides ( $n$ ) altamente especializadas, el ovocito y el espermatozoide, se unen y combinan su material genético dando lugar a una única célula de carácter totipotencial denominada cigoto, que reestablece la dotación cromosómica diploide de una célula somática ( $2n$ ) y es capaz de iniciar el desarrollo de un nuevo individuo con las características propias de la especie (Hertwig, 1876; Clift & Schuh, 2013; Okabe, 2014).

Mediante el acto de la reproducción sexual, el hombre debe eyacular e introducir millones de espermatozoides en la vagina de la mujer, que comenzarán un proceso de capacitación espermática e irán disminuyendo en número a medida que ascienden por el aparato reproductor femenino (Yanagimachi, 1994; Ikawa et al., 2010).

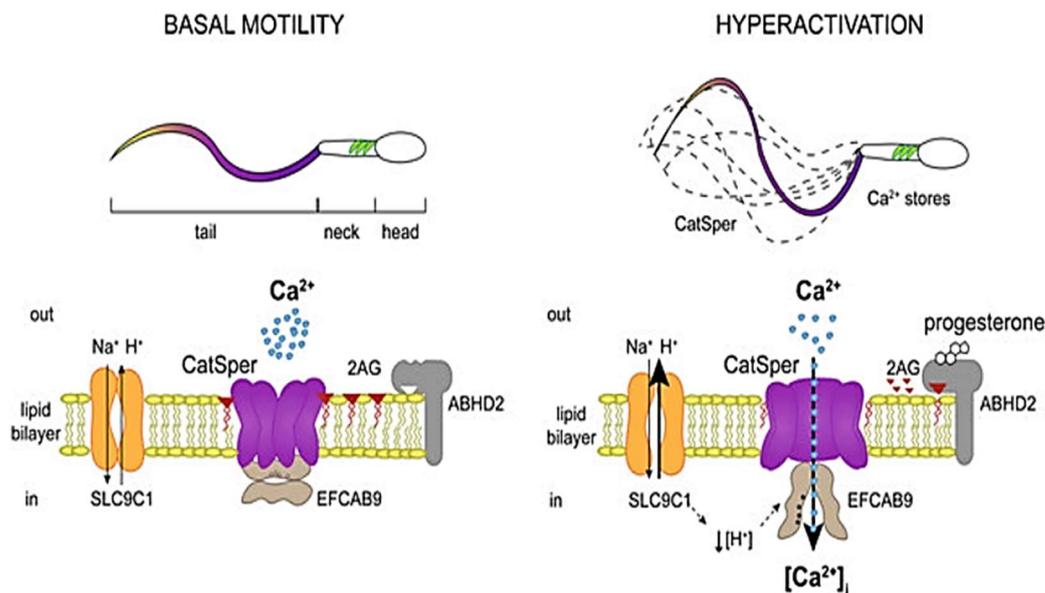
La capacitación conlleva una serie de modificaciones funcionales y estructurales como la hiperactivación de la motilidad, o la reacción acrosómica, que son indispensables para poder llevar a cabo la fecundación *in vivo* (Bianchi & Wright, 2016).

Las estructuras del oviducto también juegan un papel esencial en el éxito de la fecundación regulando el tránsito de los espermatozoides. Diferentes líneas de ratones KO han demostrado que la presencia de moléculas como la glicoproteína ADAM3 en la superficie del espermatozoide, facilita su paso a través de la unión útero-tubárica (UTJ). Además, esta proteína también desempeña un papel de reconocimiento cuando alcanza la zona pelúcida (Bhakta et al., 2019).

Posteriormente, los espermatozoides se almacenan en los pliegues de la mucosa del istmo, donde se crea un ambiente idóneo que permite su estabilización y ralentiza de algún modo la capacitación durante unas horas (Murray & Smith, 1997). En la especie vacuna se ha visto como la proteína BSP

en la superficie del espermatozoide, o las anexinas en el epitelio del oviducto, colaboran en este almacenamiento temporal (Suarez, 2008).

Cuando la ovulación se acerca, se liberan una serie de factores de origen femenino que promueven el desplazamiento gradual de los espermatozoides hacia la ampolla del oviducto, modificando el patrón de movimiento del flagelo e iniciando un estilo más singular, agitado y asimétrico conocido como hiperactivación. Para que se inicie la hiperactivación, es indispensable la activación de los canales CATSPER del espermatozoide, que permiten la entrada de calcio en el interior de la célula (**Figura 6**) (Ikawa et al., 2010; Trebichalská & Holubcová, 2020). Ratones KO para este gen son incapaces de despegarse del epitelio del oviducto (Ho et al., 2009).



**Figura 6.** Hiperactivación del espermatozoide basal (Fuente: Trebichalská & Holubcová, 2020).

Tan solo unos pocos espermatozoides alcanzan la porción ampular de las trompas de Falopio, donde deben coincidir con un ovocito metafase II recién ovulado al que reconocen y con el que comienzan a interactuar (Carlson, 2019). Curiosamente, el número de espermatozoides que alcanza el lugar de fecundación se mantiene constante entre algunas especies, lo que potencia el papel de barrera selectiva que ejerce el tracto reproductivo femenino. Aunque, a su vez, también debe crear un ambiente propicio que facilite la capacitación espermática (Bianchi & Wright, 2016).

Si la fecundación no ocurre, estas células no son capaces de sobrevivir durante mucho tiempo por sí solas, y se produce su degeneración en el tracto genital femenino (Suarez, 2015). De lo contrario, si el espermatozoide capacitado se aproxima al ovocito y logra introducirse en su interior, mantendrá asegurada su supervivencia (Clift & Schuh, 2013; Tosti & Ménézo, 2016; Bianchi & Wright, 2016; Carlson, 2019).

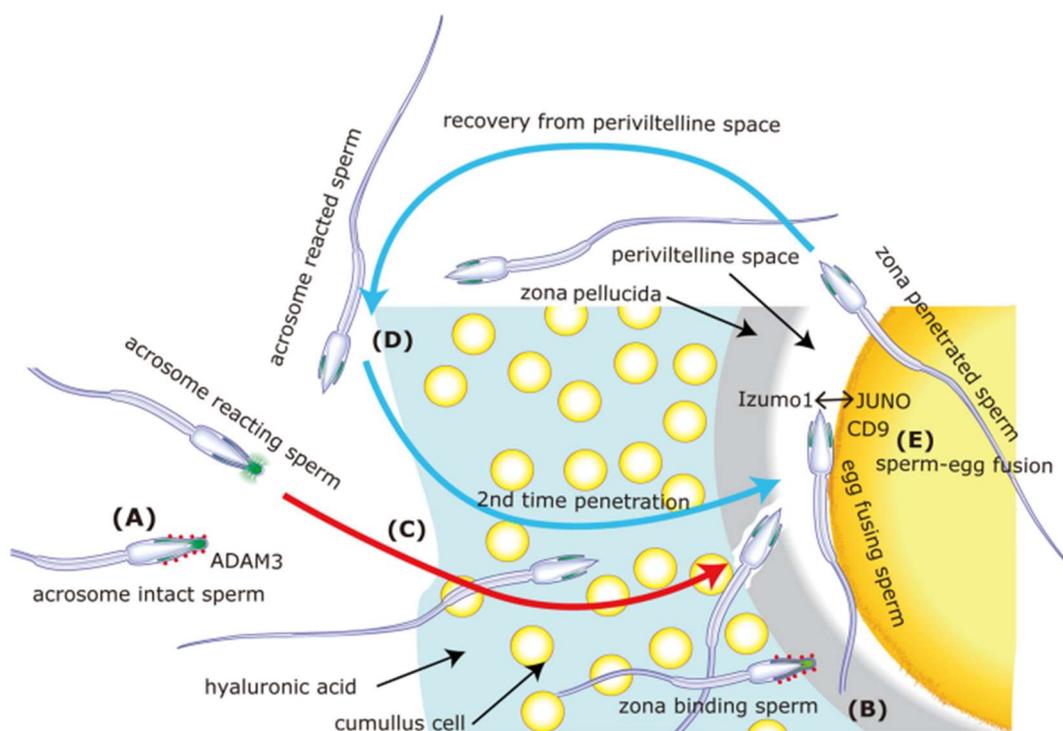
Los ovocitos son liberados del ovario rodeados de una matriz glicoproteica denominada zona pelúcida, que está rodeada de una capa de células del cúmulo conocido como complejo cúmulo oóforo (CCO) que producen ácido hialurónico. Ambas estructuras deben mantener su integridad e interactuar con el espermatozoide, que logrará reconocerlas y penetrarlas para alcanzar al ovocito (Ikawa et al., 2010; Bianchi & Wright, 2016).

Durante la fecundación, la zona pelúcida posee además una capacidad selectiva específica de especie, aunque se ha demostrado que no es igual de eficaz en todas las especies (Bedford, 1977; Yanagimachi, 1978; Dean, 2014). Por otro lado, la zona pelúcida también ejerce un papel de barrera frente a la poliespermia, impidiendo que se unan espermatozoides a ella una vez que ocurre la fecundación (Yanagimachi, 1994). Estas características han levantado el interés de muchos investigadores, que continúan estudiando la estructura y funciones de la zona pelúcida en profundidad (Bianchi & Wright, 2016; Moros-Nicolás et al., 2021; Gupta, 2023).

El paso por el CCO es facilitado por las hialuronidasas presentes en la superficie del espermatozoide, tales como SPAM1 o HYAL5 (Kimura et al., 2009; Martin-Deleon, 2011), y en cuanto a la zona pelúcida, son las enzimas proteolíticas liberadas por el acrosoma mediante la reacción acrosómica, tales como ACR, TESP1-TESP5 (Yamashita et al., 2008), las que permitirán la disgregación de sus proteínas. A su vez, el movimiento característico del espermatozoide hiperactivado se cree que también facilita el avance hacia el interior del ovocito (Ikawa et al., 2010; Okabe, 2014; Bianchi & Wright, 2016).

Finalmente, el espermatozoide se adhiere a la membrana plasmática del ovocito y se fusiona con ella. Para que tenga lugar su reconocimiento, adhesión y fusión, también hay proteínas esenciales que se expresan en la superficie de

ambos gametos de la especie humana. El estudio de estos procedimientos continúa revelando nuevas interacciones y moléculas involucradas: IZUMO, SPACA6, TMEM95 y MAIA en el espermatozoide, o JUNO y CD9 en el ovocito, son algunos de los ejemplos (**Figura 7**) (Trebichalská & Holubcová, 2019; Bianchi & Wright, 2020; Tang et al., 2022; Vondrakova et al., 2022).



**Figura 7.** Mecanismos de fertilización. A) proteína ADAM3 en la superficie de espermatozoide en migración; B) Reconocimiento de zona pelúcida; C) Reacción acrosómica del espermatozoide; D) espermatozoides reaccionados recuperados del espacio perivitelino, penetrando nuevamente la zona pelúcida (Inoue et al., 2011) (Fuente: Okabe, 2014)

Antes de que ocurra la fecundación, los gametos se encuentran transcripcionalmente silenciados (Niakan et al., 2012) pero, cuando ésta se produce, el espermatozoide provoca la liberación del factor fosfolipasa C zeta (PLC-zeta), que induce oscilaciones en los niveles de calcio intracelular desencadenando la activación del ovocito (Saleh et al., 2020; Rojas et al., 2021; Tarozzi et al., 2021). En este momento comienzan a ponerse en marcha una serie de mecanismos como la reacción cortical o la reanudación de la meiosis, que ayudan a prevenir la poliespermia y promueven la continuación del desarrollo del embrión (Wassarman & Listscher, 2008; Okabe, 2014; Rojas et al., 2021; Tarozzi et al., 2021).

La reacción cortical produce la transformación de la zona pelúcida, endureciendo su estructura e impidiendo el paso de más espermatozoides al interior del ovocito (Wassarman & Listscher, 2008; Okabe, 2014). La exocitosis de los gránulos corticales libera proteasas, glicoproteínas y proteínas estructurales entre otras moléculas, que atacan y transforman a la zona pelúcida. En concreto, la ZP2 sufre una proteólisis por acción de la ovastatina liberada por los gránulos, cuya difusión por la matriz se ha demostrado que ocurre pocas horas tras la fecundación (Burkart et al., 2012). Otro ion presente en los gránulos que participa en el endurecimiento de la zona pelúcida es el zinc, y su liberación es conocida como “chispas de zinc”. Se ha visto como la exposición de este metal en la zona pelúcida, reduce la cantidad de espermatozoides que interaccionan con el ovocito (Que et al., 2017; Fahrenkamp et al., 2019; Rojas et al., 2021).

Con la reanudación de la meiosis, se ponen en marcha una serie de mecanismos celulares: se completa la segunda división meiótica del ovocito que estaba detenido en metafase II, se determina la transición materno-cigótica, proceso en el que se degradarán progresivamente los depósitos moleculares pertenecientes al ovocito coincidiendo con la activación del genoma de cigoto (Schulz & Harrison, 2019), y se promueve la protección del embrión hasta su implantación (Rojas et al., 2021; Tarozzi et al., 2021).

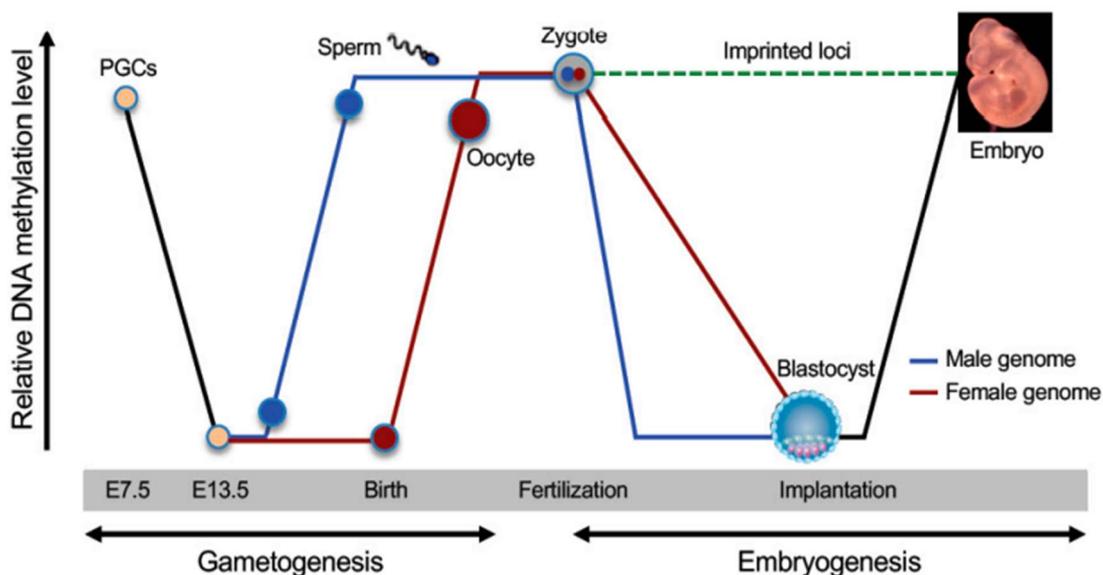
Cuando se fusionan las membranas de ambos gametos, el núcleo del espermatozoide libera su cromatina condensada que sufrirá una remodelación, reemplazando las protaminas por histonas de origen materno. A continuación, y de forma independiente, los genomas de ambos gametos son rodeados por una membrana constituyendo los pronúcleos masculino y femenino (Van Blerkom et al., 1995; Carlson, 2019; Tarozzi et al., 2021).

Una vez formados, migran al centro del ovocito y se posicionan uno frente al otro, liberándose de su envoltura para proceder a la singamia, momento en el cual se combinan las parejas de cromosomas paterno y materno formando el verdadero núcleo del cigoto, y dando por concluida la fecundación (Perreault, 1992; Valdés Valdés et al., 2010; Carlson, 2019; Tarozzi et al., 2021).

## 2.2.2.2. Formación del cigoto

El cigoto posee un carácter totipotencial, y para ello es necesario que ocurra una reorganización de la cromatina y un borrado general de las marcas epigenéticas existentes en los genomas de los progenitores. Este proceso se conoce como “reprogramación”, y se expresa mediante una pérdida de la metilación de ADN y una modificación de las proteínas histonas que sufren de forma asincrónica el genoma materno, y sobre todo el paterno tras la fecundación (Ladstätter et al., 2019; Schulz and Harrison, 2019).

Es un proceso altamente conservado en el reino animal (Zeng & Chen, 2019; Lu et al., 2021), y debe ocurrir durante el desarrollo de cada nueva generación en la que se identifican dos olas claras de desmetilación y remetilación global. La primera ola ocurre en la línea germinal, durante la gametogénesis, y la segunda, poco después de la fecundación, alargándose durante las primeras etapas de la embriogénesis (**Figura 8**) (Zeng & Chen, 2019).



**Figura 8.** Cambios dinámicos en la metilación del ADN durante el desarrollo en mamíferos (Fuente: Zeng & Chen, 2019)

Posteriormente, y de forma gradual, el embrión irá perdiendo este carácter totipotencial para dar paso a la diferenciación y especificación celular, reestableciendo su identidad y adaptando sus nuevos perfiles epigenéticos a los diferentes tipos celulares, tejidos y órganos que conformarán al nuevo individuo (Plant et al., 2014; Hanna et al., 2018; Canovas & Coy, 2019).

Esta reprogramación epigenética también es un proceso altamente conservado en el reino animal, aunque pueden encontrarse representados en formatos diferentes (Zeng & Chen, 2019; Lu et al., 2021).

### 2.2.2.3. Primeras divisiones embrionarias: Segmentación

Las primeras etapas del desarrollo embrionario comienzan cuando el cigoto, localizado todavía en las trompas de Falopio, continúa su libre circulación hacia el útero (Ezzati et al., 2014; Suarez, 2015). Este tránsito es promovido por los movimientos ciliares, las contracciones musculares y las secreciones del epitelio del oviducto y, recientemente, se ha demostrado su regulación genética identificando en ratones el gen *Agrd1* como uno de los protagonistas (gen receptor de adhesión acoplado a proteínas G D1). Este gen se expresa en el epitelio del oviducto, y el modelo KO de *Agrd1* presenta una retención de los embriones en la ampolla del oviducto causando esterilidad (Bianchi et al., 2021).

Cuando el cigoto inicia el proceso de divisiones mitóticas conocido como segmentación, genera dos células iguales que se denominan blastómeras, aproximadamente a las 24 horas tras la fecundación. Cada blastómera da lugar a otras dos, y así sucesivamente durante los primeros días de desarrollo, acortando progresivamente el tiempo en que se sucede cada división. Las blastómeras poseen una morfología esférica y, aunque van aumentando en número, no lo hacen en tamaño, siendo cada vez más pequeñas y permitiendo que el embrión conserve durante estas primeras divisiones el tamaño original del cigoto.

Durante la etapa de segmentación, el embrión se encuentra todavía envuelto por la zona pelúcida, lo que le proporciona cierta rigidez y protección (Moore et al., 2016; Carlson, 2019; Schoenwolf et al., 2022).

Fisiológicamente, la síntesis de proteínas que se produce en el cigoto depende todavía del ARN mensajero (ARNm) materno, y los primeros acontecimientos del desarrollo embrionario están dirigidos por depósitos moleculares pertenecientes al ovocito primitivo (Geldziler et al., 2011; Cockburn & Rossant, 2010). Es en este momento cuando tiene lugar la transición materno-cigótica, imprescindible para la supervivencia del embrión durante el desarrollo temprano (Braude et al, 1988; Schulz & Harrison, 2019; Mu et al., 2022).

Los cambios transcripcionales que se suceden durante la activación del genoma embrionario es un proceso dinámico que coinciden con determinados puntos críticos de división de las blastómeras, evidenciando una ola temprana de activación que coincide con la división en 4 células, seguida de otra mayor a las 8 células (Braude et al., 1988; Schulz & Harrison, 2019). Algunos estudios realizados en la especie humana han observado los primeros signos de transcripción en el estadio bicelular (Vassena et al., 2011), e incluso poco después de la fecundación (Asami et al., 2022), pero se mantiene que es en la etapa de 8 células cuando ocurre la mayor oleada de transcripción del genoma embrionario, esencial para la segregación de los diferentes linajes celulares (Niakan et al., 2012; Eckersley-Maslin et al., 2018).

Gran parte de estas modificaciones moleculares se pueden observar en diferentes especies del reino animal, aunque los tiempos en los que se producen, así como los factores que lo regulan, pueden variar de forma significativa (Schulz & Harrison, 2019).

#### 2.2.2.4. Formación de la mórula

Coincidiendo aproximadamente con el periodo de 8 células (Tocci, 2020), aunque sin interrumpir el proceso de división de las blastómeras que continúa aumentando de 8 a 16 y 32 células, el embrión comienza a estrechar la unión entre ellas, ampliando el área de contacto y modificando las conexiones intercelulares (Shahbazi, 2020). Ello le proporciona un aspecto más compacto, parecido a una mora, que dará nombre a esta fase de mórula (Edwards et al., 1969; Plant et al., 2015; Wamaitha & Niakan, 2018), considerada como el primer signo de diferenciación celular (Mihajlović & Bruce, 2017; Coticchio et al., 2019).

Paralelamente, aunque regulado por diferentes vías (Stephenson et al., 2010; Zhu et al., 2021), se sucede una polarización apico-basal de un grupo de blastómeras, las más superficiales, seguido de otro proceso de internalización que reestructurará al embrión en dos capas bien definidas, aunque todavía con cierta capacidad reversible durante esta etapa (De Paepe et al., 2013; Toyooka, 2020; Guo et al., 2020).

Así, en función de la posición que ocupen las blastómeras, pasarán a formar parte del trofoectodermo (o TE), la capa más externa de células

polarizadas en contacto con la superficie y que mantiene una arquitectura interna con mayor definición; o la masa celular interna (o MCI), la capa de células apolares localizada en profundidad, con un patrón de distribución sin disposición aparente y cuyo potencial de diferenciación pasa a tener carácter pluripotencial (Coticchio et al., 2019; Zhu & Zernicka-Goetz, 2020; Gauster et al., 2022).

La modificación que se produce en las conexiones intercelulares conlleva la formación de nuevos complejos de unión con diferentes propiedades estructurales, moleculares y funcionales, que tendrán un papel fundamental en la comunicación celular, la adhesión y la diferenciación celular. Así encontramos una predominación de uniones intercelulares estrechas (*tight junctions*), adherentes y de tipo desmosomal en el grupo de células más superficiales, permitiendo la polaridad e impermeabilidad de esta capa; y por otro lado la formación de uniones de tipo hendidura o comunicantes (*gap junctions*), que aparecen de forma más densa en la capa externa y de forma puntual en las células más internas. Este último tipo de unión facilita la comunicación más directa y fluida entre los citoplasmas de las células vecinas (Hardy et al., 1996; Sozen et al., 2014; Tocci, 2020).

Todos estos mecanismos están dirigidos por los nuevos factores de transcripción procedentes de la activación del genoma embrionario, y gracias a que se han conservado en gran medida en los mamíferos, nos ha permitido estudiarlos en diferentes modelos animales, aclarando gran parte de la forma en la que se origina esta etapa y cómo influye en sucesivos acontecimientos moleculares y celulares del embrión (Jedrusik, 2015, Coticchio et al., 2019).

En reproducción asistida, la mórula ha sido catalogada como una masa indistinguible de células en día 4 de desarrollo (Magli et al., 2012; Coticchio et al., 2019; Gauster et al., 2022). Debido a que su morfología no se ha prestado a una clasificación clara y práctica, el análisis de otros momentos del desarrollo embrionario se ha considerado más relevantes:

1. Día 1: se confirma la fecundación
2. Día 2-3: se evalúa la segmentación
3. Día 5-6: se clasifica la calidad del blastocisto

Durante la etapa de mórula, se han descrito mecanismos de autocorrección de anomalías cromosómicas, ganando importancia el estudio de esta etapa en profundidad (Lagalla et al., 2017).

El momento exacto en el que inicia y se completa esta etapa en la especie humana no está claro, y puede ser bastante heterogéneo, aunque el momento en el que el embrión abandona las trompas de Falopio y entra en la cavidad uterina para continuar con la formación del blastocisto y proceder a la implantación corresponde con la etapa de mórula (Red-Horse et al., 2004; Kim & Kim, 2017; Coticchio et al., 2019; Zhu et al., 2021).

#### 2.2.2.5. Formación del blastocisto

Fruto de la primera diferenciación celular, se forma en el quinto día de desarrollo embrionario el blastocisto, una estructura multicelular formada por una fina capa de células epiteliales superficiales o TE, una cavidad interna llena de líquido o blastocele, y un grupo de células internas pluripotenciales localizado en uno de los polos, la MCI (Shahbazi, 2020).

El **trofoectodermo** irá adquiriendo madurez durante esta etapa para desarrollar las diferentes funciones que lo caracterizan. La función de actuar como barrera permeable (Firmin & Maitre, 2021) impidiendo la salida del líquido que se está acumulando en su interior, y a su vez favoreciendo la entrada de agua a través de canales de acuaporinas y del gradiente osmótico activo que se crea por la entrada continua de iones de sodio (Watson and Barcroft, 2001; van Marion et al., 2022; Gauster et al., 2022); o su papel fundamental durante la implantación en la mucosa uterina (Meistermann et al., 2021), pues es el primero que establecerá el contacto estrecho con el endometrio materno. También es el precursor de las células del trofoblasto que, tras la implantación, se localizarán en la placenta y en las membranas fetales (Turco & Moffett, 2019; Gauster et al., 2022).

La formación del **blastocele** es crucial para el desarrollo preimplantacional (van Marion et al., 2022), y poco a poco la MCI se irá desplazando hacia uno de los polos, el polo embrionario (Ryan et al., 2019). A medida que avanza su expansión, aumenta el diámetro del embrión y la presión hidrostática que se genera sobre sus paredes, provocando el aplanamiento de las células del TE

que lo rodean (Alarcon & Marikawa, 2022). A estos eventos se suma la acción química de factores enzimáticos procedentes del TE y la acción mecánica de pequeñas contracciones, ambas invaden una zona concreta de la zona pelúcida del polo abembrionario, provocando finalmente la rotura de la zona pelúcida y la salida completa del embrión hacia el exterior, acto que se conoce como eclosión (Sathananthan et al., 2003; Gauster et al., 2022). En este momento, el blastocisto puede continuar con su crecimiento y tiene plena capacidad para implantar, por lo que se verá obligado a abandonar su libre circulación e iniciar el proceso de implantación en el endometrio uterino (Posfai et al., 2019). Se ha descrito que el grado de expansión del blastocisto proporciona información sobre su potencial de implantación, al contar con mayor superficie de contacto (Du et al., 2016).

Las **células de la masa celular interna** llevarán a cabo la segunda diferenciación celular antes de la implantación, dando lugar al epiblasto (EPI), que contribuye a la formación de los tejidos propios del feto, y al hipoblasto o endodermo primitivo (PrE), que dará lugar junto con las células del trofoblasto a los tejidos extraembrionarios (Rossant & Tam, 2022). Estudios recientes han observado que, a diferencia del ratón, en el que estas dos capas se forman al mismo tiempo, en el ser humano primero se produce una diferenciación del EPI, y es este último el que promueve seguidamente la del PrE, estableciendo también un diálogo molecular con el TE para ayudarlo a completar su maduración (Meistermann et al., 2021). La región del TE adherida a las células de MCI se denomina polo embrionario, y será la primera zona del blastocisto que interaccione con el endometrio uterino (Gauster et al, 2022).

#### 2.2.2.6. Características morfocinéticas y clasificación ASEBIR

Gracias a las técnicas de imagen en tiempo real y al cultivo prolongado de embriones que se realiza en los laboratorios de RA, se han caracterizado diferentes parámetros morfológicos y cinéticos durante el desarrollo embrionario preimplantacional. Muchos de ellos se utilizan como indicadores de la calidad embrionaria y potencial de implantación (Basile et al., 2015; Nasiri & Eftekhari-Yazdi, 2015; Cuevas Saiz et al., 2018; Liu et al., 2020).

La Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR) junto con la SEF, han establecido un sistema de clasificación embrionaria en

base a las características morfológicas ideales para el éxito en la implantación (Martínez et al., 2021). A continuación, basado en estos criterios, se detallan las principales características morfocinéticas del embrión según el día de desarrollo que presenta:

### **Día 0: Evaluación y selección del ovocito**

Aunque el ovocito no se incluye como parámetro relevante en la clasificación embrionaria, se recomienda tener en consideración las características morfológicas intra y extra citoplasmáticas que pueden comprometer el desarrollo futuro del embrión. Se calcula que un 60-70% de los ovocitos extraídos pueden presentar alteraciones morfológicas (Saiz et al., 2017). Las principales características que debe presentar el ovocito metafase II son un tamaño moderado de 110-115  $\mu\text{m}$  ( $<200 \mu\text{m}$ ), un citoplasma nítido y no excesivamente granulado, un espacio perivitelino pequeño, un corpúsculo polar intacto y una zona pelúcida clara (**Figura 9**) (Alvarez et al., 2007; Rienzi et al., 2012; Saiz et al., 2017).



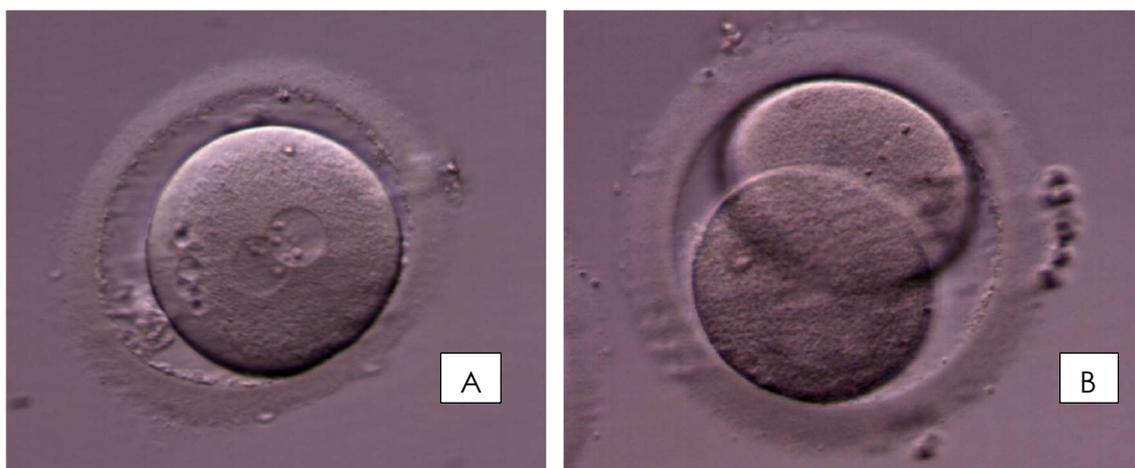
**Figura 9.** Ovocito metafase II (Imagen cedida por el laboratorio de Next Fertility Clinic, Murcia)

### **Día 1: Cigoto y segmentación temprana**

La confirmación de la fecundación y estado de cigoto se confirma con la presencia de los 2 corpúsculos polares de igual tamaño y 2 pronúcleos (2PN2PB), aproximadamente a las 16-18 horas postinseminación (**Figura 10.A**) (Payne et al., 1997; Balaban et al., 2011). Embriones con patrones diferentes están asociados con evolución errónea por aneuploidías o partenogénesis (Mateo et al., 2013). Algunas características morfológicas del cigoto se han

utilizado como indicadores de la calidad de ambos gametos y del potencial de implantación del embrión: el número y distribución de los cuerpos precursores nucleolares (Tesarik & Greco, 1999), o aspectos morfológicos del pronúcleo (Balaban et al., 2001), son algunos de los parámetros evaluados. Dichas características están estrechamente vinculadas al tiempo, y su utilidad cobra sentido únicamente con el uso de sistemas avanzados como la microscopía en tiempo real (Montag et al., 2011; Gardner & Balaban, 2016).

La primera división celular se evalúa aproximadamente a las 25-27 horas tras la fecundación, con la fracción del cigoto en 2 blastómeras iguales mononucleadas y menos de un 20% de fragmentación (**Figura 10.B**) (Gardner & Balaban, 2016; Saiz et al., 2017).



**Figura 10.** Cigoto (A) y primera división embrionaria (B)  
(Imagen cedida por el laboratorio de Next Fertility Clinic, Murcia)

### Día 2 y 3: Embrión temprano

Durante esta etapa, se definen 4 categorías relacionadas con el potencial de implantación del embrión, siendo la categoría A la de mayor potencial de implantación y D la de menor. Se valora el tiempo de división, número y tamaño de las blastómeras, el grado y tipo de fragmentación, la visualización del núcleo y multinucleación, la vacuolización y la zona pelúcida entre otras anomalías (**Tabla 1**) (Gardner & Balaban, 2016; Saiz et al., 2017).

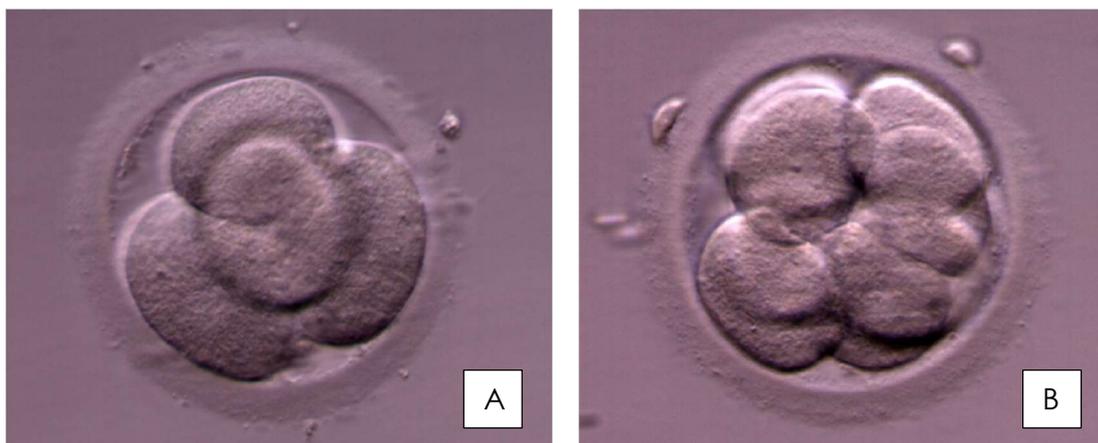
**Tabla 1.** Clasificación del embrión temprano en D+2 y D+3 según criterios ASEBIR. Las características negativas dominan el grado de asignación (Saiz et al., 2017)

GRADO	Día	Nº de células ("→" paso de D+2 a D+3)	% Fragmentos	Simetría celular	Multinucleación	Otros
<b>A</b>	D+2	4	≤10%	estadio-específico	NO	NORMAL
	D+3	7, 8				
<b>B</b>	D+2	5	>10-25%	4→7 células NO estadio-específico en D+3	NO	≤50% células con vacuolas pequeñas, o bien ZP Anormal
	D+3	5 → 7 - 10 4 → 9, 10				
<b>C</b>	D+2	2, 3, 6	>25-35%	2, 4, 8 células NO estadio-específico	1cel bn D+2, o bien 1-2cel bn D+3 y el resto como Grado A <sup>(2)</sup>	≤50% células con vacuolas grandes
	D+3	2, 3 → 6 - 9 6 → 8 - 10 6, 11, 12				
<b>D</b>	D+2	3 (NO estadio-específico), >6	>35%	3 células No estadio-específico en D+2	Cualquier otro tipo de multinucleación	>50% células con vacuolas, o bien Grave Alteración citop. <sup>(3)</sup>
	D+3	3 - 5, 1 más que en D+2				
Embriones Excluidos de la clasificación por probabilidad de implantación prácticamente nula: Falta de división en 24h; >50% de Fragmentación; Vacuolas grandes en >50% de las células; Combinación de >2 anomalías propias de grado D						

(2) "bn" = Binucleada

(3) Ejemplo de grave alteración citoplasmática: anillo citoplasmático muy evidente

A las 43-45 horas se identifican cuatro blastómeras iguales, aunque después de la primera mitosis no siempre se guarda sincronía en las divisiones, pudiendo observarse embriones de 3, 5 o 6 células (Martínez & Peláez, 2017); el citoplasma, no contiene vacuolas ni granulación excesiva; los porcentajes de fragmentación deben mantenerse en valores inferiores al 20% durante esta etapa; debe haber ausencia de multinucleación; por último, la zona pelúcida debe presentarse sin anomalías. A las 67-69 horas postfecundación, encontramos idealmente un embrión dividido en 8 blastómeras iguales, con el resto de las características iguales al día anterior (**Figura 11**) (Alvarez et al., 2007; Balaban et al., 2011; Nasiri & Eftekhari-Yazdi, 2015; Gardner & Balaban, 2016; Saiz et al., 2017).



**Figura 11.** Embrión en 4 células (A) y 8 células (B)  
(Imagen cedida por el laboratorio de Next Fertility Clinic, Murcia)

#### **Día 4: Mórula**

De entre todos los estadios del desarrollo embrionario, la mórula ha sido el menos determinado. Su valoración se realiza a las 90-94 horas de desarrollo embrionario, en este momento el embrión debe haber comenzado su cuarta ronda de divisiones mitóticas (> 8 blastómeras), y se caracteriza por la compactación celular que idealmente debe presentarse de forma homogénea en casi la totalidad del embrión, disminuyendo el tamaño total de la mórula y aumentando el espacio existente entre el embrión y la zona pelúcida (Balaban et al., 2011; Gardner & Balaban, 2016). Igualmente, deben tenerse en cuenta el resto de las características morfológicas de mal pronóstico de implantación, como la fragmentación, vacuolización y la cavitación intracelular.

ASEBIR propuso una clasificación de la mórula basada en 4 categorías, cada categoría establecida en D+4 se asigna teniendo en cuenta la se había establecido en D+3, y cualquier embrión que presentase una fragmentación celular superior a 35% y una excesiva vacuolización, se le asignaba directamente la categoría D. Se puede observar en detalle en la **Tabla 2** (Saiz et al., 2017; Martínez et al, 2021).

**Tabla 2.** Esquema de gradación de la etapa de mórula D+4 según criterios de ASEBIR 2021.

D+3	Características morfológicas en D+4	D+4
A	Cavitación temprana Compactación total y >8 células	A
	Compactación parcial (1-2 cél. excluidas)	B
	Compactación parcial (>2 cél. excluidas) No compactación (> 8 cél.)	C
	No compactación (< 8 cél.) <50% compactación	D
B	Cavitación temprana Compactación total y >8 células Compactación parcial (1-2 cél. excluidas)	B
	Compactación parcial (>2 cél. excluidas) No compactación (> 8 cél.)	C
	No compactación (< 8 cél.) <50% compactación	D
C	Cavitación temprana Compactación total y >8 células	C
	Compactación parcial <50% compactación No compactación	D
D	Cualquier característica	D

Cualquier embrión que presente en D+4:  
 - Fragmentación celular > 35%  
 - Excesiva vacuolización

→

D

Embriones excluidos de la clasificación por probabilidad de implantación prácticamente nula: Falta de división en 24h y embriones que presentan una combinación de >2 características propias de la categoría D.

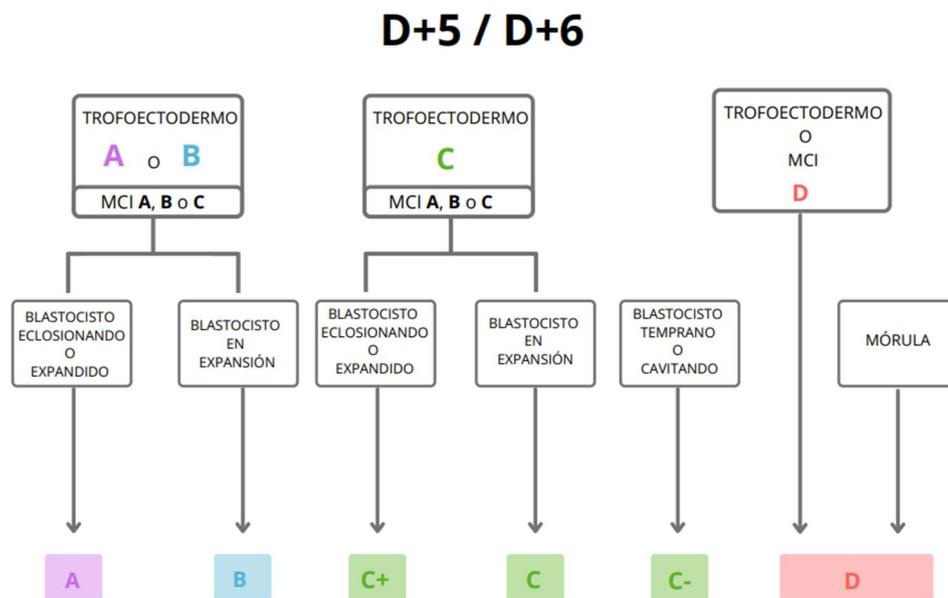
### Día 5 y 6: Evaluación morfológica del blastocisto

El intervalo de observación de día 5, está ajustado a las 114-118 horas postinseminación, y el día 6, a las 136-140 horas. El blastocisto se caracteriza por su capa envolvente o TE, que idealmente es homogéneo y con numerosas células epiteliales elípticas en cohesión; la cavidad interna o blastocele en expansión; y la MCI o embrioblasto, localizado en uno de los polos, presentando una composición compacta, clara y definida. Conforme avanza el grado de expansión del blastocele, el blastocisto aumenta su tamaño y disminuye el grosor de la zona pelúcida hasta producirse la eclosión liberándose de la zona pelúcida (**Figura 12**) (Hardarson et al., 2012; Saiz et al., 2017).



**Figura 12.** Blastocisto expandido (A) y blastocisto eclosionando (B) (Imagen cedida por el laboratorio de Next Fertility Clinic, Murcia)

El sistema de clasificación de ASEBIR considera como parámetros principales la expansión del blastocele, las características del TE y la MCI. En este caso no se tienen en cuenta las valoraciones realizadas en estadios anteriores (Saiz et al., 2017), y se unifican los criterios de día 5 y día 6 tal y como se muestra en la **Figura 13** (Martínez et al., 2021).



**Figura 13.** Gradación embrionaria en estadio D+5/D+6 según criterios de ASEBIR 2021 (Blastocisto en expansión: tamaño  $\leq 165 \mu\text{m}$ , blastocisto expandido:  $>165 \mu\text{m}$ ; Trofoectodermo A: 14 células o más, B: 11-13; C:  $\leq 10$ ; MCI tipo A: compacta con tamaño  $1900 - 3800 \mu\text{m}^2$ , tipo B: pierde la compactación, tipo C: tamaño  $< 1900 \mu\text{m}^2$ , y D: con signos de degeneración) (Martínez et al., 2021)

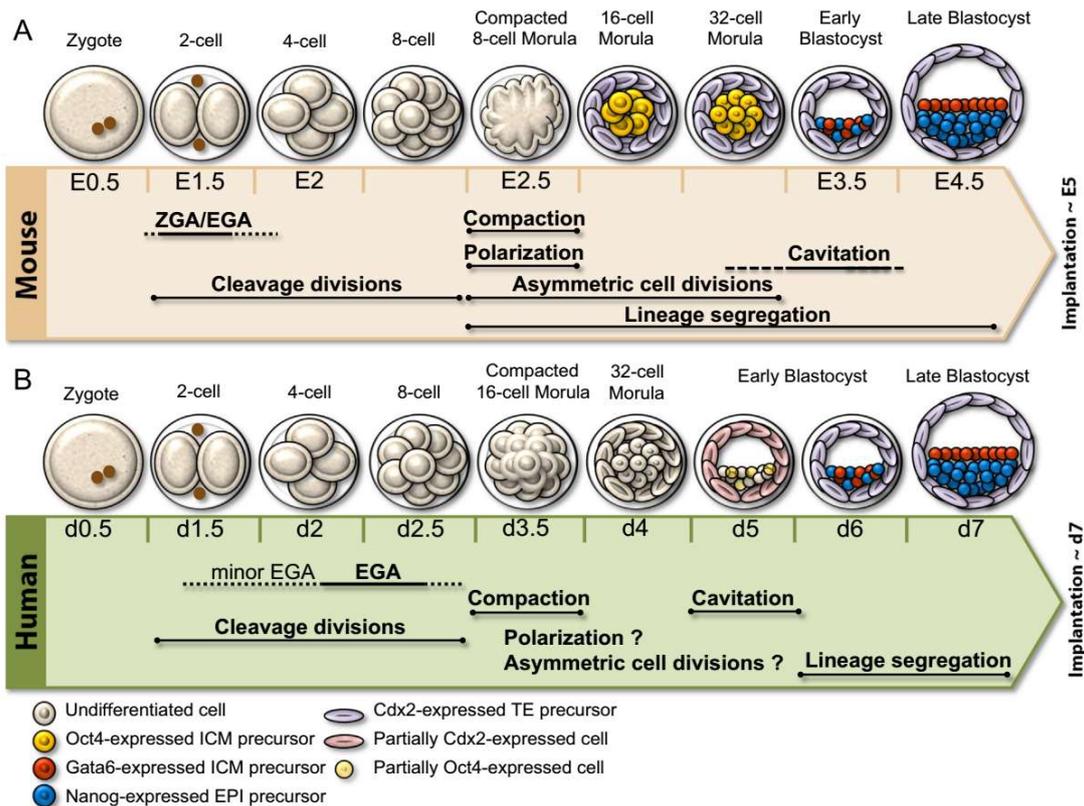
### 2.2.2.7. Diferencias y similitudes entre la especie humana y murina

El conocimiento de la embriología humana ha ido ligado históricamente a la comparación de otros modelos animales. Dentro de los mamíferos, y teniendo en cuenta la gran diversidad que existe en el reino animal, es curioso que los primeros estadios del desarrollo embrionario sean muy similares entre ellos (Gerri et al., 2020).

Una de las especies más utilizadas como modelo de experimentación animal durante más de 40 años ha sido la especie murina, por la capacidad para manipular sus embriones. Con la aplicación de los modelos KO para estudiar la funcionalidad de los genes y la secuenciación del genoma completo se ha conseguido identificar cualquier gen fácilmente, así como comprender sistemas biológicos más complejos (Artzt, 2012).

Durante el desarrollo preimplantacional, la morfología de los embriones en ambas especies es muy parecida, pero, aunque guarden muchos aspectos en común, también hay otras diferencias a considerar, ya que no reflejan la realidad del comportamiento humano (Cockburn & Rossant, 2010; Blakeley et al., 2015; Rossant, 2015; Ortega et al., 2018).

Después de la fecundación, ambos inician divisiones mitóticas, compactación y cavitación para formar el blastocisto (Blakeley et al., 2015; Toyooka, 2020; Biondic et al., 2023). Durante esta etapa, el desarrollo embrionario del humano va un poco más ralentizado con respecto al de ratón (Sozen et al., 2014; Gerri et al., 2020; Shahbazi, 2020). Por ejemplo, la primera división del cigoto ocurre a las 16-20 horas en ratón, comparado con 25-27 horas en humanos (Chazaud & Yamanaka, 2016; Schulz et al., 2019), o si consideramos la duración del periodo preimplantacional, conlleva 4,5 días en ratón, a diferencia de los 7 días en la especie humana (**Figura 14**) (Niakan et al., 2012; Molè et al., 2020; Gerri et al., 2020).



**Figura 14.** Desarrollo preimplantacional en el ratón (A) y en el embrión humano (B) (Fuente: Sozen et al., 2014)

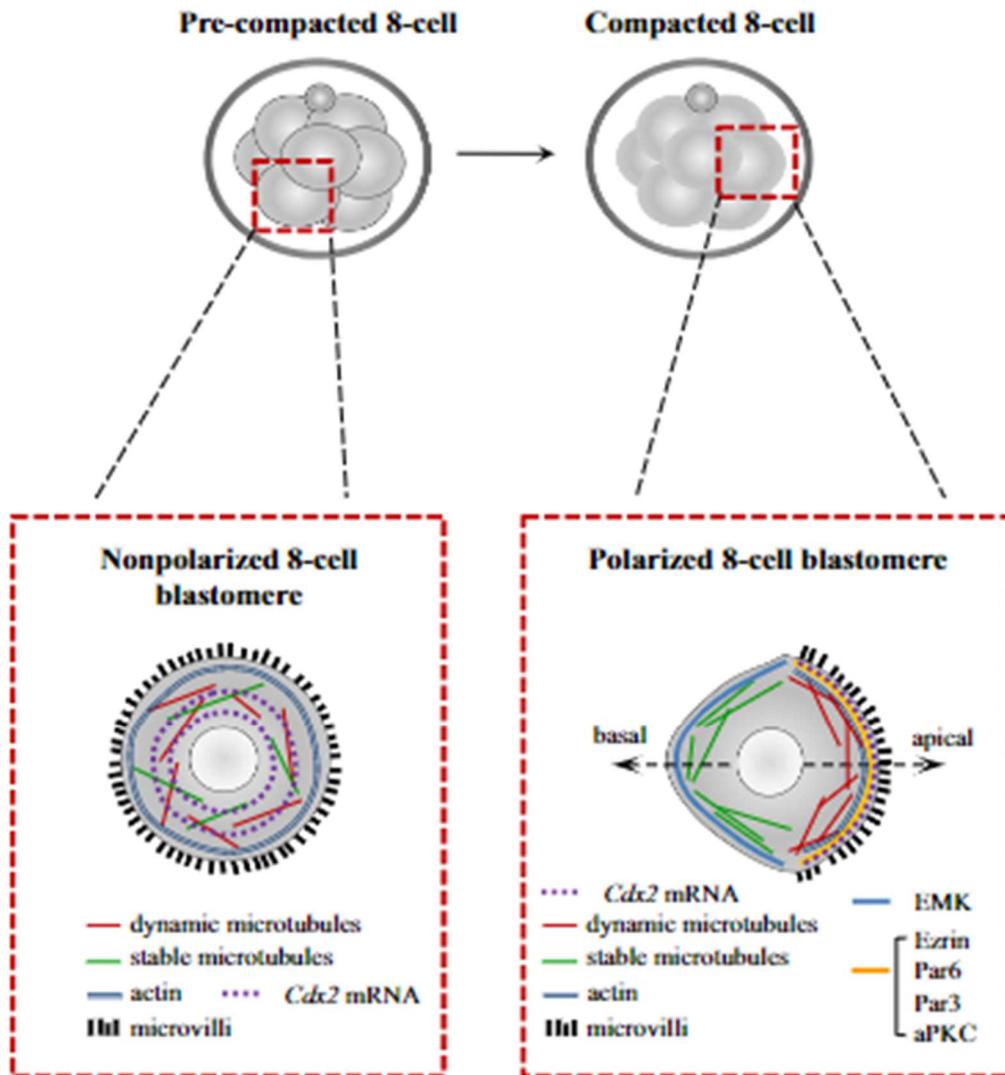
Cada vez son más numerosos los estudios de análisis de la expresión génica que revelan similitudes relevantes en los mecanismos de regulación de los linajes celulares durante la preimplantación; sin embargo, también sugieren la existencia de programas genéticos y vías de señalización que pueden variar entre ambas especies, cuya identificación es importante a la hora de interpretar marcadores moleculares (Sozen et al., 2014; Blakeley et al., 2015; Petropoulos et al., 2016; Boroviak et al., 2018; Shahbazi, 2020; Gerri et al., 2020; Zhu et al., 2021).

La mayor oleada de la activación del genoma embrionario en el ratón se produce cuando se encuentra dividido en 2 células (Schulz & Harrison, 2019), estando implicados genes como *Dux* (Hendrickson et al., 2017), o factores dependientes de la madre como *Dppa2*, *Dppa4* o *Smarca5* (Eckersley-Maslin et al., 2019; Alda-Catalinas et al., 2020). En el embrión humano, este proceso ocurre cuando se encuentra dividido en 8 células (Blakeley et al., 2015; Rossant & Tam, 2017), y también parece tener un papel relevante el gen *DUX4* (ortólogo de DUX) (Ortega et al., 2018; Vuoristo et al., 2022), aunque se ha identificado la

expresión de otros genes colaboradores como *POU5F1* o *SOX2* que no se expresan en el ratón en ese momento (Gao et al., 2018; Liu et al., 2019).

La segregación de las líneas celulares comienza con la compactación y polarización del embrión, que reorganiza el patrón de conexiones y la arquitectura interna de las blastómeras (Jedrusik, 2015; Zhu et al., 2021). Ambos procedimientos ocurren en el ratón a los 2,5 días postfecundación, cuando el embrión se encuentra dividido en 8 células. Durante la compactación, las blastómeras estrechan su contacto aplanando las células y estableciendo diferentes tipos de uniones intercelulares (Fleming et al., 1989). Mediante imágenes en tiempo real se ha observado la formación de prolongaciones entre ellas denominados filopodios, con altas concentraciones de *E-cadherina* y *Myosin-10* que contribuyen a generar fuerzas de tensión entre las células (Fierro-González, 2013; Chazaud & Yamanaka, 2016; Toyooka, 2020). Se crea una polaridad apico-basal disponiendo el dominio apical en la parte más superficial, rico en proteínas relacionadas con la polaridad, microvellosidades, microtúbulos dinámicos, actina y *Cdx2*; por otro lado, el dominio basolateral, orientado hacia el interior, tiene una conformación más estable con microtúbulos y proteínas de adhesión (**Figura 15**) (Vinot et al., 2005; Cockburn & Rossant, 2010; Zhu et al., 2020). En el embrión humano, compactación y polarización comienzan un poco más tarde, en el estadio de 16 células, lo que puede sugerir una regulación diferente de estos procesos (Molè et al., 2020; Zhu et al., 2021), aunque los primeros signos de polarización pueden apreciarse a partir de las 8 células (Iwata et al., 2014; Gerri et al., 2020).

En general, la polarización y el establecimiento de las comunicaciones intercelulares es un mecanismo bastante conservado entre especies (Gerri et al., 2020). Sin embargo, la diferenciación del TE es independiente de la polarización, aunque se vea reforzada por ella (Zhu et al., 2021), y son necesarios más estudios en el ser humano que confirmen estas conclusiones (Biondic et al., 2023).



**Figura 15.** Compactación y polarización en el ratón durante el estadio de 8 células. Ambos procesos reorganizan los patrones de contacto y la arquitectura interna de las blastómeras pudiendo ocurrir de forma independiente (Fuente: Jedrusik, 2015)

La diferenciación de la ICM y del TE en ratón ocurre en el estadio de mórula, apreciándose la madurez del TE a las 32 células (Cockburn & Rossant, 2010). Está controlada por factores de transcripción como *Cdx2* y *Pou5f1* (Niwa et al., 2005). La diferenciación de ambos linajes en el ser humano ocurre de forma simultánea cuando el embrión ya se encuentra en estadio de blastocisto (Petropoulos et al., 2016). La expresión de *CDX2* también se identifica durante esta etapa, aunque, a diferencia del ratón, tanto *CDX2* como *POU5F1* se expresan en las células de TE (Niakan & Eggan, 2013; Cockburn & Rossant, 2010; Petropoulos et al., 2016).

Aunque hay factores de transcripción críticos durante la diferenciación del TE o de la MCI que se expresan en ambas especies, genes como *CDX2*, *GATA3*, *YAP1*, *OCT4*, *SOX2*, *NANOG*, *GATA6*, *GATA4*, *SOX17* o *FGF*; algunos lo hacen en momentos diferentes del desarrollo embrionario, o incluso en otra localización celular, pudiendo variar entre ambas especies el papel que pueda desempeñar un determinado gen en ese momento (Niakan & Eggan, 2013; Gerri et al., 2020).

El gen *YaP1* es activo cuando está localizado en el núcleo celular en lugar del citoplasma, y ocurre durante el estadio de 8 células en todas las blastómeras de ratón. A partir de las 16 células y hasta el blastocisto temprano (E3.5), la localización nuclear está restringida a las células superficiales del embrión. Se ha demostrado el papel regulador de este gen sobre la expresión de *Cdx2*, precursor de la formación del trofoectodermo (Nishioka et al., 2009). Posteriormente *YaP1* también se expresa en el blastocisto expandido, participando en la diferenciación de las células del epiblasto (Hashimoto & Sasaki, 2019). En los últimos estudios de la especie humana se comparte que, tanto el proceso de polaridad, como la expresión de *YAP1*, juegan un papel importante en la diferenciación del TE (Gerri et al., 2020, Regin et al., 2022), aunque en humanos este gen se expresa en las células polarizadas superficiales y en las no polarizadas que se encuentran en el interior del embrión (Regin et al., 2022).

El grupo de Blakeley y colaboradores (2015) identificó factores de transcripción como *Id2*, *Cdx2*, *Eomes* y *Elf5* durante la diferenciación de las células de TE de ratón que no se expresaban durante la misma fase en el embrión humano (Blakeley et al., 2015). En cuanto al gen *CDX2*, los estudios de Niakan y colaboradores ya identificaban su expresión en el estadio de blastocisto en la especie humana (Niakan & Eggan, 2013); aunque estudios posteriores han defendido que la expresión más tardía de *CDX2* está relacionada con la segregación celular que también se identifica en humanos en un estadio más avanzado (Ng et al., 2008; Guo et al., 2010; Petropoulos et al., 2016). Por otro lado, el factor *TFAP2C*, necesario también en el mantenimiento del TE en ratón, se encuentra expresado en las células trofoblásticas de la placenta en humanos (Kuckenberget al., 2010; Biadasiewicz et al., 2011), por lo que no tendría sentido su utilización para evaluar la identidad del TE en la especie humana.

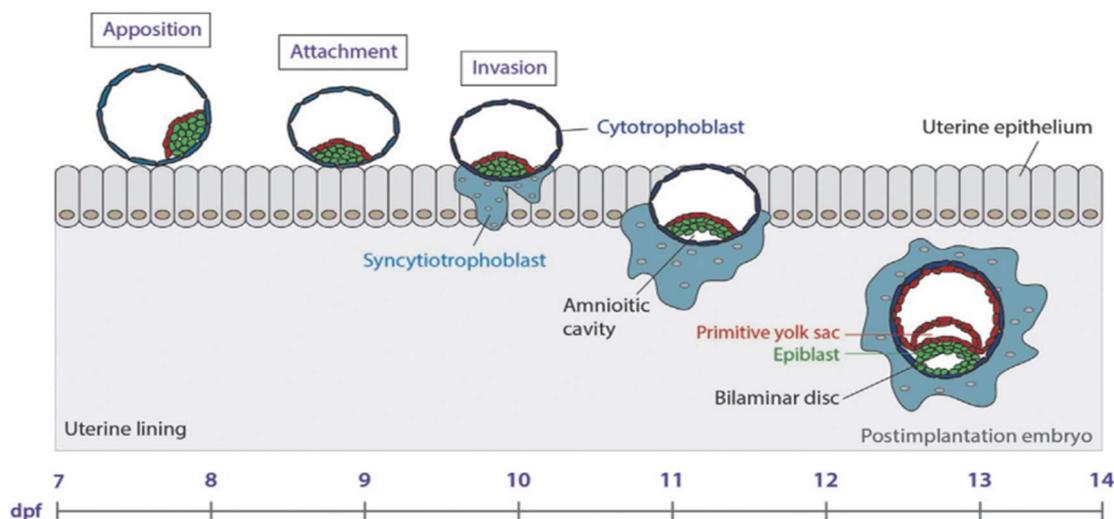
Boroviak y colaboradores (Boroviak et al., 2018), examinando la expresión génica unicelular de ratón, ser humano y una especie de primate (tití) durante la etapa preimplantacional, identificaron similitudes en cuanto a la transcripción de las moléculas de ARN de origen materno, en la que se observó que un 53% de los genes expresados eran comunes entre ratón y humano. Genes como *DPPA3*, *AZR1*, *PADI6* o *ZAR1L* se expresaban en las 3 especies. Así mismo, tanto la presencia de complejos represivos *Polycomb* que actúan durante la activación del genoma embrionario, como la actividad secuencial de los marcadores *GATA6*, *SOX17* y *GATA4* en el endodermo primitivo, o la expresión de *ETV4*, *SMAD6*, *KLF6* en la masa celular interna, eran procesos comunes en la especie humana y murina

Todavía se requieren más estudios para identificar el impacto que las diferencias en la expresión génica entre ambas especies causan sobre el desarrollo en esta etapa y, sobre todo, para aclarar los mecanismos que rigen la regulación y diferenciación celular en el desarrollo embrionario de la especie humana (Biondic et al., 2023).

### 2.2.3. Implantación embrionaria

La implantación es el acto mediante el cual el embrión abandona finalmente su libre circulación para establecer el primer contacto íntimo con el útero materno, introduciéndose en la mucosa endometrial y garantizando así una nueva fuente de alimentación (Posfai et al., 2019; Rossant & Tam, 2022). Se produce alrededor del día 7-10 posfecundación (Wamaitha & Niakan, 2018), y se completa a lo largo de una semana (Moore et al., 2016). Durante este proceso, se pueden diferenciar 3 etapas: (A) *aposisión*, referida al primer contacto que realiza el TE con la zona de implantación del endometrio; (B) *adhesión*, en la que las células denominadas ya trofoblásticas se unen al epitelio endometrial; (C) e *invasión*, que ocurre cuando las células invasoras del trofoblasto penetran la membrana basal de epitelio endometrial e invaden el estroma (Enders & Schlafke, 1967; Bischof & Campana, 1996). Durante su transcurso, las células epiteliales del TE deben modificar su naturaleza y transformarse en células de carácter mesenquimal, proceso que se conoce como transición epitelio-mesénquima (EMT, del inglés *Epithelial-Mesenchymal Transition*) (Kalluri &

Weinberg, 2009), proporcionándole un carácter migratorio e invasivo que facilita la penetración del embrión en el estroma endometrial (**Figura 16**) (Oghbaei et al., 2022).



**Figura 16.** Implantación humana (Fuente: Wamaitha & Niakan, 2018)

Pero ¿quién regula la comunicación entre el embrión y el endometrio? Para que ocurra la implantación debe existir un estrecho y sincronizado diálogo entre el endometrio receptivo y el embrión competente, es decir, el endometrio debe encontrarse en su ventana de implantación, en la que se expresarán una serie de genes que facilitarán el proceso de implantación; y el embrión en su estado de blastocisto eclosionado, con el TE en pleno estado de maduración preparado para establecer el primer contacto con la mucosa uterina (Ochoa-Bernal & Fazleabas, 2020).

El endometrio es una capa dinámica que sufre una transformación continua y regular en cada ciclo menstrual. Está formado por una región basal y una funcional. La región más superficial o funcional, en la que se produce la implantación, es susceptible a modificaciones hormonales, y en cada ciclo experimenta una compleja y coordinada preparación hormonal dirigida por el ovario (Gauster et al., 2022), y orientada a proporcionar un ambiente celular y nutricional adecuado para el embrión (Carlson, 2019). Si no hay fecundación, la región funcional se desprende, y comienza un nuevo ciclo menstrual que se sucederá de forma periódica durante toda la etapa reproductiva de la mujer

(Ochoa-Bernal & Fazleabas, 2020; Sadler, 2022). La región basal del endometrio, aunque no se desprende, sí jugará un papel importante en la regeneración de la capa funcional (Mazur et al., 2015). Por el contrario, si hay fecundación y se dan las condiciones señaladas, el endometrio modificará su curso cíclico para participar en la implantación y contribuir a la formación de la placenta (Carlson, 2019; Moore et al., 2016; Sadler, 2022).

La duración de la ventana de implantación es limitada y temporal, persistiendo un máximo de 4 días que corresponden al 7-10º día tras la ovulación (Ochoa-Bernal & Fazleabas, 2020). En su transcurso, el endometrio se encuentra en la fase secretora del ciclo y se caracteriza por la presencia de microvellosidades denominadas pinópodos (Nikas & Makrigiannakis, 2003). que se han asociado al aumento del factor inhibidor de la leucemia (*Leukemia Inhibitory Factor*, LIF) y sus receptores (Aghajanova et al., 2003), al aumento de progesterona y de Integrinas  $\alpha V\beta 3$ , todos ellos indispensables en la correcta comunicación entre blastocisto y endometrio (Ochoa-Bernal & Fazleabas, 2020).

El ambiente uterino que exige el embrión para desarrollarse necesita la colaboración de factores hormonales, moleculares y de expresión génica tales como moléculas de adhesión, citoquinas, factores de crecimiento, lípidos, proteínas, hormonas, factores que actúan sobre la inmunotolerancia materna, y muchos otros, cuya expresión se ha detectado de forma activa durante la implantación, dando una idea de la inmensa complejidad que conlleva el proceso (Aplin & Ruane, 2017; Mrozikiewicz et al., 2021).

Destacando algunos de ellos cabe citar la hormona gonadotropina coriónica humana (hCG), que ayuda en el mantenimiento del embarazo al asegurar la síntesis de progesterona, colabora en la angiogénesis y vasodilatación, en el crecimiento uterino, inhibe las contracciones uterinas, promueve la tolerancia materna y participa en la decidualización (Afshar et al., 2007; Cole, 2010; Ochoa-Bernal & Fazleabas, 2020). Esta hormona es sintetizada por las células del sincitiotrofoblasto (STB) (Gauster et al., 2022), y se utiliza a nivel clínico como indicador precoz de la presencia de embarazo (Ochsenkühn et al., 2009).

Las citoquinas adquieren un papel fundamental en la implantación debido al carácter “inflamatorio” del proceso, colaborando con la adaptación inmune, la remodelación tisular, adhesión y el desarrollo de la placenta. La interleucina 6 (IL-6) e interleucina 1 (IL-1), que se expresan también en el trofoblasto, junto con el LIF, actúan tanto en el desarrollo embrionario como durante la ventana de implantación (Ochoa-Bernal & Fazleabas, 2020). El estrecho vínculo que mantiene LIF con la receptividad endometrial, se observa en la disminución de sus niveles en mujeres con fallo recurrente de implantación (Wu et al., 2013; Mrozikiewicz et al., 2021). En 1992 Stewart y colaboradores generaron ratones transgénicos homocigotos para la deficiencia del gen *Lif* (modelo KO), observando la presencia de fenotipo con fallo de implantación embrionaria que ya ilustraba el papel relevante de este gen durante la implantación (Stewart et al., 1992).

La familia de moléculas de adhesión celular (CAMs de sus siglas en inglés *Cellular Adhesion Molecules*) incluye integrinas, cadherinas, selectinas, inmunoglobulinas y mucinas que median la adhesión celular durante la implantación. Sus funciones incluyen diferenciación, apoptosis, motilidad del trofoblasto, adhesión e invasión celular, expresándose tanto en el endometrio uterino como en la superficie del trofoblasto (Achache & Revel, 2006; Ochoa-Bernal & Fazleabas, 2020). La mucina 1 (MUC-1) tiene unos niveles de expresión muy altos en la superficie endometrial durante la ventana de implantación, y su función se ha relacionado con la inhibición de la adhesión celular, actuando como una guía para el blastocisto evitando que se una a determinadas zonas o escoja momentos inadecuados en los que el embrión tendría escasas posibilidades de éxito en la implantación (Achache & Revel, 2006).

También cabe destacar el papel regulador de factores genéticos como los micro ARN (miRNAs), que son liberados por las propias células del endometrio durante la fertilización, implantación y placentación, y que favorecen el diálogo entre las células maternas y el embrión (Ochoa-Bernal & Fazleabas, 2020). Son capaces de actuar a nivel postranscripcional, y modificar la expresión de una proteína inhibiendo la traducción de su ARNm o disminuyendo sus niveles. Se ha visto como la alteración en la expresión de estos miRNAs termina generando fallos de implantación (Azizi et al., 2023). Otras mutaciones como la del factor V

de Leiden, el gen *MTHFR*, o las existentes en polimorfismos de *P53*, *HLA-G*, *VEGF* y *ESR1*, también se han asociado con fallos recurrentes de implantación uterina (Mrozikiewicz et al., 2021).

El fallo de implantación embrionaria ha generado numerosas técnicas diagnósticas y terapéuticas en las clínicas de RA, que están a disposición de los pacientes para lograr combatir este problema: histeroscopia diagnóstica, biopsia endometrial, prueba de receptividad endometrial o test ERA, laparoscopia terapéutica, infusiones uterinas de hCG, plasma rico en plaquetas, hormona del crecimiento, o el raspado endometrial, entre otros (Moustafa et al., 2020).

Sin embargo, el éxito de la implantación se lleva a cabo entre dos componentes principales y la correcta comunicación entre ellos, y cuando se considera una calidad embrionaria óptima y ocurre el fallo de implantación, todos los estudios se centran en el factor endometrial, obviando otras causas intrínsecas propias del factor embrionario que puedan estar influyendo en ese fracaso gestacional.

En cuanto a la diferenciación celular que se sucede alrededor del momento de implantación, inicialmente, la unión del polo embrionario con el endometrio uterino induce la formación de las células trofoblásticas a partir del TE. Estas proliferan progresivamente y de manera invasiva dentro del estroma uterino hasta conseguir introducir gran parte del embrión en su interior, a excepción de una pequeña zona correspondiente al polo abembrionario, que es sellada por un material acelular, el “tapón de coagulación”. Las células más cercanas al embrión constituyen el citotrofoblasto (CTB), y las más alejadas dan lugar a un sincitio multinucleado que se denomina sincitiotrofoblasto (STB), y que terminará englobando la totalidad el embrión (Schoenwolf et al., 2022; Gauster et al., 2022).

Las células del estroma uterino que rodean al embrión son alargadas y de tipo fibroblástico, y sufren también una transformación conocida como decidualización, dando lugar a células redondeadas, de tipo epitelial o deciduales, que proporcionan una fuente nutritiva esencial durante el proceso de implantación (Moore et al., 2016; Okada et al., 2018)

Por otro lado, el embrioblasto, separado por una membrana basal en EPI y PrE, se denomina disco embrionario bilaminar, y durante la semana de implantación darán lugar a la formación del amnios, la cavidad amniótica, el saco vitelino, el mesodermo extraembrionario y la cavidad coriónica (Carlson, 2019; Schoenwolf et al., 2022), Parte de estos conocimientos han sido revelados gracias a los estudios de la colección *Carnegie*, así como las características relacionadas con el periodo postimplantacional que se detallan en el siguiente apartado (Hertig, 1945; Rock & Hertig, 1948; Hertig, 1956; Benirschke, 1973; Hamilton, 1972; O’Rahilly & Müller, 2010; Gasser et al., 2014).

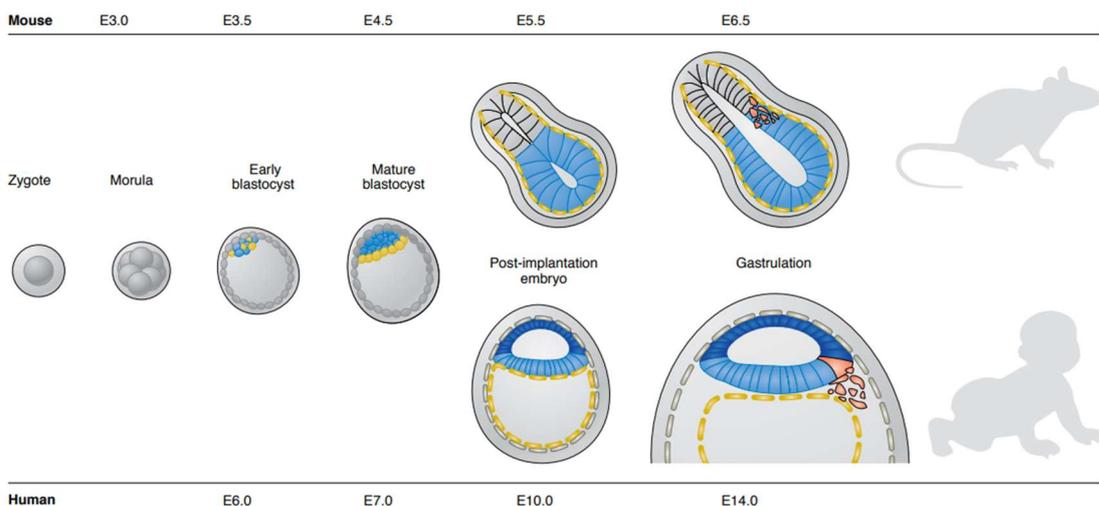
#### 2.2.4. Periodo postimplantación

Aproximadamente a los 14 días desde la fecundación se inicia la gastrulación, apareciendo la línea primitiva como primer signo de esta etapa, e iniciando la especificación de las líneas germinales primordiales (Witchi, 1948; Carlson, 2019; Schoenwolf et al., 2022). Al tratarse de una etapa cuyo estudio *in vivo* es práctica, ética y jurídicamente incuestionable, se ha convertido en un verdadero desafío para los investigadores (Wamaitha & Niakan, 2018).

El conocimiento del desarrollo estructural del embrión humano una vez terminada la implantación, se ha basado en los estudios de la colección *Carnegie* de la universidad de Cambridge. A esta colección le siguen 7 colecciones adicionales: la de Kyoto, Harvard, Blechschmidt, Madrid, Hinrichsen, Hubrech y HUDSEN, que han supuesto un amplio conocimiento anatómico e histológico de la etapa post implantación (Hertig, 1945; Rock & Hertig, 1948; Hertig, 1956; Benirschke, 1973; Hamilton & Mossman, 1972; O’Rahilly & Müller, 2010; Gasser et al., 2014).

Para completar este atlas anatómico, se han sumado posteriormente estudios transcripcionales unicelulares (Tyser et al., 2021; Xiang et al., 2020), Por ejemplo, el que realizó Tyser y colaboradores (2021) entre los días 16 y 19 tras la fecundación (correspondiendo al estadio 7 de la colección *Carnegie*) revelaba que, durante esta etapa, el embrión presenta células germinales primordiales y glóbulos rojos, pero todavía no se ha iniciado la neurulación (Tyser et al., 2021).

En cuanto a la comparación durante el proceso de gastrulación con otros modelos animales, es un poco más compleja que en estadios anteriores, ya que no existen tantas similitudes. Si se considera la especie murina, en esta ocasión además de presentar grandes diferencias en cuanto al tiempo en el que se lleva a cabo el proceso, difiere también en la organización celular y los patrones de expresión génica. La geometría de los embriones de ambas especies es claramente diferente, presentando una estructura cilíndrica en ratón frente a la forma de disco en humanos (**Figura 17**) (Ghimire et al., 2021; Fu et al., 2021).



**Figura 17.** Comparación del desarrollo embrionario en el ratón (arriba) y el ser humano (abajo) desde la preimplantación hasta el inicio de la gastrulación (Epiblasto (EPI): azul claro, Hipoblasto (EP): amarillo, Ectodermo amniótico (AM): azul oscuro, Inicio de la gastrulación en el compartimento posterior del EPI: rojo) (Fuente: Fu et al., 2021).

Con relación a los patrones génicos, la expresión de *FG2* y *FG4*, y la inexpressión de *FG8* es detectada en muestras de embriones humanos durante la gastrulación. El gen *Fg8* es indispensable en el proceso de gastrulación de ratones, mientras que *Fg2* y *Fg4* no son necesarios para su desarrollo (Sun et al., 1999). Del mismo modo *Cripto*, otro gen implicado en la gastrulación de ratón, no se identifica en humanos (Minchiotti et al, 2000) o *SNAI2*, que se expresa durante la gastrulación en humanos y no está implicado en la de ratón (Jiang et al., 1998). Sin embargo, otros genes sí que han conservado su expresión en ambas especies, como el gen *BMP* expresado en el amnios, *OTX2*, *HESX1*, o

*T/BRA*, aunque la forma en la que surgen estos patrones puede diferir entre ambas especies (Yang et al., 2020; Ghimire et al., 2021).

Aunque los modelos animales continúan siendo necesarios para validar estudios unicelulares de transcriptómica que no es posible testar en humanos, la divergencia génica entre especies es mayor conforme avanza el desarrollo del embrión hacia la organogénesis temprana (Xu et al., 2021). Modelos animales más cercanos filogenéticamente, en concreto primates no humanos u otras especies con mayores similitudes durante el proceso de gastrulación pueden resultar muy valiosos (Boroviak & Nichols, 2017; Niu et al., 2019; Ma et al., 2019; Tyser et al., 2021).

Sin embargo, para describir y finalmente comprender la verdadera dinámica del desarrollo embrionario humano, lo ideal sería poder realizar los estudios en embriones humanos (Ghimire et al., 2021). En este sentido, la embriología sintética es una herramienta que actualmente brinda una oportunidad similar a la comunidad científica. Esta tecnología también plantea ventajas en cuanto a la separación de la diferenciación, la forma y la función celular, principios que están íntimamente conectados en el modelo *in vivo* mediante diferentes vías de regulación génica y celular, pero que *in vitro* pueden disgregarse para su estudio individual (Sozen et al., 2022).

Recientemente, varios trabajos han recreado la formación del saco amniótico, gastrulación y tubo neural por separado a partir de células pluripotenciales (Shao & Fu, 2020). Durante la formación del saco amniótico se describe un mecanismo de “fusión vesicular” que ya había sido observado anteriormente en la formación del blastocelo humano y de ratón (Shahbazi et al., 2017; Ryan et al., 2019). Como ya se ha comentado, la gastrulación comienza con la formación de la línea primitiva, y culmina con la segregación de las 3 líneas germinales; los cultivos en 2D presentan un modelo muy útil para descifrar los mecanismos de diferenciación y organización de las líneas germinales, pero son necesarios futuros modelos en 3D, que caractericen con mayor fidelidad estructural las movilizaciones celulares (Shao & Fu, 2020). En cuanto al proceso de neurulación, se han desarrollado modelos de cultivo en 2D y 3D para el estudio de la formación de la placa neural a partir del neuroectodermo (Xue et

al., 2018), así como para la formación posterior del tubo neural (Ogura et al., 2018).

Entender el periodo que transcurre alrededor y durante la gastrulación no es importante únicamente para conocer los mecanismos que configuran el plan corporal del ser humano y la diferenciación con otros mamíferos, sino también para revelar las razones que conducen a la aparición de abortos tempranos tanto en embarazos normales como en tratamientos de FIV. Tan solo un 30% de los embarazos consiguen evolucionar hasta el nacimiento, y mientras el 30% de ellos se pierden en etapas cercanas a la preimplantación, otro 30% lo hacen alrededor de la gastrulación (Jarvis, 2016; Larsen, 2013).

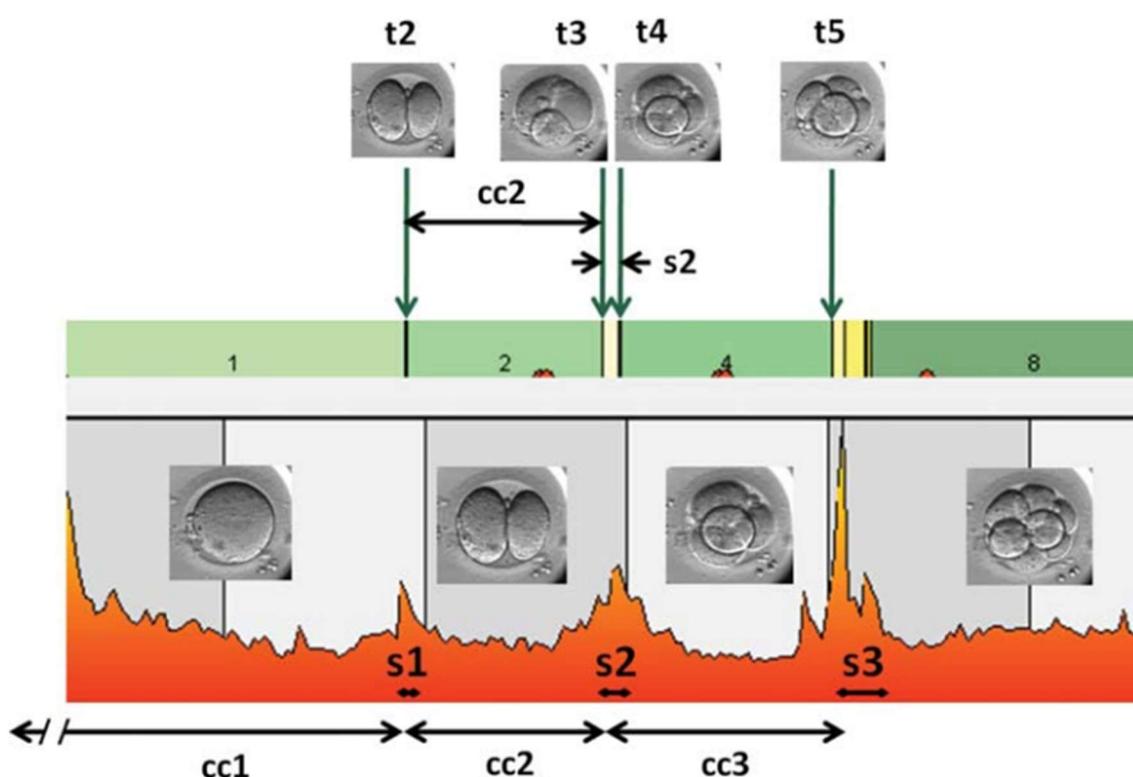
### 2.3. Técnicas de selección embrionaria

El objetivo esencial que persiguen los programas de FIV y transferencia embrionaria (FIV-ET) es el de conseguir un embarazo saludable y un recién nacido sano en casa, preferiblemente a partir de la selección y transferencia de un único embrión competente (Gardner & Balaban, 2016; Kim et al., 2022). El criterio de selección del embrión es decisivo en los resultados clínicos y en la reducción del tiempo necesario para alcanzar este objetivo. Por ello se ha convertido en otro de los grandes desafíos para la comunidad científica, que recurre constantemente a multitud de técnicas de selección embrionaria tanto invasivas como no invasivas, continuando su avance y mejora, para lograr la transferencia del embrión con mayores posibilidades de implantación, acompañado de un incremento en las tasas de recién nacido vivo (Mastenbroek et al., 2011; Montag et al., 2013; Pons et al., 2021; Dimitriadis et al., 2022; Glatstein et al., 2023).

Entre los métodos de selección no invasivos, la selección morfológica consiste en la observación microscópica puntual de los embriones, y constituye la herramienta más antigua y habitual utilizada en las clínicas de reproducción asistida (Edwards et al., 1984). Actualmente, continúa ofreciendo grandes ventajas gracias a su rapidez, bajo coste y naturaleza no invasiva. Sin embargo, la utilización como único método de selección resulta incompleta y muy limitada (Montag et al., 2011; Gardner & Balaban, 2016; Kim et al., 2022). En España, ASEBIR estableció una clasificación morfológica basada en cuatro categorías,

de la A a la D (de mayor a menor probabilidad de implantación), con el fin de homogeneizar los criterios de observación entre la comunidad científica, convirtiéndose en el método más utilizado por los profesionales de las clínicas de reproducción asistida (Martínez et al., 2021).

La llegada de tecnología *Time-lapse* (imagen en tiempo real) ha supuesto una importante mejora de las técnicas de selección no invasivas. Dicha técnica incorpora una cámara acoplada al incubador que permite la monitorización continua de parámetros morfocinéticos durante el desarrollo embrionario, facilitando al embriólogo la evaluación de la calidad embrionaria y la velocidad de las divisiones mitóticas sin necesidad de modificar las condiciones de cultivo, entre otras ventajas (Lundin & Park, 2020; Martínez et al., 2021). Los cambios durante el desarrollo embrionario son anotados junto con el momento exacto en el que se ha producido, teniendo en cuenta el tiempo (en horas) transcurrido desde la microinyección (**Figura 18**).



**Figura 18.** Representación gráfica de los cambios morfocinéticos durante el desarrollo embrionario (Fuente: Meseguer et al., 2011)

Se han definido hasta la fecha diversos parámetros morfocinéticos, creando modelos algorítmicos en función del objetivo que se buscaba: seleccionar entre una cohorte de embriones aquel con mayor capacidad de implantación, con mayor capacidad para alcanzar el estadio de blastocisto, con mayores probabilidades de ser euploide, etc (Meseguer et al., 2011; Chavez et al., 2012; Campbell et al., 2013; Herrero et al., 2013; Milewski et al., 2015; Basile et al., 2015). Entre los parámetros cinéticos más relevantes se pueden citar: t2, t3, t4 y t5, que corresponden al momento de división en 2,3,4 y 5 células respectivamente; cc2, que es la duración del segundo ciclo celular o tiempo transcurrido de 2 a 3 células o blastómeras (t3-t2); s2, que corresponden a la segunda sincronía o tiempo de sincronía de 3 a 4 células (t4-t3); y tC, tSB, tB. Que hacen referencia al tiempo de inicio de compactación, inicio de blastulación y llegada a blastocisto.

Del mismo modo, la inteligencia artificial comienza a tener un gran impacto en la práctica clínica de RA (Dimitriadis et al., 2022), incorporando la automatización de datos generados por los sistemas *time-lapse* o por otros sistemas que recopilen información sobre características del desarrollo embrionario. Con ello genera programas de valoración en los que prima la objetividad y reproducibilidad. Aunque todavía existen algunas barreras que impiden su completa expansión como método para la optimización de las TRA, sus posibilidades ofrecen un futuro muy prometedor con respecto a la selección embrionaria en RA, así como en otros aspectos de la medicina reproductiva (Curchoe, 2021).

Otras técnicas prometedoras que se han ido desarrollando en las últimas décadas son las que se conoce como *ómicas* (la genómica, la transcriptómica, la metabolómica y la proteómica), basadas en la identificación de biomarcadores relacionados con la calidad ovocitaria, espermatozoides, embriones y su capacidad para implantar y llevar a cabo su evolución (Vallejos et al., 2022). Por ejemplo, la metabolómica consiste en el análisis no invasivo de los metabolitos que expulsa el embrión al medio durante su desarrollo, y permite identificar los niveles de ciertos aminoácidos, vitaminas y lípidos cruciales para la implantación del embrión; además esta técnica proporciona información sobre el metabolismo de los embriones durante las fases tempranas del desarrollo (Motiei et al., 2020;

Eldarov et al., 2022). En general, estos métodos constituyen una herramienta adicional que, junto a los métodos tradicionales de selección embrionaria, pueden ayudar a incrementar las tasas de implantación embrionaria (Motiei et al., 2020; Eldarov et al., 2022), pero sin llegar a suplementarlos (Siristatidis et al., 2021).

Por otro lado, entre las técnicas de selección invasivas destaca el diagnóstico genético preimplantacional (PGT), prueba en el que se analiza el ADN de ovocitos o embriones para la tipificación de HLA o para determinar anomalías genéticas incluyendo aneuploidías (PGT-A), defectos monogénicos (PGT-M) o reordenamientos estructurales cromosómicos (PGT-SR) (Zegers-Hochschild et al., 2017). Su evolución ha ido acompañada de otros avances tecnológicos que han supuesto un papel clave en el éxito de la técnica, tales como la inyección intracitoplasmática (ICSI en inglés *Intracytoplasmic Sperm Injection*), la mejora de las técnicas de cultivo, o la vitrificación embrionaria. Del mismo modo, con la mejora de las técnicas de citogenética y genética molecular se ha contribuido al perfeccionamiento del análisis de ADN a partir de las células embrionarias biopsiadas (Parikh et al., 2018).

Los beneficios que ofrece el PGT-M y PGT-SR han sido bien aceptados entre la comunidad científica (Wilkins-Haug et al., 2022). Sin embargo, el uso de PGT-A ha fomentado mayor controversia, continuando los debates con relación a su aspecto tecnológico, económico, ético y moral (Tiitinen, 2019; Gleicher et al., 2021; Vallejos et al., 2021; Yang et al., 2022).

Las aneuploidías representan aquellas alteraciones genéticas debidas a un número anormal de cromosomas en la célula (Zegers-Hochschild et al., 2017), y ha resultado ser un problema frecuente en embriones humanos (Franasiak et al., 2014; Capalbo et al., 2016). Están descritas como causa principal de infertilidad con incidencias que oscilan entre el 20% y el 100% de los casos de TRA, sobre todo en mujeres de edad avanzada (Hassold & Hunt, 2009; Rubio et al., 2019; Greco et al., 2020; Navarro-Sánchez et al., 2022) y es que, aunque en ocasiones los embriones aneuploides no son compatibles con la vida y no llegan a evolucionar a un recién nacido vivo, también pueden resultar en embarazos viables y terminar con el nacimiento de un niño enfermo (Navarro-Sánchez et al.,

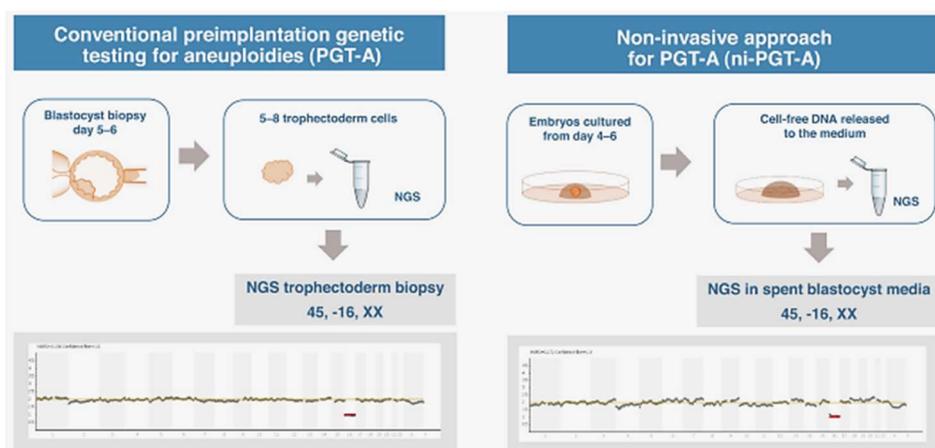
2022). Por ello, la evaluación del factor genético se ha convertido en una herramienta complementaria a la ICSI como opción preventiva de esta situación (Carvalho et al., 2020; Tiegs et al., 2021), y su aplicación ha crecido significativamente en las últimas décadas (De Rycke et al., 2017), ya no solo en los casos recomendados por sociedades científicas como la ESHRE (Carvalho et al., 2020): edad materna avanzada ( $\geq 38$  años), fallos repetidos de implantación ( $\geq 3$  fallos previos), abortos recurrentes ( $> 2$  abortos previos) (Werlin et al., 2003) o factor espermático severo (Munne et al., 2007; Franasiak et al., 2014; Rodrigo, 2020; Yang et al., 2022), sino también como práctica habitual para aumentar las tasas de implantación de los pacientes sometidos a ICSI (Brezina & Kutteh, 2015; Sciorio et al., 2020; Yang et al., 2022).

En España, los registros de la SEF indican una clara tendencia *in crescendo* de ciclos de PGT iniciados en los últimos años, alcanzando un 10,3% del total de casos de ICSI en el 2020, en comparación al 4,7% registrado 10 años antes; y entre las indicaciones de la técnica, el 59,6% de los casos correspondía a edad materna avanzada (SEF, 2010; SEF, 2020). La técnica de PGT conlleva la realización de una biopsia de células embrionarias y posterior análisis genético antes de ser transferidos al útero materno, lo que hace posible la selección de aquellos embriones libres de carga genética asociada a determinadas enfermedades (Carvalho et al., 2020; SSPA, 2022). Actualmente, el protocolo más utilizado para el PGT-A es la biopsia en día 5 de desarrollo, aspirando de 5 a 10 células del TE, seguida de un análisis genético mediante secuenciación masiva (NGS, *Next Generation Sequencing* en inglés), que permite determinar la euploidía, aneuploidía y la cuantificación del mosaicismo embrionario (Cimadomo et al., 2016; Friedenthal et al., 2018; Sciorio et al., 2020; Chen et al., 2020). La técnica supone la vitrificación del embrión antes de su transferencia, con el fin de disponer del tiempo suficiente para analizar los resultados (Greco et al., 2020).

En cuanto al análisis molecular que ofrece la tecnología de NGS, ha supuesto grandes ventajas en los laboratorios médicos en general. Dicha tecnología permite generar de forma masiva millones de fragmentos de ADN o ARN en un único proceso de secuenciación y un corto periodo de tiempo, lo que supone una mejora del rendimiento a un menor coste que muchas de las técnicas

tradicionales utilizadas con anterioridad (secuenciación de Sanger). Además, presenta mayor sensibilidad y precisión a la hora de detectar variantes de baja frecuencia, y responde de manera eficaz ante grandes volúmenes de muestra (Zhong et al., 2021). Dentro de sus aplicaciones encontramos la secuenciación de todas las regiones codificantes del genoma o exoma completo (WES, *whole-exome sequencing* en inglés), del genoma completo (WGS, *whole-genome sequencing* en inglés), el transcriptoma o regiones que se están transcribiendo activamente en un determinado momento (RNA-seq), o bien la elaboración de paneles de genes y patrones genómicos de metilación concretos, ofreciendo en su conjunto una amplia gama de estrategias para identificar mutaciones (Metzker, 2010; Zhong et al., 2021).

Por último, cabe nombrar la detección y análisis del ADN libre en el medio de cultivo del embrión, también conocido como PGT-A no invasivo (niPGT-A). Esta técnica pretende identificar la dotación cromosómica de los embriones a partir del ADN libre en el medio de cultivo. Podría convertirse en un biomarcador de gran valor, pero, aunque los resultados son muy esperanzadores (Chen et al., 2021), todavía necesita algunas mejoras y aclarar algunas controversias en cuanto al origen del ADN. por lo que, actualmente no es capaz de sustituir el PGT-A invasivo. Sin embargo, supone un importante avance a la hora de considerar un método no invasivo que pueda sustituir a la biopsia de TE para realizar el PGT-A (**Figura 19**) (Rubio et al., 2019; Rubio et al., 2020; Tomic et al., 2022; Kim et al., 2022; García-Pascual et al., 2023).



**Figura 19.** Comparación de análisis de aneuploidías realizado en blastocisto a partir de células de trofoectodermo biopsiadas (izquierda) y ADN libre en el medio de cultivo (derecha). (Fuente: Rubio et al, 2020).

#### 2.4. Relevancia de genes relacionados con el fallo de implantación y el desarrollo embrionario temprano

En España, el número de clínicas de RA que realiza estudios genéticos en el embrión previamente a la transferencia embrionaria, en concreto PGT-A, es cada vez mayor. Sin embargo, la tasa de gestación por transferencia en el mejor de los casos presenta valores que apenas supera el 50% (**Tabla 3**) (SEF, 2020).

**Tabla 3.** Tasas de embarazos y partos después de realizar PGT según los registros de la SEF, 2020 (SEF, 2020)

PGT: Tasas de embarazos			
	Embriones en fresco	Embriones congelados	TOTAL
% gestaciones por ciclos iniciados	0,6%	-	-
% gestaciones por punciones	0,7%	-	-
% gestaciones por descongelaciones	-	48,2%	-
% gestaciones por transferencias	42,5%	51,3%	51,1%

Teniendo en cuenta estos resultados, ¿Hay otros aspectos ligados al embrión y desapercibidos por los métodos de PGT-A que se están obviando?

Utilizando modelos animales transgénicos, sobre todo de ratón, se han publicado numerosos estudios que analizan el papel de determinadas proteínas intrínsecas del ovocito o del embrión en la búsqueda de marcadores moleculares que determinen la calidad ovocitaria y/o embrionaria (Sang et al., 2021). Para ello, se inactivan los genes codificantes de las proteínas objetivo de estudio (modelos KO) y se analizan las consecuencias fenotípicas en la población.

La expresión del gen *TUBB8* está presente en ovocitos y en la etapa temprana del desarrollo embrionario de humanos. Diferentes mutaciones localizadas en este gen han demostrado ser la causa de arresto completo del ovocito maduro o posterior deterioro tras la fecundación. Teniendo en cuenta que en la clínica de RA se realiza la selección de ovocitos metafase II mediante microscopio, sin tener en cuenta su dotación genética, la determinación de las mutaciones presentes en el gen *TUBB8* podría ser un criterio adicional a tener en cuenta para la selección del ovocito previo a su inyección intracitoplasmática (Feng et al., 2016).

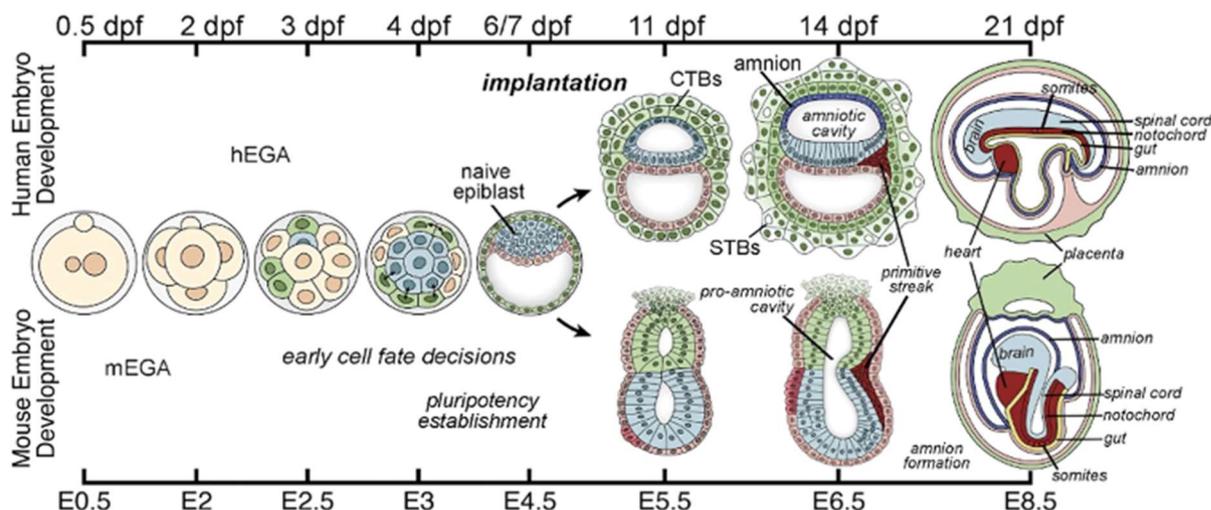
Hasta la fecha, son varios los genes que han sido descritos como causantes de arresto ovocitario, fallo de fecundación, arresto embrionario y muerte preimplantacional en humanos (**Figura 20**) (Sang et al., 2021).



**Figura 20.** Factores genéticos responsables de alteraciones en el ovocito y desarrollo embrionario descubiertos recientemente (Fuente: Sang et al., 2021).

El SNPs del gen *P53* localizado en el codón 72 (*p53 P72*) ha resultado tener un importante impacto sobre la fertilidad humana (Kang et al., 2009). En ratones, el gen *p53* regula la implantación del blastocisto mediante el efecto que causa sobre *Lif* (Hu et al., 2007), estudio que sirvió para demostrar la asociación del polimorfismo de *P53* con la regulación de la fertilidad en humanos. Sin embargo, su efecto en humanos únicamente se observa en mujeres de edad inferior a 35 años, y según los últimos datos de la SEF, las indicaciones para las técnicas de PGT corresponden en un 59,6% a mujeres con edad avanzada, por lo que este marcador genético no sería de gran utilidad para este grupo de pacientes (SEF, 2020).

En cuanto a la etapa postimplantacional, aparecen en la bibliografía numerosos ejemplos de modelos KO de ratón para genes que producen fallo de implantación y muerte embrionaria temprana. Aunque, como se ha visto anteriormente ambas especies aumentan sus diferencias conforme avanza el proceso de gastrulación (**Figura 21**), durante la etapa de implantación y desarrollo embrionario temprano, SNPs de estos genes en humanos podrían ser susceptibles de estudio con el objetivo de encontrar marcadores genéticos que puedan indicar estas condiciones en humanos. A continuación, se mencionan algunos de ellos.



**Figura 21.** Comparación del desarrollo embrionario en el ser humano (arriba) y el ratón (abajo) hasta el final de la gastrulación. h/m EGA: Activación del genoma embrionario humano/ratón; dpf: días tras la fecundación; E: día de desarrollo embrionario; CTBs: citotrofoblasto; STBs: sincitiotrofoblasto (Fuente: Sozen et al., 2022).

El gen *Kap1* juega un papel importante en el desarrollo postimplantacional temprano. Los mutantes homocigotos no consiguen progresar más allá del día E5.5, siendo incapaces de sobrellevar el proceso de gastrulación (Cammass et al., 2000).

El gen *Grp94* codifica una chaperona del retículo endoplasmático que ha demostrado desempeñar funciones esenciales durante el desarrollo embrionario. El modelo KO embrionario provoca la muerte en el día 7 de gestación, momento en el que se produce la diferenciación del mesodermo. Las células pluripotenciales cultivadas *grp94*<sup>-/-</sup> no son capaces de formar tejido muscular (**Figura 21**) (Wanderling et al., 2007).

El gen *Rae1*, codifica para la proteína RAE1, transportador de ARNm (Brown et al., 1995; Kraemer & Blobel, 1997; Nakano et al., 2011). Otra función asignada es la de prevenir la formación de aneuploidías asegurando la correcta disgregación cromosómica (Jeganathan et al., 2005; Ren et al., 2010) o la formación del huso mitótico (Blower et al., 2005; Wong et al., 2006; Ren et al., 2010). La similitud que guarda con el gen *Bub3* y los estudios realizados con ambos genes, han puesto de manifiesto su actividad reguladora sobre los puntos de control de la mitosis (Babu et al., 2003; Reddy et al., 2008). En el modelo KO

de ratón, el embrión no supera el día E8.5 de desarrollo. La MCI no consigue expandirse entre E6.5 y E8.5, y se degenera, pero mantiene las células del trofoblasto intactas hasta E8.5. Con respecto a los heterocigotos, aunque son viables, se observa un incremento de la disgregación anormal de los cromosomas desencadenando un aumento en el número de aneuploidías (Babu et al., 2003).

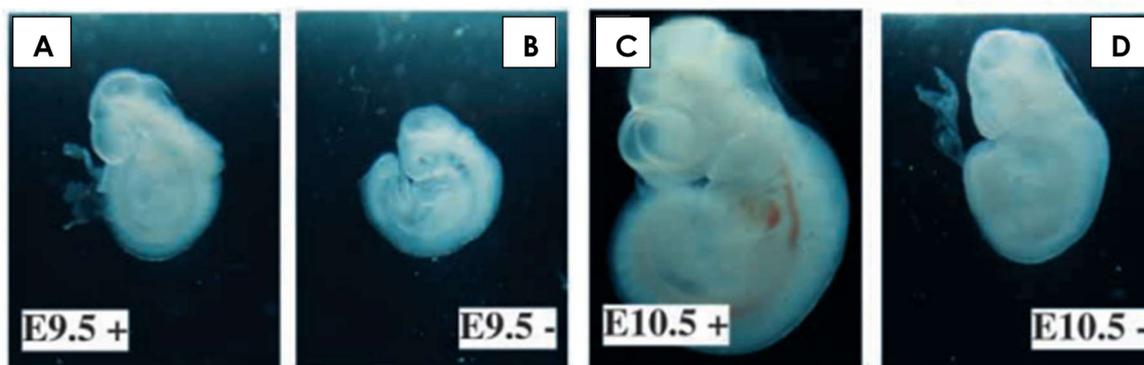
El gen *Gdf3* codifica para la proteína factor de crecimiento y diferenciación 3 que ejerce su función activando vías de señalización que estimulan o inhiben la proliferación y diferenciación celular, el establecimiento de los patrones celulares, o el mantenimiento de la pluripotencialidad celular (Shen, 2007; Sherbet, 2011; Morikawa et al., 2016; Miller & Hill, 2016). El modelo KO de ratón produce letalidad incompleta durante una etapa embrionaria temprana, detectando la expresión del gen *Gdf3* en las células pluripotentes de la MCI y el EPI. Cerca del 35% de los ratones presentan fenotipo alterado entre E6.0 y E8.5, de ellos un 5% se reabsorben, un 11% presenta saco visceral vacío en E8.5, y otros, menos afectados (21%), incluyen alteraciones del endodermo visceral anterior, mesodermo o tubo neural (Chen et al., 2006). Andersson y colaboradores demostraron que este gen necesitaba la presencia de otros ligandos de función similar para activar las vías de señalización, como el *Gdf1*, dato que concordaba con la falta de penetrancia observada por Chen (Andersson et al., 2008; Ye et al., 2010). En la especie humana, mediante RNAseq en células embrionarias durante la preimplantación, se ha detectado la expresión de este gen en células del EPI (Blakeley et al., 2015).

El gen *Nr5a2* codifica para la proteína del mismo nombre, moléculas reguladoras que funcionan como factores de transcripción. *Nr5a2* está implicado en multitud de procesos biológicos, entre ellos el transporte del colesterol, la pluripotencialidad de células madre, esteroidogénesis, desarrollo y diferenciación del embrión, y la homeostasis en el humano adulto (Sandhu et al., 2021). En el ratón, su expresión se establecía en etapas tempranas del desarrollo embrionario, durante el periodo de preimplantación (Labelle-Dumais et al., 2006), aunque recientemente se ha detectado el inicio de su actividad a partir del estadio de 8 células, coordinando la proliferación, estabilidad genómica y especificación de las líneas celulares durante el desarrollo de la mórula

(Festuccia et al., 2023). Después de la implantación se detectan transcritos de *Nr5a2* en el endodermo visceral y tejidos extraembrionarios, y el modelo KO muere durante la etapa de gastrulación E6.5-7.5 (Labelle-Dumais et al., 2006; Sandhu et al., 2021).

El gen *F2* codifica para la proteína protrombina (factor II de la coagulación), con un papel fundamental en múltiples funciones celulares, entre ellas la proliferación celular, reparación tisular, angiogénesis y mantenimiento de la integridad vascular durante el desarrollo y periodo postnatal (Martineau et al., 2004). La expresión de este gen y los receptores involucrados en sus funciones han sido detectados en fases de organogénesis en ratón, lo que sugiere su involucración en estos procesos. Para aclarar este aspecto, varios autores crearon modelos KO del gen de la protrombina, obteniendo una pérdida de la integridad vascular con muerte embrionaria alrededor del día 10 de gestación en parte de la camada (Sun et al., 1998; Xue et al., 1998).

El gen *Hsp90 $\beta$*  codifica una chaperona localizada en el citosol de la célula. El modelo heterocigoto mutante de ratón es fenotípicamente normal, sin embargo, el homocigoto evoluciona de forma normal hasta el día 9-9.5, momento en el que comienzan a desarrollar alteraciones a nivel de la placenta, provocando su muerte poco después (**Figura 22**) (Voss et al., 2000).



**Figura 22.** Morfología del embrión wild-type en E9.5 y 10.5 (A y C) comparado con el homocigoto mutante de *Hsp90 $\beta$*  en E9.5 y E10.5 (B y D) (Fuente: Voss et al., 2000)

El gen *Trim59* tiene un papel relevante en la gastrulación, y ratones mutados en este gen forman blastocistos fenotípicamente normales, pero no son capaces de desarrollarse posteriormente. Los ratones *Trim59*  $-/-$  no son viables

tras E9.5, afectando a la formación de las líneas germinales primordiales (Su et al., 2018).

El gen *Abca1* codifica para la proteína del mismo nombre cuya superfamilia es conocida como las proteínas dependientes de ATP o transportadores ABC, que participan en los mecanismos de transporte activo de diversas sustancias químicas como proteínas, lípidos, iones y azúcares a través de las membranas biológicas. La proteína ABCA1 participa en la exportación celular del colesterol y los fosfolípidos para formar las lipoproteínas de alta densidad (HDL). Se expresa en multitud de tejidos en la especie humana, aunque es especialmente aparente en los macrófagos (Santamarina-Fojo et al., 2000). La proteína ABCA1 de humano y ratón comparten el 94% de su secuencia (Santamarina-Fojo et al., 2000), existiendo también similitud en la organización del gen en ambas especies (Remaley et al., 1999). Diferentes laboratorios han estudiado modelos KO de este gen en ratones, obteniendo, en función de la línea genética estudiada, distintos fenotipos con alteraciones en la acumulación de lípidos. Todos ellos tienen en común una disminución significativa de los niveles de HDL (Christiansen-Weber et al., 2000; Hamon et al., 2000; McNeish et al., 2000; Aiello et al., 2003). En el trabajo realizado por el grupo de Weber *et al.* se observó un porcentaje significativo con malformaciones en la placenta, retraso en el crecimiento uterino y muerte fetal con reabsorción en el día 14 de gestación. En las hembras *-/-* que sobrevivían, un 55% no conseguía gestar después de la copulación (Christiansen-Weber et al., 2000). El bajo porcentaje de recién nacidos homocigotos en el estudio de McNeish también sugería una muerte perinatal (McNeish et al., 2000).

El estudio de este tipo de genes a la hora de seleccionar el embrión con mejor pronóstico para transferir podría ser relevante, por lo que, continuando esa línea de investigación, se elaboró un proyecto de búsqueda de genes candidatos para identificar posibles variantes polimórficas deletéreas en embriones que habían sido transferidos.

### 3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Este proyecto parte de la hipótesis de que la presencia de determinados SNPs en el ADN influyen en el correcto desarrollo y evolución del embrión durante el periodo periimplantacional.

El reto planteado supone la identificación de marcadores genéticos que determinen un efecto deletéreo sobre estos procesos. Estos biomarcadores podrían ser integrados como una herramienta de selección embrionaria en las clínicas de reproducción humana, con el único fin de seleccionar al mejor candidato e incrementar las tasas de implantación, disminuyendo también el tiempo necesario para alcanzar el embarazo exitoso.

Por otro lado, con los datos obtenidos, e incluyendo datos morfológicos, clínicos y cinéticos, se integraría la aplicación de la IA para diseñar un modelo capaz de predecir la evolución de los embriones hacia embarazo o no embarazo.

#### 3.1. Objetivo principal

Evaluar de forma multifactorial los mecanismos involucrados en el fallo embrionario durante el periodo periimplantacional

#### 3.2. Objetivos específicos

Diseñar un panel genético que esté relacionado con el desarrollo embrionario tras la etapa de blastocisto.

Identificar polimorfismos genéticos y su relación con el desarrollo embrionario temprano.

Elaborar una estrategia de IA para predecir el éxito reproductivo de embriones euploides, teniendo en cuenta parámetros morfológicos, clínicos, cinéticos y genéticos.

## 4. MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.1. Comité ético

Los procedimientos realizados en el presente trabajo se llevaron a cabo bajo la supervisión y aprobación de la Comisión de Ética de Investigación (CEI) y el Comité de Bioseguridad en Experimentación (CBE) de la Universidad de Murcia.

- CEI: 2147/2018
- CBE: 165/2018

### 4.2. Selección de genes

Para la selección de los genes potencialmente interesantes para el proyecto se realizó un análisis *in silico* (simulación informática de un proceso biológico) de genes con implicación en el desarrollo embrionario temprano e implantación en la especie murina, priorizando aquellos que tuviesen origen embrionario.

Se inició una búsqueda bibliográfica exhaustiva en revistas científicas de interés con la ayuda de la herramienta PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>), centrada en experimentos realizados con modelos de ratones KO y *knock down* (KD) para genes esenciales en esos procesos.

Del mismo modo, con la base de datos “Mouse Genome Database” (<https://www.informatics.jax.org/>), se incluyeron aquellos genes con el fenotipo del modelo animal de ratón KO correspondiente a “letalidad embrionaria previa organogénesis”, que engloba la muerte embrionaria que ocurre antes, durante y después de la implantación.

Después, se realizó un filtrado en función de la frecuencia alélica en la población, estableciendo un límite del 5%, con la ayuda de la herramienta gnomAD (<https://gnomad.broadinstitute.org/>), seleccionando todos aquellos genes que presentaban mutaciones o polimorfismos deletéreos con mayor frecuencia alélica en la población y con ausencia de homocigotos. En dicha base de datos también se consideró la información que proporciona sobre la haploinsuficiencia de cada gen mediante los valores de pLI (del inglés *probability*

*of being loss-of-function intolerant*). Aquellos genes con un valor de pLI próximo a 1 son más intolerantes a perder una copia del gen, por lo que se consideran haploinsuficientes todos aquellos genes con un valor de  $pLI \geq 0,9$  (Lek et al., 2016).

#### 4.3. Población de estudio

La población de estudio estaba formada por pacientes de la clínica de reproducción asistida Next Fertility Murcia, sometidos a un tratamiento de reproducción asistida que consistía en una ICSI con PGT-A.

Se incluyeron tratamientos realizados con gametos propios y con gametos donados, tanto femenino (tratamiento de ovodonación), como masculino (tratamiento con semen de donante).

Los pacientes fueron informados previamente sobre el proyecto que se estaba llevando a cabo, y se les solicitó la firma expresa de un consentimiento informado para hacer uso de los resultados de su tratamiento clínico, así como para permitirnos el análisis del material genético de sus embriones analizados para PGT-A, o del suyo propio, mediante la obtención de ADN a partir de hisopos bucales en caso de que fuera necesario.

A la hora de reclutar los embriones que participarían en el estudio, se incluyeron todos aquellos embriones euploides transferidos durante el estudio prospectivo comprendido entre el año 2017 y 2020, incluyendo algunos embriones con carácter retrospectivo de ciclos de PGT-A que pertenecían a los mismos pacientes que estaban participando en ese momento en el proyecto, ya que se consideró interesante tenerlos en cuenta a la hora de comparar los resultados clínicos entre embriones hermanos. Se descartaron todos aquellos embriones mosaicos de los pacientes reclutados que habían sido transferidos.

Se excluyeron todos aquellos casos en los que se realizaba la transferencia de dos embriones (en inglés *Double Embryo Transfer*, DET) y en los que solamente implantó un embrión, ya que no era posible identificar cual había implantado, pero se incluyeron aquellos casos en los que se realizaba transferencia de dos embriones e implantaban los dos o no implantaba ninguno.

Finalmente se seleccionaron 84 parejas y 134 embriones, cuyos detalles se revelan en el apartado de resultados 5.1. (**Tabla 9**).

#### 4.4. Tratamiento de Reproducción Asistida

Este procedimiento se ha llevado a cabo en diferentes centros: los tratamientos de ICSI y la biopsia embrionaria se realizaron en Next Fertility Murcia; y las células de TE se procesaron y analizaron en el centro de genética clínica DiNA Science de Madrid (<https://dinascience.com/es/>).

Para los protocolos y procedimientos de las TRA realizados en la clínica Next Fertility Murcia se han seguido las indicaciones y recomendaciones del Manual Práctico de Esterilidad y Reproducción Humana del Dr. Remohí y colaboradores, adaptado a la dinámica de trabajo de la clínica (Remohí et al., 2018). A continuación, se detallan algunos aspectos más relevantes de todo el procedimiento de forma cronológica.

##### 4.4.1. Estimulación ovárica controlada

El primer paso para comenzar un tratamiento de fecundación *in vitro* es la estimulación del ovario y su desarrollo folicular múltiple, para ello se utilizan gonadotrofinas que inducen el desarrollo folicular, y análogos de la GnRH para conseguir la supresión hipofisaria de la paciente y evitar una ovulación espontánea prematura.

Existen diferentes protocolos en función del momento y tipo de análogo utilizado. En los pacientes del estudio se ha utilizado el protocolo corto con antagonista de la GnRH.

De forma resumida, desde el inicio de la regla, se pauta la administración de gonadotrofinas, ajustando la dosis en función de la edad, peso y reserva ovárica de la paciente. Entre las gonadotropinas empleadas se incluyen FSH recombinante (Puregon, Organon y Gonal F, Merck, Alemania), gonadotropina menopáusica humana (Menopur, Ferring, Suiza) y coriofolitropina alfa (Elonva, Organon, España).

En función de la respuesta de la paciente, la estimulación tuvo una duración aproximada de 7-12 días.

El crecimiento folicular se controlaba mediante ecografías seriadas, y cuando los folículos alcanzaban un tamaño aproximado de 14 mm, o bien en el sexto día de medicación, se introducía el antagonista de la GnRH (Orgalutran, Organon, España) para evitar el pico ovulatorio espontáneo de la paciente.

Cuando el folículo dominante tenía un diámetro mayor de 18 mm, se inducía la maduración ovocitaria mediante la administración de otro análogo de la GnRH, en este caso un agonista: Leuprorelina (Procrin, Abbott, EE-UU.) o Triptorelina (Decapeptyl, Ipsen, Francia), y se programaba la punción folicular 36 horas después.

Durante la estimulación ovárica se realizaron también controles de estradiol y progesterona séricos, y se valoraba el crecimiento y grosor endometrial.

#### 4.4.2. Punción folicular y captación de ovocitos

Esta técnica se realiza llevando a cabo un procedimiento quirúrgico de unos 20 minutos de duración, bajo condiciones de sedación de la paciente y mediante ecografía transvaginal. El equipo médico procede a la aspiración de los folículos con una aguja acoplada a la sonda ecográfica y a un sistema de vacío, recogiendo el líquido folicular en tubos Falcon de fondo redondeado (tubos de colección de ovocitos 14 ml, ref: 16101, Vitrolife, Suecia) atemperados a 37°C. Estos tubos son trasladados de forma inmediata al laboratorio de FIV, donde el equipo de embriólogos continúa con el proceso.

#### 4.4.3. Identificación, aislamiento y desnudación de ovocitos.

Una vez trasladados los tubos con líquido folicular aspirado al laboratorio de FIV, son vertidos en placas de Petri (Nunc de 9 cm de diámetro, ref: 150360, ThermoFisher Scientific, EE. UU.) para localizar por inspección directa con el estereomicroscopio (Nikon, SMZ 800-1000, Japón) y bajo la cabina de flujo laminar con superficie calefactada (K-Systems, Dinamarca) los ovocitos recogidos en la punción. Los CCO son relativamente fáciles de identificar gracias a su aspecto refringente. Con la ayuda de una pipeta Pasteur (estériles y embriotestadas, Humagen, U.S.A.) llena de medio de lavado y acoplada a un chupete, son captados y lavados en un medio tamponado (G-MOPS PLUS, Vitrolife, Suecia), retirándose con jeringas de insulina parte de las células de la

granulosa y sobre todo restos de sangre para, a continuación, depositarlos en medio de cultivo de gametos (G-IVF PLUS, Vitrolife, Suecia), donde permanecerán en la incubadora, a 37°C y 6% de CO<sub>2</sub>, unas 2 horas hasta que se decumulen.

Los CCO son clasificados morfológicamente en 3 grados en función del grado de expansión del cúmulo y la corona que lo rodea (Veeck, 1988); aunque no será hasta después de la decumulación, cuando se verifique el estado de madurez de los ovocitos, y se identifiquen las alteraciones morfológicas citoplasmáticas:

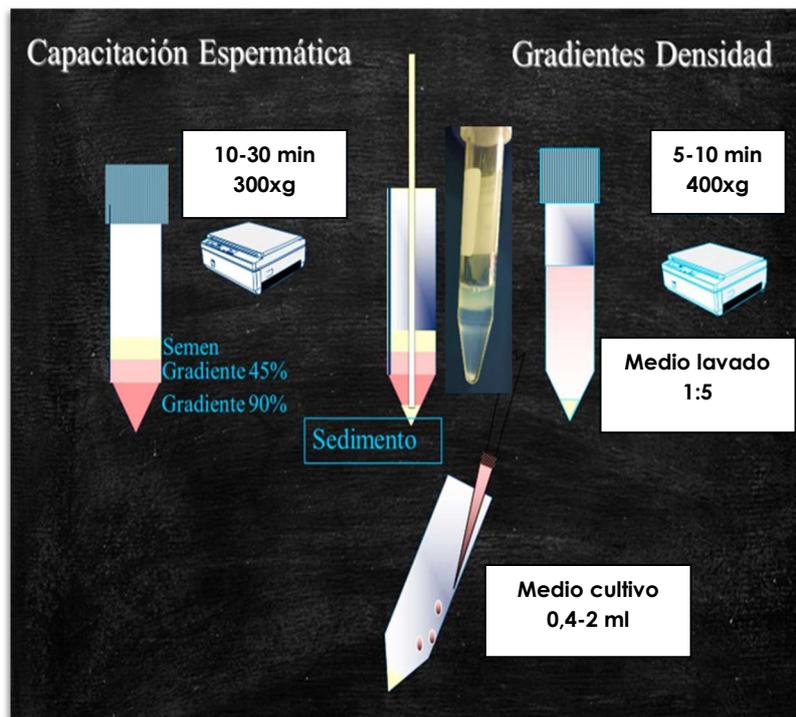
- Grado 1: Las células del cúmulo están expandidas y luteinizadas. Corresponden generalmente a ovocitos maduros, de metafase II (MII), que se verifica posteriormente con la visualización del primer corpúsculo polar.
- Grado 2: Las células del cúmulo están menos expandidas. Corresponden generalmente a ovocitos de metafase I (MI), aunque algunos corresponden a ovocitos MII.
- Grado 3: Las células del cúmulo están compactadas. Suelen corresponder con vesículas germinales.

La decumulación tiene dos fases: enzimática y mecánica. En la fase enzimática los CCO se depositan con una pipeta Pasteur en una placa de Nunc de 6 cm de diámetro (Nunc, ref: 150270) con 75 UI de enzima hialuronidasa (HYASE, Vitrolife, Suecia), para a continuación, utilizando pipetas de diferente diámetro decreciente desde 300 µm a 130 µm (Stripper *Midatlantic* con puntas de 300 µm y pipetas *Swemed* de 134-145 µm y 130-133 µm de diámetro), realizar la fase mecánica con el fin de eliminar las células de la granulosa que rodean al ovocito por aspiraciones repetidas. Una vez realizado este proceso se evalúa el grado de madurez nuclear del ovocito para diferenciar ovocitos de metafase I, metafase II o vesículas germinales, y seleccionar los maduros o metafase II que se depositarán en una placa de medio de gametos (G-IVF PLUS, Vitrolife, Suecia) para mantenerse bajo condiciones controladas de temperatura y CO<sub>2</sub> en el incubador hasta el momento de la microinyección.

#### 4.4.4. Procesado del eyaculado

El paciente debe recoger y entregar la muestra seminal al laboratorio mediante masturbación y bajo condiciones higiénicas, siguiendo las recomendaciones de abstinencia de 2 a 5 días que marca la OMS para la extracción de semen (Björndahl & Brown, 2022).

Tras dejar la muestra licuar se procederá a su capacitación que se realiza con la técnica de centrifugación de gradientes de densidad utilizando el medio *Isolate Sperm Separation Medium* (Irvine Scientific, Fujifilm, EE. UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se deposita un volumen de 0,5 a 2 ml (dependerá de la cantidad y calidad de la muestra inicial) del gradiente de mayor densidad (90%) en primer lugar quedando al fondo del tubo cónico (tubo de centrifugación 15 ml, ref: 16105, Vitrolife, Suecia), y cuidadosamente se añade sobre este el mismo volumen del gradiente de menor densidad (45%) previamente atemperados; por último, se añade encima el mismo volumen de muestra de semen y se centrifuga a 300xg (Centrifuga Heraeus Labofuge 400) durante 10-30 minutos a temperatura ambiente. Con ello se consigue incrementar la calidad de la muestra seleccionando aquellos espermatozoides con mejor movilidad y morfología, que serán los que se localicen en el fondo del tubo tras la centrifugación, ya que tienen la capacidad de avanzar entre los dos medios de diferente densidad y a su vez el proceso facilita la eliminación del plasma seminal y los espermatozoides inmóviles o con movilidad no progresiva, las células inmaduras y los detritos. Tras la aspiración y recuperación del pellet con una pipeta Pasteur estéril (Hunter Scientific, Reino Unido, ref: PPS230-100) o una pipeta automática se deposita la muestra en otro tubo cónico y se realiza un lavado (G-MOPS PLUS, Vitrolife, Suecia) de 5-10 minutos a 400xg y temperatura ambiente añadiendo una proporción más o menos de 1:5. Finalmente se elimina el sobrenadante y se añade cuidadosamente y resbalando por la pared del tubo entre 0,4 y 2 ml de medio de cultivo G-MOPS PLUS al sedimento para mantenerlo hasta la aplicación de la siguiente técnica (**Figura 23**).



**Figura 23.** Representación esquemática de capacitación espermática mediante centrifugación con gradientes de densidad (Imagen cedida por Next Fertility Clinic)

Si la muestra pertenece a semen de donante (procedente del banco de semen con el que trabaja la clínica: CEIFER <https://www.ceifer.com/> o BOKIBANK <https://biokibank.com/>) o semen del propio paciente criopreservado, se lleva a cabo su descongelación y procesamiento 2 horas antes de la hora programada para la inseminación. Para ello se coloca un bote para recogida de muestras de orina/semen (Deltalab, España, ref: 409726) con agua en la estufa a 37 °C; la pajuela, píldoras o criotubo se introducen en un tubo cónico, y se meten en el bote con agua durante 15 minutos. Transcurrido ese tiempo, y si se observan espermatozoides móviles en la muestra, se lava la muestra con medio G-MOPS PLUS centrifugándola 5-10 min a 400 xg, se elimina el sobrenadante y se resuspende el pellet con 0,3-0,5 ml de G MOPS PLUS para entonces tratarla como si fuese una muestra en fresco. En el caso de las muestras procedentes de un banco de semen, se siguen las indicaciones de descongelación del proveedor.

Además de la preparación de las muestras seminales mediante gradientes de densidad, en los pacientes que se van a someter a un ciclo de PGT se añade un proceso de separación espermática con columnas de anexina (en inglés *Magnetic Activated Cell Sorting, MACS*), utilizando MACS® ART Annexin V

Reagent y MACS ART MS Column (Miltenyi Biotec, Alemania) bajo las indicaciones del fabricante. Este método es capaz de eliminar espermatozoides apoptóticos gracias al reconocimiento de la fosfatidilserina en su superficie, propiedad que caracteriza a estos espermatozoides. La fosfatidilserina es capaz de unirse a la anexina V, que viene acoplada a pequeñas esferas metálicas. Tras un proceso de incubación, la solución se vierte sobre una columna en un campo magnético en el que quedan atrapados los espermatozoides que se hayan unido a las microesferas, permitiendo recoger únicamente los espermatozoides presentes en el medio y libres de apoptosis (Pacheco et al., 2020).

Los espermatozoides, sumergidos en el medio tamponado propio de la técnica, son trasladados al laboratorio FIV donde se mantienen a temperatura ambiente a la espera de que se realice la microinyección.

#### 4.4.5. Microinyección espermática (ICSI)

La técnica elegida, generalmente, para realizar la fecundación de los ovocitos en los casos de PGT es la microinyección espermática, ya que minimiza las posibilidades de contaminación de la muestra con células de la granulosa o espermatozoides unidos a la zona pelúcida mientras se realiza la biopsia del embrión. Esto suele ocurrir cuando se utiliza la FIV convencional (Palmerola et al., 2019).

Esta técnica consiste en la introducción de un espermatozoide en el interior del citoplasma de un ovocito, y para ello se utiliza un equipo formado por un sistema de mandos inyectoros (Eppendorf, Alemania y Narishige, Japón) acoplados a pipetas de sujeción (Holding Pipette, ref: MPH-SM-30, CooperSurgical, EE. UU.) e inyección (ICSI Pipette, ref: MIC-SLM-30-B1.0, CooperSurgical, EE. UU.), dirigidos con un mando (Narishige, Japón), montados sobre un microscopio invertido con óptica de Hofmann (Nikon, TE-2000S, Japón) y placa térmica (Tokai, Japón).

Se captan los espermatozoides con buena morfología y motilidad con la pipeta de inyección aspirando el espermatozoide por la cola, con el objetivo de introducir primero la cabeza de este cuando sea inyectado en el ovocito, y se coloca el ovocito, ayudado con la pipeta de sujeción, de manera que quede inmóvil y el corpúsculo polar situado a las 7 u 11 horarias, para evitar dañar el

huso meiótico al introducir el espermatozoide (Matsunaga & Horiuchi, 2015). Con la pipeta de inyección se traspasa de forma delicada y gradual la zona pelúcida y se rompe la membrana plasmática, depositando el espermatozoide en el citoplasma (técnica original de Palermo et al., 1992).

4.4.6. Análisis de la calidad embrionaria

Además de las valoraciones de la calidad embrionaria realizada rutinariamente en la clínica para verificar la fecundación y posterior desarrollo embrionario, antes de proceder a la biopsia de los embriones, se realiza una evaluación en día 5 de desarrollo, clasificándose según los criterios de ASEBIR 2015 que se describen en la **Tabla 4**. En ellos se tiene en cuenta: la presencia y grado de expansión del blastocele; la distribución homogénea, el número y la cohesión de las células del trofoectodermo; y el tamaño, forma y compactación de las células de la masa celular interna.

Posteriormente a la realización del presente trabajo, estos criterios se han unificado para D+5/D+6, y se puede consultar la nueva gradación en la **Figura 13** del apartado de revisión bibliográfica 2.2.2.6.

**Tabla 4.** Clasificación embrionaria del blastocisto según criterios de ASEBIR 2015 (Saiz et al., 2018).

D+4	D+5				D+5	D+6			
	Grado de expansión	MCI	Trofoectodermo	ASEBIR		Grado de expansión	MCI	Trofoectodermo	ASEBIR
Mórula compacta	Desde: "Iniciando la expansión"  Hasta: "Eclosionando"	A	A	A	Blastocisto temprano o cavitando (ZP gruesa)	Desde: "Iniciando la expansión"  Hasta: "Eclosionando"	A	A	B
			B	B				B	
			C	C				C	
			D	D				D	
		B	A	A			A	A	B
			B	B			B	B	B
			C	C			C	C	C
			D	D			D	D	D
		C	A	A			A	A	B
			B	B			B	B	B
D	C	C	C	C	C				
	D	D	D	D	D				
		A,B,C o D	D	D	D				
	Blastocisto temprano o cavitando (ZP gruesa)		C	D	D				
Mórula no compacta	Mórula			D	Excluidos				

#### 4.4.7. Biopsia Embrionaria

La obtención de células embrionarias mediante biopsia se realiza en día 5 de desarrollo embrionario, es decir, en estadio de blastocisto. Es un proceso muy delicado y que requiere un alto grado de especialización por parte del equipo de embriólogos.

Para hacer la biopsia en estadio de blastocisto, previamente en día 3 de cultivo se llevará a cabo la ruptura de la zona pelúcida del embrión, mediante un sistema de láser (Zylos-tk laser, Hamilton-Thorne, EE. UU.) que está montado sobre un microscopio invertido. De esta manera, la eclosión del embrión se acelera y facilita la biopsia en el quinto día. El embrión se pondrá en una gota de G-MOPS PLUS, cubierta con aceite, y con una aguja de sujeción (Holding Pipette 150  $\mu\text{m}$ , ref: 15316, Vitrolife, Suecia) se fijará situando la masa celular interna en la posición más alejada posible de la pipeta de aspiración para evitar dañarla, y con otra de biopsia (Biopsy Pipette 30  $\mu\text{m}$ , ref. 15118, Vitrolife, Suecia) se aspirarán unas pocas células del trofoectodermo realizando unos pulsos de láser para liberarlas (Montag & Morbeck, 2017).

Las células biopsiadas son aisladas, bajo condiciones estériles, en tubos de 0,2 ml (Sarstedt PCR MULTIPLY-PRO tube, ref: 72737002) con 2,5  $\mu\text{l}$  de medio de lavado, que contiene 0,1% de PVA (alcohol polivinílico PVA, Sigma-Aldrich, ref: P8136-250G), PBS (Cell Signaling Technologies, ref: 06/2009) y agua (Promega, ref: P1193), y se mantienen en condiciones de frío a 4°C hasta su llegada al laboratorio de genética, donde se almacenarán congeladas a -20°C hasta su análisis.

Una vez los embriones son biopsiados, se deben crioconservar hasta disponer del resultado del análisis genético.

#### 4.4.8. Criopreservación de embriones

Esta es una parte esencial del tratamiento de PGT. La técnica que se utiliza para crioconservar los embriones es la vitrificación (Vitrification Media, ref. 91101, y Cryotop®, ref. 81112, Kitazato, Japón) siguiendo las indicaciones del fabricante.

Esta técnica permite que los embriones pasen de temperatura ambiente a -196°C en tan solo unos segundos, gracias a un proceso de deshidratación que

se consigue pasándolos por diferentes medios con un orden creciente de crioprotectores. Después se colocan sobre el dispositivo *cryotop* con la mínima cantidad de medio, y se introducen directamente en un recipiente pequeño con nitrógeno líquido, para posteriormente almacenarlos en un tanque de nitrógeno líquido donde permanecerán hasta su desvitrificación.

#### 4.4.9. Test genético preimplantacional de Aneuploidías

A partir de las 8-10 células biopsiadas procedentes del trofoectodermo, el centro de genética clínica DiNA Science de Madrid (<https://dinascience.com/es/>) llevó a cabo la lisis celular para liberar el ADN genómico y posterior amplificación completa del genoma (WGA) mediante el kit “PICOPLEX/Sureplex” (PicoPLEX® Single Cell WGA Kit User Manual), siguiendo las indicaciones del fabricante. Para la secuenciación de la muestra utilizaron la tecnología Veriseq NGS (Illumina).

Una vez analizado todo el complemento cromosómico de la/las muestras embrionarias recibidas de un determinado paciente elaboran el informe genético en el que se detalla qué tipo de aneuploidías presenta cada uno de los embriones analizados, y si es o no transferible.

El criterio que utiliza el centro de referencia (DiNA science) para clasificar las aneuploidías, duplicaciones o deleciones en la muestra mediante NGS se determina en función de los valores de variación del número de copias (CNV), y definen 6 posibles escenarios:

- Embrión EUPLOIDE: Una célula cromosómicamente euploide contiene 23 pares de cromosomas sin pérdida ni ganancia de material genético. En las biopsias de trofoectodermo se considera un embrión euploide cuando presenta <30% de células aneuploides. Los embriones clasificados como euploides tienen un riesgo muy reducido de presentar anomalías cromosómicas.
- Embrión ANEUPLOIDE: Una célula aneuploide contiene una ganancia y/o pérdida de material genético afectando a 1 ó 2 parejas de cromosomas. En biopsias de trofoectodermo se define un embrión aneuploide cuando se observa en, al menos, el 70% de las células. Puede tratarse de:

- TRISOMÍA (T): Ganancia de una copia extra de un cromosoma o fragmento de cromosoma.
  - MONOSOMÍA (M): Pérdida de una copia de un cromosoma o fragmento de cromosoma.
  - TETRASOMÍA (TT): Ganancia de 2 copias extras de un cromosoma o fragmento de cromosoma.
  - NULISOMÍA (N): Pérdida de 2 copias de un cromosoma o fragmento de cromosoma.
- Embrión ANEUPLOIDE COMPLEJO: Ganancias y/o pérdidas en 3 o más parejas de cromosomas. En biopsias de trofoectodermo cuando se observe en, al menos, el 70% de las células analizadas. Los embriones diagnosticados como aneuploides complejos presentan múltiples anomalías y tienen un riesgo elevado de ser cromosómicamente anormales.
  - Embrión MOSAICO: Cuando se observen ganancias y/o pérdidas de material genético afectando al 30-70% de las células analizadas. El mosaicismo es la existencia de, al menos, 2 líneas celulares distintas con diferente dotación cromosómica, y puede afectar a embriones normales y anormales.
  - Embrión POLIPLOIDE: Dotación cromosómica completa de más de 2 juegos cromosómicos ( $>2n$ ).
  - NO RESULTADO (NR): No es posible establecer un diagnóstico de la muestra analizada, bien porque ha habido un fallo en la amplificación de ADN impidiendo su detección, o bien por degradación del ADN. En este último caso todos los cromosomas presentan individual y colectivamente pérdidas y ganancias. Este proceso puede ser debido a procesos apoptóticos, o también consecuencia de procesos artefactuales, propio de embriones dismórficos o bloqueados.

#### 4.4.10. Preparación endometrial

Una vez obtenido el resultado del análisis genético de los embriones, y si los pacientes tienen algún embrión euploide, se procede a preparar el endometrio de la paciente para desvitrificar el o los embriones sanos y transferirlos.

Este proceso es otro factor imprescindible para el éxito de las TRA, ya que es necesaria una receptividad endometrial óptima para la implantación y la

evolución de la gestación. La preparación se lleva a cabo en la consulta ginecológica mediante seguimiento ecográfico, control de los niveles de estradiol/progesterona en sangre, y valoración de la calidad y grosor endometrial.

Por norma general, se utiliza el protocolo de ciclo sustituido, que consiste en la administración de estrógenos y progesterona sintética para conseguir la proliferación del endometrio y su transformación secretora. Este protocolo se inicia en los primeros días de sangrado del ciclo menstrual de la paciente, asegurando la supresión de la función ovárica. Se pauta una dosis de estradiol diaria vía oral (Valerato de Estradiol 2mg/8 horas, Progynova), y pasados unos 8-12 días se realiza un control de niveles séricos de estradiol/progesterona, y de grosor y morfología del endometrio. Si en ese momento el endometrio cumple las características óptimas para introducir la progesterona (estructura trilaminar, con un grosor por encima de los 7 mm, y la función ovárica está ausente), se pauta el inicio de la progesterona a una dosis de 600-800 mg/día vía vaginal, y se programa la transferencia embrionaria 5 días después (Wang et al., 2018). En total, este protocolo tiene una duración aproximada de 18 días desde el inicio de la mediación hasta la programación de la transferencia embrionaria. Posteriormente, la administración de estradiol y progesterona se mantendrá hasta la semana 11-12 de embarazo siempre y cuando la implantación y viabilidad del embrión sean adecuadas.

En casos excepcionales se ha utilizado para la preparación endometrial el protocolo de ciclo natural, en el que se aprovecha la función ovárica de la paciente monitorizando la foliculogénesis. La elección de un método de preparación u otro depende de múltiples factores relacionados con la paciente, aunque en este estudio ha predominado el uso del protocolo de ciclo sustituido para la realización de las transferencias (Lawrenz et al., 2020).

#### 4.4.11. Desvitrificación embrionaria

Una vez el endometrio de la paciente está preparado, se programa la transferencia. Para ello hay que desvitrificar los embriones que, como están vitrificados en estadio de blastocisto, se debe realizar el mismo día en el que se programe la transferencia.

Para la desvitrificación se sigue el protocolo de Kitazato (Japón). Este proceso es más sencillo y rápido que la vitrificación, basándose en la rehidratación de los embriones.

Al sacar el dispositivo de vitrificación *cryotop* del tanque de nitrógeno, se sumerge rápida y directamente en el primer medio de desvitrificación (TS), calentado previamente a 37°C, donde el embrión permanece un minuto. Que este paso se haga correctamente es tan importante, o quizás más, que el momento de la introducción del embrión en nitrógeno líquido (Mazur & Seki, 2011). A continuación, el embrión se pasará a la solución diluyente (DS) durante 3 minutos y seguidamente se pondrá en la solución de lavado (WS) 6 minutos. Por último, los embriones se trasladarán a medio de cultivo G-TL (Vitrolife, Suecia), donde se comprobará su calidad y se mantendrán hasta el momento de la transferencia.

#### 4.4.12. Transferencia embrionaria

La transferencia embrionaria se realiza en el quirófano del centro para optimizar el buen manejo de los embriones. Se lleva a cabo introduciendo el embrión aproximadamente a 1,5 cm del fondo uterino. Para ello se canaliza la cavidad uterina a través del cérvix, y mediante ecografía transabdominal guiada se consigue precisar el lugar donde se va a depositar el embrión. Cuando está todo preparado, el ginecólogo avisa al embriólogo que cargará el embrión en la cánula (Embryo Transfer Catheter Set, ref: 14690, Labotec, Alemania) y la llevará al quirófano para introducirla en el útero por la canalización previa. Una vez depositado el embrión, el embriólogo revisa la cánula bajo la lupa para asegurar que no ha quedado retenido en ella (Mains & Van Voorhis, 2010).

#### 4.4.13. Diagnóstico y seguimiento de embarazo

Una vez realizada la transferencia embrionaria, los pacientes reciben el protocolo que deben seguir hasta el momento en el que se realice la prueba de embarazo. Básicamente la paciente seguirá con la administración de estrógenos y progesterona vaginal pautada para la preparación endometrial (*apartado 4.3.11*), y mantendrá una vida normal.

La primera prueba de embarazo que se realiza es la medición de los niveles de la hormona beta-hCG en sangre, cuyo ascenso considerable puede

ser detectado pasados 10 días desde que se realiza la transferencia del embrión (Ochsenkühn et al., 2009). Cuando esta prueba es positiva, se programa la primera ecografía transvaginal a las 2 semanas, que corresponde con la 6ª semana de gestación. Aquí se comprueba la visualización del saco gestacional, vesícula vitelina, el embrión y la presencia de latido cardiaco, cuya detección es la que permite establecer verdaderamente la viabilidad de la gestación. Se realiza posteriormente otro control a la octava semana de embarazo, y es entonces cuando se le da el alta a la paciente, que si el embarazo ha evolucionado correctamente continuará el seguimiento con su ginecólogo habitual.

Se mantiene contacto telefónico con todos los pacientes hasta el final del embarazo, lo que permite conocer si la evolución ha sido satisfactoria, o si ha presentado alguna complicación, anotando finalmente y si procede, los datos del recién nacido y del parto.

Puede ocurrir que la prueba de la hormona beta-hCG sea positiva pero unos días después la paciente presenta un sangrado y descenso exponencial de niveles de dicha hormona, o que inicialmente los valores sean bajos y no se produce un incremento posterior. En ninguno de los casos se observa la presencia del saco gestacional durante la primera ecografía programada, definiéndose este escenario como embarazo bioquímico (Macklon et al., 2002).

#### 4.5. Obtención de las muestras para secuenciar

Una vez extraído el ADN embrionario para llevar a cabo el diagnóstico genético preimplantacional en el centro de genética clínica DiNA Science de Madrid (<https://dinascience.com/es/>), el ADN sobrante se conserva en el laboratorio de genética correctamente identificado. Parte de este ADN correspondiente a los 134 embriones euploides transferidos de las 84 parejas seleccionadas para el proyecto fue solicitado a dicho laboratorio y recibido en el Departamento de Biología Celular e Histología de la Universidad de Murcia obteniendo el permiso previo de los pacientes. Tras recibir las muestras de ADN fueron correctamente identificadas, anonimizadas y entregadas a la plataforma de genómica del Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria (IMIB) Pascual Parrilla, donde se llevó a cabo la secuenciación de las muestras usando el

sistema Ion Torrent (Life Technologies), basado en el uso de la tecnología de semiconductores.

Previamente, las muestras de ADN pasaron un control de calidad comprobando la concentración y la pureza. Esta última está determinada por la ratio de absorbancia A260/A280, considerándose calidad óptima cuando la relación está entre 1,8-2,0. Todas las muestras cumplían los requisitos para secuenciar.

#### 4.6. Secuenciación masiva

La secuenciación masiva de 134 muestras de ADN embrionarias se realizó en la Plataforma de Genómica del IMIB (Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria Pascual Parrilla, como servicio central de apoyo a la investigación, siguiendo los pasos que se detallan a continuación.

##### 4.6.1. Diseño del panel genético dirigido Ampliseq™

Bajo el asesoramiento de la plataforma de genómica IMIB Pascual Parrilla se elaboró un panel genético dirigido (Panel AmpliSeq™). Este método permite reducir la cantidad de información que potencialmente se dispondría si se secuenciara el genoma completo, para centrarla únicamente en la secuenciación de los genes y polimorfismos o SNPs de interés. El panel estaba constituido por el diseño de parejas de cebadores o *primers* que amplificarían las regiones diana a partir del ADN de la muestra, dando lugar al conjunto de librerías que se utilizarían para la secuenciación.

Para aquellos genes que presentaban múltiples polimorfismos de interés, se optó por amplificar toda la región codificante (todos los exones), pero dada la imposibilidad de incluir la región codificante de todos los genes, para aquellos que presentaban menor número de polimorfismos de interés se seleccionó una única región priorizando aquella que contenía polimorfismos que no se encontraban en homocigosis en la población, y cuyo fenotipo no había sido descrito como benigno.

De entre los polimorfismos más comunes en la población con frecuencia alélica similar, se optó por escoger aquellos que producían un codón de terminación, o cambios en el patrón de lectura. Se incluyeron también los que presentaban mayor frecuencia alélica en la población del Sur de Europa.

Cuando se trataba de amplificar genes completos, se tuvo en cuenta tanto la región codificante o exónica como la región UTR 3' y 5', localizando los cebadores en zonas intrónicas (no codificantes) para asegurar la amplificación completa de los exones.

Finalmente, el diseño del panel se compuso por el conjunto de cebadores para la amplificación de 132 amplicones a partir de los 27 genes diana: 3 de los genes se amplificaron por completo (ABCA1, F2 y NR5A2) utilizando para ello 62, 22 y 24 amplicones respectivamente, y en el resto de los genes se diseñó un solo amplicón para obtener la región de interés. En la **Tabla 5** se especifica la región amplificada de cada gen y el *rs* asignado de los polimorfismos incluidos (*rs*: *reference* SNP o polimorfismo de nucleótido único de referencia) conforme a la secuencia del genoma humano GRCh37/hg19, el valor pLI, que define la haploinsuficiencia y los fenotipos más característicos que presenta el modelo homocigoto KO en ratón de cada gen con la referencia del artículo científico que así lo demuestra.

El diseño de los cebadores específicos para la amplificación de las regiones de interés se ha realizado mediante el algoritmo "Ion Ampliseq Designer 7.4" (ThermoFisher Scientific, EE. UU.), utilizando como referencia la secuencia del genoma humano GRCh37/hg19.

Tabla 5. Listado de genes y polimorfismos que se incluyeron en el panel Ampliseq™

Código GEN	pLI <sup>1</sup>	Región amplificada <sup>2</sup>	Polimorfismo/gen <sup>3</sup>	Fenotipo KO Homocigoto <sup>4</sup>	Referencia (DOI)
<b>ABCA1</b>	0	chr9:107543282-107690527	gen completo	Muerte perinatal con defectos en la placenta. Penetrancia incompleta. Disfunción metabólica y reproductiva.	10.1016/S0002-9440(10)64614-7
<b>BSL</b>	0	chr6:41889505-41889515	rs144207756	Muerte posterior a implantación.	10.1016/j.febslet.2006.09.072
<b>DENND4C</b>	0	chr9:19286789-19286799	rs191652418	Muerte durante crecimiento y desarrollo fetal (E14).	10.1038/nature26002
<b>DNM2</b>	1	chr19:10930623-10930633	rs199655883	Muerte anterior a E8-E12. Deterioro muscular en heterocigotos	10.1016/j.devcel.2009.11.005
<b>DSC3</b>	0	chr18:28588349-28588359	rs114245564	Muerte preimplantacional. Heterocigotos sin anomalías	10.1242/jcs.02769
<b>F2</b>	0	chr11:46740715-46761065	gen completo	Necrosis y fallo vascular. Muerte durante gestación (E9.5-11.5) o al nacimiento	10.1073/pnas.95.13.7597
<b>GDF3</b>	0	chr12:7842773-7842783	rs140926412	Muerte prenatal. Penetrancia incompleta. Desórdenes endocrinos.	10.1242/dev.02210
<b>HMGCL</b>	0	chr1:24164630-24164640	rs538622150	Muerte a mitad de gestación afectando al tamaño del embrión, hígado, corazón y placenta.	10.1093/hmg/7.13.2057
<b>HS6ST1</b>	0,92	chr2:129075939-129075949	rs202247387	Mortalidad durante desarrollo y crecimiento fetal.	10.1074/jbc.M607434200
<b>IPPK</b>	0,87	chr9:95380817-95380827	rs184462941	Muerte previa a E8.5.	10.1073/pnas.0503656102

Código GEN	pLI <sup>1</sup>	Región amplificada <sup>2</sup>	Polimorfismo/gen <sup>3</sup>	Fenotipo KO Homocigoto <sup>4</sup>	Referencia (DOI)
<b>KCTD10</b>	0,86	chr12:109898518-109898528	rs377314709	Muerte durante organogénesis (E10.5 y E11.5). Defectos circulación vascular.	10.1371/journal.pone.0112275
<b>KMT2A/MLL</b>	1	chr11:118373179-118373189	rs141727765	Muerte durante organogénesis (E11.5 y E14.5). Defectos hematopoyesis.	10.1242/jcs.080523
<b>KMT2C</b>	1	chr7:151962134-151962144	rs146238849	Muerte embrionaria. Penetrancia incompleta. Defectos crecimiento, oculares, infertilidad.	10.1073/pnas.0607313103
<b>MMACHC</b>	0	chr1:45973218-45973227	rs398124292	Muerte preimplantacional. Fallo en formación de blastocisto y eclosión de embriones en cultivo. Alteraciones en hembras heterocigotas.	10.1016/j.ymgme.2014.05.002
<b>MYO18A</b>	0,99	chr17:27446394-27446404	rs114765291	Muerte embrionaria previa a E13.5. Defectos en miocitos cardiacos.	10.1074/jbc.RA118.004560
<b>NOC3L</b>	0	chr10:96110027-96110037	rs564137729	Muerte con arresto en mórula y fallo en formación del blastocele.	10.1016/j.bbrc.2013.07.061
<b>NR5A2</b>	0,24	chr1:199996729-200146552	gen completo	Muerte E7.5. Heterocigotos con niveles bajos de colesterol, aumento de ácidos biliares y acortamiento de crestas intestinales.	10.1074/jbc.M401523200
<b>NRF1</b>	1	chr7:129311285-129311295	rs146404476	Muerte embrionaria temprana (E3.5-E6.5). Baja proliferación celular y contenido de ADN mitocondrial.	10.1128/MCB.21.2.644-654.2001
<b>PAXIP1</b>	1	chr7:154745911-154745921	rs376799795	Muerte embrionaria temprana E3.5-E5.5, o en algunos casos en E9.5. Retraso en desarrollo.	10.1101/gr.3826505

Código GEN	pLI <sup>1</sup>	Región amplificada <sup>2</sup>	Polimorfismo/gen <sup>3</sup>	Fenotipo KO Homocigoto <sup>4</sup>	Referencia (DOI)
<b>PIKFYVE</b>	0	chr2:209179036-209179046	rs146158348	Muerte embrionaria antes de la implantación. Disminución de células MCI/TE y blastocele defectuoso.	10.1074/jbc.M111.222364
<b>RAE1</b>	1	chr20:55941872-55941882	rs147168854	Muerte embrionaria anterior a E8.5. Heterocigotos con defecto en mitosis y segregación de cromosomas.	10.1083/jcb.200211048
<b>RBM19</b>	0	chr12:114352870-114352880	rs201853997	Muerte preimplantacional anterior a E6.5. Arresto en mórula y apoptosis.	10.1186/1471-213X-8-115
<b>RFK</b>	0,06	chr9:79002397-79002407	rs146146902	Muerte previa a E7.5.	10.1038/nature08206
<b>RFT1</b>	0	chr3:53164412-53164422	rs185366134	Según IMPC embriones homocigotos con muerte E9.5-12.5	10.1016/j.ejmg.2018.07.023
<b>SMG6</b>	0,98	chr17:2203527-2203537	rs151078665	Muerte prenatal	10.15252/embj.201489947
<b>TJP1</b>	1	chr15:30053397-30053407	rs191883147	Mortalidad embrionaria durante organogénesis (E10.5-11.5). Retraso crecimiento, defectos angiogénesis de placenta, tubo neural, alantoides.	10.1091/mbc.e07-12-1215
<b>UBA5</b>	0	chr3:132394747-132394757	rs114925667	Muerte embrionaria durante organogénesis (E12.5)	10.1074/jbc.M109.036814

<sup>1</sup>pLI mide la intolerancia a la pérdida de función considerando un gen haploinsuficiente si  $pLI \geq 0,9$  y tolerante si  $pLI \leq 0,1$ .

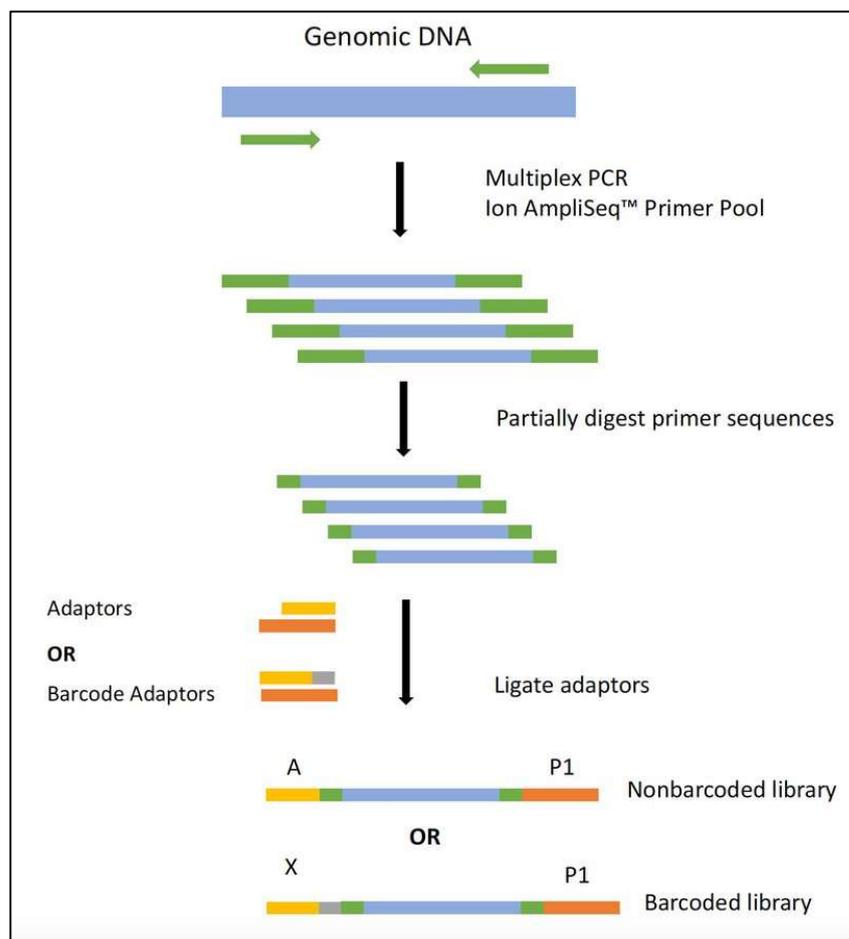
<sup>2</sup>Coordenadas de la región amplificada siguiendo la secuencia del genoma humano GRCh37/hg19.

<sup>3</sup>Se indica el identificador de la región del polimorfismo (rs) o los casos en los que se ha amplificado el gen completo.

<sup>4</sup>Descripción de fenotipo del modelo KO homocigoto en ratón según la fuente de datos "Mouse Genome Database"

#### 4.6.2. Preparación de las librerías

Para la generación de las librerías (que se denomina al conjunto de amplicones o regiones de interés correctamente identificadas y amplificadas), a partir del ADN de la muestra y el panel Ampliseq diseñado, se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el uso de la tecnología PCR multiplex AmpliSeq™ (*Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0*; Life Technologies, EE. UU.). Esta tecnología es capaz de generar todos los amplicones en una única reacción asignándoles códigos de barras "IonXpress Barcodes Adapter" para permitir multiplexar todas las muestras en una misma carrera de secuenciación (**Figura 24**).



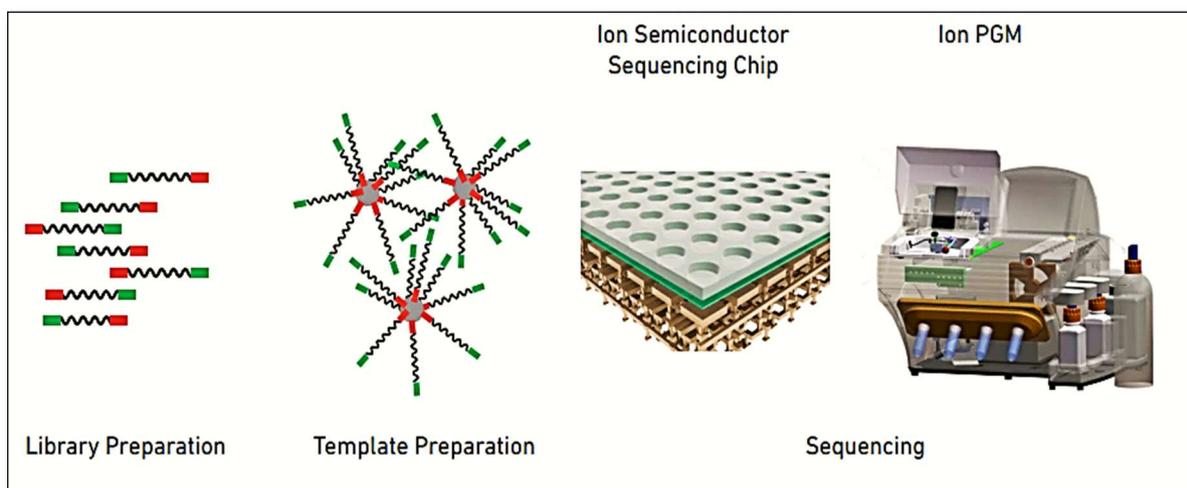
**Figura 24.** Esquema de preparación de librerías con la tecnología Ion AmpliSeq™ (ThermoFisher, Alemania)

Obtenidas las librerías se purificaron con el sistema de bolas magnéticas "Beckman Coulter™ Agencourt AMPure XP" (ThermoFisher Scientific, EE. UU.) y para su cuantificación se realizó una qPCR utilizando el sistema "Kappa Library

Quantification Kit Ion Torrent" (Roche, Suiza), que permite un cálculo preciso de la concentración de cada librería para su normalización previa a la mezcla de todas las librerías.

#### 4.6.3. Templado y secuenciación

El templado es la preparación que requiere el sistema *Ion Torrent* para la secuenciación de las muestras de ADN, disponiendo y reamplificando los amplicones sobre partículas esféricas que serán depositadas posteriormente en un chip semiconductor. Su preparación se realiza de forma automática en el equipo *Ion Chef*, utilizando el kit *Ion 530 Kit-Chef* (Life Technologies, EE. UU.) que genera fragmentos de hasta 400 pb (**Figura 25**).



**Figura 25.** Representación del flujo de trabajo de Ion Torrent. (Fuente: Ion Torrent Amplicon Sequencing, Application note, 2011)

Por último, la secuenciación de las partículas ISPs (*Ion Sphere Particles*) se realizó en el equipo *Ion GeneStudio S5 System* (Ion Torrent, ThermoFisher Scientific, EE. UU.). Este tipo de secuenciación aprovecha el hecho de que la adición de un dNTP a un polímero de ADN libera un ion hidrógeno produciendo cambios en el pH. Millones de estos cambios de pH se miden simultáneamente usando semiconductores, y convirtiendo las señales químicas en digitales para finalmente determinar la secuencia de cada fragmento.

#### 4.6.4. Análisis Bioinformático

El análisis bioinformático se ha realizado con los parámetros de análisis establecidos en *Torrent Suite 5.12.1* incluyendo:

1. La eliminación de las secuencias de los adaptadores usados en la fase de preparación de las librerías y de los índices que identifican las distintas muestras.
2. El alineamiento de las secuencias leídas frente al genoma humano de referencia (GRCh37/hg19) con el alineador *Torrent Mapping Alignment Program* (TMAP). En este punto se generan los archivos **.bam**.
3. La identificación de los polimorfismos mediante *Variant Caller* a nivel germinal (es decir con 20-30X de cobertura) generando archivos tipo **.vcf**. (no anotados).
4. La anotación de los polimorfismos mediante *Ion Reporter 5.14.1.0*, con el que se obtuvieron los archivos **.vcf** anotados.

Tras la recepción de los archivos **.vcf** anotados, se utilizó la herramienta de programación RStudio (R versión 4.1.3) (RStudioTeam, 2020) para facilitar la gestión y el análisis de todos los datos.

El estudio de las secuencias proteicas y características estructurales y funcionales de las proteínas se llevó a cabo consultando la base de datos de UniProt (uniprot.org), GeneCards (genecards.org) y Ensembl (Ensembl.org).

Por último, para el estudio de los fenotipos que se producen tanto en la especie humana como en modelos animales, se utilizaron las bases de datos de MGI (informatics.jax.org), ClinVar (ncbi.nlm.nih.gov/clinvar) y OMIM (omim.org).

#### 4.6.5. Cultivo embrionario monitorizado mediante la tecnología en tiempo real (*Time-lapse*)

Los ovocitos, una vez microinyectados, se cultivan con medio único (GTL PLUS, Vitrolife, Suecia) en un incubador con tecnología en tiempo real (EmbryoScope™, Vitrolife, Suecia) a 5,1% de O<sub>2</sub>, 6,3% de CO<sub>2</sub> y 37°C. Esta tecnología nos permite seguir el desarrollo y la morfocinética embrionaria sin tener que sacar los embriones del incubador, de donde únicamente saldrán para

realizarles la eclosión asistida, necesaria para la biopsia de los embriones (Sciorio et al., 2018).

Cada ovocito se coloca en uno de los 12 pocillos que contiene la placa de cultivo del EmbryoScope, lo que nos permite seguir su desarrollo de forma individualizada.

#### 4.7. Obtención y purificación del material genético de los hisopos bucales de los progenitores.

Para purificar el ADN de los hisopos bucales se han seguido las instrucciones del fabricante del kit Genra Puregene Buccal Cell Kit (Qiagen, Alemania) utilizando los siguientes reactivos:

- Solución de lisis
- Solución RNasa A
- Solución para precipitación de proteínas
- Solución para hidratar el ADN
- Isopropanol
- Etanol al 70% en agua
- Solución de glucógeno
- Proteinasa K

El protocolo se divide en 5 pasos detallados a continuación:

1. Tras la obtención de células bucales mediante el raspado de la mucosa bucal (10 veces con el bastoncillo) una hora posterior a la ingesta de sólidos o líquidos como mínimo, se lleva a cabo la lisis celular introduciendo en un tubo cónico de 1,5ml (Eppendorf®, Alemania) la punta del bastoncillo junto con 300 µl de solución de lisis y 1,5 µl de proteinasa K, dejándolo incubar a 55°C en el termobloque durante toda la noche. Al día siguiente, se extrae la punta del bastoncillo del tubo cónico de 1,5ml escurriéndola fuertemente contra las paredes para recuperar el máximo líquido posible.
2. Posteriormente se añaden 100 µl de solución para la precipitación de proteínas y proceder así a su eliminación agitándola 20 segundos en el mezclador de vórtice (vórtex) e incubando la solución en hielo durante 5 minutos. Después se centrifuga (Gyrozen, Korea del Sur) la muestra durante 3 minutos a 16000xg, acumulándose un pellet de proteínas en la base del

tubo que será desechada para recuperar el resto de contenido o sobrenadante que permanece líquido.

3. Para la precipitación del ADN se mezcla en un tubo limpio 0,5 µl de glucógeno y 300 µl de isopropanol al 100% junto con el sobrenadante obtenido del paso anterior, se mezcla suavemente invirtiendo el tubo con delicadeza unas 50 veces, y posteriormente se centrifuga durante 5 minutos a 16000xg. Se extrae el sobrenadante delicadamente para desecharlo con cuidado de que el pellet formado de ADN no se desprenda, se vuelca el tubo y se deja secar sobre una superficie limpia de papel absorbente.
4. A continuación, se añade 300 µl de etanol al 70% y se invierte el tubo varias veces hasta conseguir desprender el pellet, se centrifuga un minuto a 16000xg y se vuelve a desechar con cuidado el sobrenadante secando nuevamente el tubo sobre una superficie limpia de papel absorbente durante 5 minutos, asegurándonos de que el pellet continúa en el tubo.
5. Por último, se procede a la hidratación del ADN añadiendo 100 µl de solución hidratante y mezclándolo bien mediante 5 segundos en el agitador vórtex para proceder a disolver el ADN incubándolo durante una hora a 65°C. Después se deja incubando el tubo a temperatura ambiente y movimiento constante durante toda la noche y a la mañana siguiente, se da por finalizada su purificación midiendo la cantidad y calidad recuperada en el espectrofotómetro NanoDrop (ThermoFisher, Alemania).

#### 4.8. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional

En aquellos casos en los que la mutación era relevante, se llevó a cabo una PCR convencional y una posterior secuenciación por el método de Sanger para la verificación de los resultados obtenidos.

Para la PCR se diseñaron dos pares de cebadores: directo y reverso (*forward* y *reverse*) a partir de la secuencia genómica de la base de datos GenBank (referencia NG\_021188.2) que incluyese la región a amplificar con el polimorfismo de interés. Los cebadores fueron sintetizados por Sigma-Aldrich (EE. UU.) y la secuencia nucleotídica fue la siguiente:

Cebador Directo: 5'-GTTGCCAATTACTGCTCTTCTT-3'

Cebador Reverso: 5'-AAGAGCTGCCTTTACACC-3'

Tamaño del amplicón: 300pb

La polimerasa utilizada para la PCR fue la enzima *KAPA2G Fast HotStart DNA Polymerase* (Roche, Suiza). La reacción se llevó a cabo con un volumen final de 25  $\mu$ l y la mezcla consistía en (**Tabla 6**).

**Tabla 6.** Condiciones empleadas para las amplificaciones por PCR a partir de ADN

Reactivo	Concentración Final	Volumen
KAPA2G ReadyMix (PCR kit)	1X	12,5 $\mu$ l
Cebador directo	0,5 $\mu$ M	12,5 $\mu$ l
Cebador reverso	0.5 $\mu$ M	1,25 $\mu$ l
ADN	1000ng/embrión 350ng/hisopo	1 o 5 $\mu$ l
Agua de biología molecular		Hasta 25 $\mu$ l

Las muestras se amplificaron en el termociclador (Mastercycler® personal Thermal Cycler, Eppendorf®, Alemania) según las indicaciones del fabricante. Las condiciones y fases del programa utilizado para la amplificación consistieron en una desnaturalización inicial de 2 min a 95°C; 35 ciclos en los que se sucedía una desnaturalización (10s a 95°C), una hibridación (10s a 53°C) y una extensión (1s a 72°C); y una extensión final de 1 min a 72°C. Por último, el enfriamiento de la muestra a 4 °C. La amplificación de las muestras se determinó mediante la lectura en gel de agarosa (1,5%), y aquellas que presentaron amplificación se purificaron con el *Gel/PCR Purification Mini Kit* (Favorgen Biotech Corporation, Austria) antes de enviarse a secuenciar.

La plataforma de genómica (IMIB-Pascual Parrilla) llevó a cabo la secuenciación de la muestra de ADN mediante el método de Sanger, y una vez obtenidas las secuencias se compararon los diferentes resultados con el fin de hallar la zona mutada. Se definió entonces la ausencia o presencia del polimorfismo y su carácter homocigoto o heterocigoto.

#### 4.9. Elaboración de un método de predicción de embarazo mediante IA

Para considerar los beneficios que la aplicación de los sistemas de Inteligencia Artificial podía aportar a este estudio, se contrató a la empresa Marbyt Smart Solutions for Biotechnology S.L. (Murcia), que realizó un estudio preliminar en base a los datos genéticos obtenidos durante la identificación de polimorfismos, junto con otros parámetros derivados del ciclo reproductivo.

#### 4.9.1. Selección de datos

El correcto tratamiento de los datos es crucial en este tipo de proyectos, por lo que es una de las fases que mayor tiempo conlleva. En cuanto a la selección de los embriones que iban a participar en este proyecto se determinaron los siguientes criterios de inclusión:

- Aquellos embriones que procedían de parejas que habían tenido, al menos, un embrión positivo (que incluía RNV o aborto) y otro negativo (que incluía resultado de  $\beta$ -hCG negativo o bioquímico). Esto se traduce en que las pacientes seleccionadas tienen un endometrio funcional en cuanto a receptividad endometrial que, aunque pueda variar de un ciclo a otro, resuelve gran parte de la interferencia que pueda causar el factor endometrial sobre la implantación embrionaria, permitiendo así obtener información acerca de otros factores que puedan estar influyendo en el éxito o fracaso del embrión. Esta característica es esencial a la hora de entrenar al clasificador para discernir el potencial del embrión de resultar en embarazo o no.
- Aquellos embriones de los que se disponía de datos cinéticos obtenidos mediante el sistema time-lapse.

Los datos previamente anonimizados fueron cedidos para su análisis a la empresa Marbyt Smart Solutions for Biotechnology S.L. (Murcia). Por un lado se entregaron los datos clínicos de los pacientes junto con los datos morfológicos y cinéticos de los embriones (**Tabla 7**), y por otro, los datos crudos en formato .tsv obtenidos tras el análisis genético de la presente tesis, añadiendo los datos genéticos obtenidos del proyecto de investigación realizado por la Dr. Paula Cots (Cots, 2022).

Tabla 7. Datos clínicos, morfológicos y cinéticos para IA

	Datos clínicos					MF <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	Datos cinéticos <sup>5</sup>				
	Edad madre	Edad Padre	Edad donante	Emb BX <sup>1</sup>	Emb EU <sup>2</sup>	Clasif. morfo	Beta	t2(h)	t3(h)	t4(h)	t5(h)	tB(h)
<b>P15E1</b>	39	52	X	4	1	BE AA	+	30,0734261	30,4067903	42,4120253	44,4562681	116,473719
<b>P15E4</b>	42	55	X	5	1	BE CC	-	24,7452222	34,7498872	35,0832803	36,4169264	100,808492
<b>P17E1</b>	44	37	20	6	2	BH AA	-	20,758975	30,1601983	30,4934919	42,632025	88,3932517
<b>P17E9</b>	44	37	20	6	2	BE AA	+	24,5112458	35,1822794	35,1822794	47,6529128	100,130433
<b>P26E2</b>	47	49	26	7	5	BE AA	+	22,7086658	33,3789353	34,0457914	46,7343686	99,5847114
<b>P26E3</b>	47	49	26	7	5	BH AA	+	18,7083319	29,0463514	29,3798317	42,717425	95,6932297
<b>P28E12</b>	40	Donante	X	7	2	BE AB	-	27,3425194	39,3468569	39,6823736	49,5378842	100,146821
<b>P28E15</b>	40	Donante	X	7	2	BE AA	+	23,9907633	34,9974039	35,6643633	45,6961317	87,459785

<b>P33E1</b>	39	39	26	7	3	BE AA	-	23,9260383	34,9421797	36,2766244	46,9473303	106,293684
<b>P33E8</b>	39	39	26	7	3	BE AA	+	24,2830464	36,6259789	37,29253	49,6315167	109,31261
<b>P45E3</b>	46	41	25	8	4	BH AB	+	25,1975294	26,1978583	44,5363319	48,4030197	97,3041856
<b>P45E8</b>	46	41	25	8	4	BE AB	-	24,210325	34,8798381	34,8798381	48,7496189	101,651857
<b>P48E11</b>	39	44	24	4	3	BE AA	+	24,7946064	26,4615453	31,4635092	38,4643681	-
<b>P48E12</b>	37	42	18	3	2	BE AA	+	27,5339511	39,2096106	41,543552	54,2337922	98,2901633
<b>P48E9</b>	37	42	18	3	2	BE BB	-	25,1901789	36,5355817	37,8688997	52,2265253	99,617442
<b>P50E11</b>	41	43	X	5	1	BE BB	+	24,5243075	35,5259467	37,8607581	47,9552539	115,392064
<b>P50E2</b>	41	43	X	5	1	BE AA	-	24,1678003	35,1715014	35,1715014	35,8383711	126,77361
<b>P56E3</b>	50	51	28	7	3	BE AB	-	21,4422003	32,4465842	36,4476908	43,1167081	97,6908197

<b>P56E4</b>	50	51	28	7	3	BE AA	+	21,4444872	31,1159944	31,4516556	40,4510714	89,9815336
<b>P56E9</b>	50	51	30	6	3	BE AA	+	23,3189428	33,3198075	33,3198075	46,6563178	97,3055911
<b>P68E6</b>	45	42	20	6	4	BH AA	-	24,0465692	34,7196775	35,0541714	47,3892364	100,078356
<b>P68E9</b>	45	42	20	6	4	BH AA	-	23,3927372	35,0650042	35,7292825	50,4125683	88,8331095
<b>P72E2</b>	39	36	20	9	7	BE AA	+	24,3559767	35,0226347	35,0226347	47,8421411	97,7335639
<b>P72E8</b>	39	36	20	9	7	BE AA	-	26,3724408	36,0387169	36,0387169	50,1934256	93,0818689
<b>P74E1</b>	30	30	X	3	2	BE AA	+	24,8891719	34,8950558	35,56179	47,2617494	101,871609
<b>P74E3</b>	30	30	X	3	2	BE AA	-	23,2249178	32,5665344	34,5669675	42,5988231	99,5428972

<sup>1</sup>Embriones biopsiados (BX)

<sup>2</sup>Embriones euploides (EU)

<sup>3</sup>MF: morfología, clasificación morfológica

<sup>4</sup>R: Resultado, análisis de  $\beta$ hCG en sangre

<sup>5</sup>Datos cinéticos: t2, t3, t4 y t5= momento de división en 2,3,4 y 5 células; tB= tiempo de llegada a blastocisto. (h)= horas.

#### 4.9.2. Selección de variables

Esta etapa fue crucial en este proyecto, ya que es recomendable tener al menos 10 observaciones (embriones en este caso) por variable estudiada para obtener unos resultados muy robustos. En este caso hubo que reducir el número de variables ya que éste excedía demasiado con relación al número de observaciones (embriones) disponibles. Se incluyeron finalmente las siguientes:

- Variables morfológicas y clínicas: edad de la madre, edad del padre, % de embriones biopsiados (con respecto a fecundados), % de embriones euploides (con respecto a biopsiados), clasificación morfológica.
- Variables cinéticas: t2, t3, t4, t5 y tB.
- Variables genéticas: referencia genética del cambio genómico y genotipo alélico.

Por último, se añadieron las “etiquetas de resultado”, es decir, aquella clase o tipo final en la que se quieren clasificar las muestras problema, también conocida como “etiquetas de output”, seleccionando para ello el resultado de la  $\beta$ -hCG: “ $\beta$ -hCG positiva” o “ $\beta$ -hCG negativa”, ya que este valor representaría el éxito o fallo de la implantación embrionaria.

#### 4.9.3. Preprocesamiento de los datos

Debido a la naturaleza de los datos, antes de continuar con el entrenamiento, fue necesario su preprocesamiento.

En cuanto a las variables morfológicas y clínicas, como edad de la donante se tuvo en cuenta la edad de la madre en los casos de TRA con ovocitos propios. En los casos de espermatozoides procedentes de donación, la edad del padre se consideró como la media de donantes de esperma en España (18-35=27 años). Con relación a la clasificación morfológica de los embriones se asignaron códigos en función del tipo de blastocisto (BE:0, BC:1, BH:2), calidad interna o MCI (en A:0, B:1, C:2) y calidad externa o TE (en A:0, B:1, C:2).

En cuanto a las variables cinéticas se tuvo que realizar un escalado para que aportaran información en la misma medida. Se utilizaron 2 tipos de escalado diferente (Min-Max y Z-Mean) para ver las variaciones y posibles mejoras en el modelo creado en fases posteriores.

En cuanto a las variables genéticas el número era tan grande (1996 variables), que se decidió llevar a cabo su reducción mediante un análisis estadístico de componentes principales o PCA, que permite extraer información en meta-variables conservando el 100% de la variabilidad de los datos y simplificando su complejidad. Tras ese proceso, resultó una tabla con 30 columnas (30 meta-variables).

Finalmente, la tabla se estructuró con 26 filas (correspondientes a los embriones estudiados) y 43 columnas: 8 de variables morfológicas y clínicas, 5 de variables cinéticas y 30 de meta-variables genéticas como se muestra a continuación (**Figura 26**):

	MVar1	...	MVar8	CVar1	...	CVar5	GPCA1	...	GPCA30	Out
Emb1										
Emb2										
...										
Emb26										

**Figura 26.** Estructura final de la tabla de datos

#### 4.9.4. Entrenamiento, validación y selección del modelo de clasificación

Estas tres etapas se realizan de forma conjunta, ya que el modelo o algoritmo de clasificación seleccionado será aquel que mejor puntuación balanceada obtenga tras la fase de entrenamiento y validación.

Entre los algoritmos de clasificación probados para este proyecto se escogieron 5 modelos que han demostrado ejercer una buena predicción en otras tareas similares de clasificación, los cuales se detallan a continuación:

- **Decision Tree** o árbol de decisión es un modelo que divide los datos en subgrupos más pequeños y homogéneos en función de ciertos criterios, y cada subgrupo se representa por una hoja del árbol que indica la clase de los datos en ese subgrupo. El proceso de ramificación se repite hasta que se alcanza una condición de parada, como un número máximo de niveles o una cantidad mínima de datos en cada subgrupo.
- **Random Forest** es un modelo en el que se crean múltiples árboles de decisión utilizando diferentes subconjuntos de datos y características aleatorias. Cada árbol de decisión en el conjunto de árboles se entrena con

un subconjunto diferente de datos y características, lo que permite obtener una variedad de modelos que combinan la aleatoriedad y la diversidad.

- **SVC** o clasificador basado en máquina de soporte de vectores que tiene como objetivo encontrar el hiperplano que mejor separa dos clases de datos en un espacio de características de alta dimensión. En el caso de la clasificación binaria, este hiperplano es una línea que divide el espacio en dos regiones. Este modelo busca encontrar la línea que maximiza la distancia entre los puntos más cercanos de cada clase, lo que se conoce como “la margen”.
- **KNC** es un proceso de clasificación que comienza con la elección del valor de  $k$ , que es el número de vecinos más cercanos que se utilizarán para determinar la clase de un nuevo punto de datos. Luego, se mide la distancia entre el nuevo punto de datos y todos los demás puntos de datos en el conjunto de entrenamiento. Los  $k$  puntos de datos más cercanos se seleccionan como los vecinos más cercanos.
- **Gaussian Naive Bayes** se construye utilizando una distribución de probabilidad Gaussiana para cada clase. Una vez que se tienen las distribuciones de probabilidad, el modelo puede predecir la clase de una nueva instancia mediante el cálculo de la probabilidad condicional de cada clase dado los valores de las características de la nueva instancia. La clase con la probabilidad condicional más alta se asigna a la instancia.

Para llevar a cabo la fase de entrenamiento y validación se dividieron los embriones en 2 sets de datos: 80% de los datos (21 embriones) se destinaron a la fase de entrenamiento y 20% de los datos (5 muestras) para validar o comprobar la efectividad del modelo en una situación “desconocida”.

Durante la etapa de entrenamiento se lleva a cabo la fase de aprendizaje, que se completa utilizando la técnica de “Cross Validation”. Gracias a ella se divide la fase de entrenamiento en 5 sub-fases (CV=5), y cada una de ellas incluye un entrenamiento y validación. De esta forma, la construcción del modelo es mucho más robusta, ya que de manera aleatoria se selecciona un 20% de los datos para una validación interna. El valor de puntuación es una media de todos los valores de puntuación (Balanced Score) obtenidos en cada una de las vueltas o “folds” del Cross Validation.

Por otro lado, con el objetivo de establecer los mejores hiper-parámetros del modelo, se ha hecho uso de la función GridSearchCV, en la que se puede realizar de manera automática todas las combinaciones de hiper-parámetros seleccionados y devolver los que mejores resultados arrojan.

La totalidad de la fase de entrenamiento se ha realizado con la librería SciKit-Learn de Python.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Muestra poblacional

La población de pacientes reclutada para participar en el proyecto consta de 84 parejas, en las que se incluyen 93 ciclos de reproducción asistida (algunas pacientes llevaron a cabo más de un ciclo durante su tratamiento), utilizando tanto ovocitos pertenecientes a la paciente (*ovocitos propios*), un 57% de las parejas (48), como ovocitos pertenecientes a una donante anónima (*ovocitos donados*), un 43% de las parejas (36), y 11 de las parejas utilizaron semen de donante para llevar a cabo su tratamiento (**Tabla 9**).

#### 5.1.1. Dotación cromosómica de los embriones

De los 93 ciclos seleccionados (cada ciclo hace referencia a una sola punción, incluyendo todos los embriones que se generen en ella), se realizó la biopsia en un total de 497 embriones, obteniendo 249 embriones euploides de los cuales se transfirieron 134 embriones, que son los que se han incluido en este trabajo.

Al analizar el origen de los ovocitos de todos los embriones biopsiados, se observó que los embriones que provenían de ovocitos propios mostraban una diferencia significativa en cuanto a la euploidía que presentaban comparados con los embriones que provenían de ovocitos donados, como se detalla a continuación en la **Tabla 8**.

**Tabla 8.** Contingencia de la dotación cromosómica de los embriones obtenidos a partir de ovocitos propios o donados.

		Dotación Cromosómica		
		Euploides	Aneuploides y mosaicos	Total
Origen de los embriones	Ovocitos donados (54,7%)	56,4% (127) *	43,5% (98)	225
	Ovocitos propios (45,3%)	44,8% (122)	55,1% (150)	272
Total		249 (134 transferidos)	248	497
		497		

Prueba de Fisher.  $P\text{-value} = 0,016$ .

\*A (B), donde "A" es el porcentaje y "B" la N total

Tabla 9. Datos clínicos de los pacientes que participaron en el estudio.

Código paciente	Edad madre	Edad padre	Edad donante <sup>1</sup>	Tipo de Transferencia: Embrión transferido <sup>2</sup>	Calidad embrionaria <sup>3</sup>	Resultado Beta <sup>4</sup>	Resultado Final <sup>5</sup>	Éxito final por pareja <sup>6</sup>
P1	37	44	23	DET: P1E12+P1E9	BE AA + BE AA	+	RNV	RNV
P2	40	40	PROPIOS	SET: P2E2	BE AA	-	-	NO RNV
P3	32	39	PROPIOS	SET: P3E5	BH BA	+	RNV	RNV
P4	39	46	PROPIOS	SET: P4E3	BE AA	+	BQ	NO RNV
P5	43	48	20	SET: P5E12; DET: P5E13+P5E16; SET: P5E4	BH BA; BT C + BH BC; BC BB	-; +; -	-; BQ; -	NO RNV
P6	40	DONANTE	27	SET: P6E13	BH BB	-	-	NO RNV
P7	40	44	PROPIOS	DET: P7E7+P7E8	BH BC + BH BC	+	RNV	RNV
P8	40	43	PROPIOS	SET: P8E5;P8E9	BC BB; BE AA	+; +	AB; RNV	RNV
P9	40	47	PROPIOS	SET: P9E2	BE AA	+	RNV	RNV
P10	34	36	PROPIOS	SET: P10E17	BE AA	+	RNV	RNV
P11	40	42	PROPIOS	SET: P11E5	BE AA	+	RNV	RNV
P12	50	52	20	SET: P12E18; P12E2; P12E4	BE AA; BE AB; BEAB	+; +; -	BQ; AB; -	NO RNV
P13	36	38	26	SET: P13E6	BE BC	+	RNV	RNV
P14	40	DONANTE	PROPIOS	SET: P14E1	BE AA	+	RNV	RNV
P15	39/42*	52/55	PROPIOS	SET: P15E1; P15E4	BE AA; BE CC	+; -	RNV; -	RNV
P16	36/37*	36/37	PROPIOS	SET: P16E4; P16E5	BE AA; BE AA	-; -	-; -	NO RNV
P17	44	37	20	SET: P17E1; P17E9	BH AA; BE AA	-; +	-; RNV	RNV
P18	34	37	PROPIOS	SET: P18E8	BE AA	+	RNV	RNV
P19	36	37	PROPIOS	SET: P19E1	BE CC	+	RNV	RNV
P20	29	29	PROPIOS	SET: P20E2; P20E3	BE AA; BE AA	-; -	-; -	NO RNV
P21	40	DONANTE	PROPIOS	SET: P21E4	BE AA	-	-	NO RNV
P22	37	39	PROPIOS	SET: P22E5	BH AA	+	RNV	RNV
P23	42	35	PROPIOS	SET: P23E2	BE AA	+	RNV	RNV
P24	39	39	PROPIOS	SET: P24E4	BE AA	+	RNV	RNV
P25	45	DONANTE	26	SET: P25E10	BE AA	+	RNV	RNV
P26	47	49	26	SET: P26E2; P26E3	BE AA; BH AA	+; +	AB; BQ	NO RNV
P27	39	41	PROPIOS	SET: P27E1; DET: P27E3+P27E6	BH BB; BE AA + BE AA	-; +	-; BQ	NO RNV

Continúa

RESULTADOS

Código paciente	Edad madre	Edad padre	Edad donante <sup>1</sup>	Tipo Transferencia: embriones transferidos <sup>2</sup>	Calidad embrionaria <sup>3</sup>	Resultado Beta <sup>4</sup>	Resultado Final <sup>5</sup>	Éxito final por pareja <sup>6</sup>
P28	40	DONANTE	PROPIOS	SET: P28E12; P28E5	BE AB; BE AA	-; +	-; RNV	RNV
P29	42	44	25	SET: P29E14; P29E3	BE AB; BH BB	-; -	-; -	NO RNV
P30	37	31	PROPIOS	DET: P30E1+P30E3; SET: P30E4	BE BB + BEAA; BE CC	+; -	BQ; -	NO RNV
P31	40	37	PROPIOS	SET: P31E3	BE AA	+	RNV	RNV
P32	38	40	PROPIOS	SET: P32E2	BE BB	-	-	NO RNV
P33	39	39	26	SET: P33E1; P33E8	BE AA; BE AA	-; +	-; RNV	RNV
P34	35	38	PROPIOS	SET: P34E17	BH AB	+	RNV	RNV
P35	33	49	PROPIOS	DET: P35E6+P35E7	BE AA + BE AA	-	-	NO RNV
P36	33	34	PROPIOS	DET: P36E1+P36E10; SET: P36E11; P36E4; P36E5; P36E6; P36E7	BEAA+BEAA; BEBB; BEBB; BEAC; BEBB; BEAB	-; -;-; -;-;-	-; -;-; ;-;-;-	NO RNV
P37	39	41	PROPIOS	SET: P37E1	BE AB	+	RNV	RNV
P38	43	44	18	SET: P38E2; P38E3	BEAB; BEAB	+; +	RNV; AB	RNV
P39	43	29	PROPIOS	SET: P39E2	BE AA	-	-	NO RNV
P40	33	33	PROPIOS	SET: P40E2	BE BB	-	-	NO RNV
P41	35	35	PROPIOS	SET: P41E5	BE AA	+	RNV	RNV
P42	31	30	PROPIOS	SET: P42E2	BC AA	+	RNV	RNV
P43	34	37	PROPIOS	SET: P43E7	BE AA	+	RNV	RNV
P44	30	32	PROPIOS	SET: P44E5	BC AB	-	-	NO RNV
P45	46	41	25	SET: P45E3; P45E8	BH AB; BE AB	+; -	AB; -	NO RNV
P46	28	38	PROPIOS	SET: P46E7	BE AB	+	RNV	RNV
P47	40	51	29	SET: P47E5	BE AB	+	RNV	RNV
P48	37/39*	42/44	24	SET: P48E12; P48E9; P48E11	BE AA; BE BB; BE AA	+; -; +	RNV; -; RNV	RNV
P49	39	43	PROPIOS	DET: P49E3+P49E4	BE AA+BE AA	-	-	NO RNV
P50	41	43	PROPIOS	SET: P50E11; P50E2	BE BB; BE AA	+; -	RNV; -	RNV
P51	40	40	PROPIOS	SET: P51E3	BEAA	+	AB	NO RNV
P52	27	30	19	DET: P52E10+ P52E6	BEAA + BEAA	+	RNV	RNV
P53	38	44	20	SET: P53E14; P53E2	BEBB; BEAB	-;-	-;-	NO RNV
P54	45	36	21	DET: P54E1+P54E9	BEBB+BE AC	+	RNV	RNV
P55	36	45	PROPIOS	DET: P55E12+P55E2	BEAB+BEBB	+	BQ	NO RNV
P56	50	51	28	SET: P56E3; P56E4; P56E9	BEAB; BEAA; BEAA	-; +; +	-; AB; BQ	NO RNV
P57	37	49	PROPIOS	SET: P57E7	BEAA	+	BQ	NO RNV
P58	33	DONANTE	18	DET: P58E1+P58E12	BEAB+BEAA	+	RNV	RNV

Código paciente	Edad madre	Edad padre	Edad donante <sup>1</sup>	Tipo Transferencia: embriones transferidos <sup>2</sup>	Calidad embrionaria <sup>3</sup>	Resultado Beta <sup>4</sup>	Resultado Final <sup>5</sup>	Éxito final por pareja <sup>6</sup>
P59	38	DONANTE	PROPIOS	SET: P59E4	BE AA	-	-	NO RNV
P60	37	39	PROPIOS	SET: P60E4	BE AA	+	RNV	RNV
P61	43	DONANTE	PROPIOS	SET: P61E3	BH AA	+	RNV	RNV
P62	42	41	19	SET: P62E8	BE AA	+	RNV	RNV
P63	32	DONANTE	21	SET: P63E9	BE AA	-	-	NO RNV
P64	29	31	PROPIOS	SET: P64E3	BE AA	+	RNV	RNV
P65	43	40	19	SET: P65E8	BE BB	+	BQ	NO RNV
P66	46	35	24	SET: P66E7	BE AB	+	RNV	RNV
P67	46	44	22	SET: P67E2	BE AA	+	BQ	NO RNV
P68	45	42	20	SET: P68E6; P68E9	BH AA; BH AA	-; -	-; -	NO RNV
P69	36	34	20	SET: P69E7	BH BB	-	-	NO RNV
P70	36	36	PROPIOS	SET: P70E3	BE AB	+	RNV	RNV
P71	38	41	PROPIOS	<b>DET: P71E1+P71E11</b>	BHAA+BEAA	-	-	NO RNV
P72	39	36	20	SET: P72E2; P72E8	BEAA; BEAA	+; -	RNV; -	RNV
P73	36	37	PROPIOS	SET: P73E3	BE AA	+	RNV	RNV
P74	30	30	PROPIOS	SET: P74E1; P74E3	BEAA; BEAA	+; -	RNV; -	RNV
P75	44	48	25	SET: P75E1; P75E7; P75E9	BEAA; BEBB; BEAA	-;+;-	-;RNV;-	RNV
P76	51	46	24	SET: P76E3	BE AA	-	-	NO RNV
P77	41	37	21	<b>DET: P77E16+P77E17</b>	BEAA+BEAA	+	RNV	RNV
P78	38	33	29	SET: P78E10	BEAA	+	BQ	NO RNV
P79	49	45	18	SET: P79E5; P79E11	BEAA; BEAA	-; +	-; BQ	NO RNV
P80	38	33	PROPIOS	SET: P80E1	BEAA	+	RNV	RNV
P81	37	36	PROPIOS	SET: P81E1	BEAA	+	RNV	RNV
P82	32	DONANTE	PROPIOS	SET: P82E4	BEAA	-	-	NO RNV
P83	34	DONANTE	27	SET: P83E2	BC BB	+	RNV	RNV
P84	41	41	23	<b>DET: P84E2+P84E4;</b> SET: P84E5	BEAA+BEAA; BEAA	- ; -	- ; -	NO RNV

<sup>1</sup>Edad de las donantes en los casos de tratamiento de ovodonación, o la indicación de PROPIOS si se han utilizado los ovocitos de la madre o receptora.

<sup>2</sup>Tipo de transferencia realizada: **DET**= transferencia de 2 embriones A+B (**en negrita**); SET= transferencia de un solo embrión. Cada transferencia está separada por punto y coma “;”.

<sup>3</sup>Clasificación según criterios de ASEBIR (BE=Blastocisto Expandido, BC=Blastocisto Cavitado, BH=Blastocisto en Eclosión (*Hatching* en inglés), BT=Blastocisto Temprano. Las dos iniciales siguientes indican primero la calidad de la masa celular interna y segundo el trofoectodermo (“BE AB”: Blastocisto expandido con MCI calidad A y TE calidad B).

<sup>4</sup>Resultado del análisis de la beta-hCG en sangre por transferencia. Resultado positivo (+), > 5mUI/mL, o negativo (-).

<sup>5</sup>Resultado final del embarazo por transferencia (“RNV” = recién nacido vivo, “-“= negativo, “BQ” = bioquímico, “AB” = aborto primer trimestre).

<sup>6</sup>Resultado de embarazo por pareja logrado = RNV o fracasado = no RNV.

(\*) Pacientes que realizaron más de un ciclo de RA se indica las diferentes edades en las que se llevaron a cabo separados por una barra diagonal “/”.

### 5.1.2. Clasificación de los embriones

Cada embrión fue catalogado de forma individual como positivo o negativo, según los resultados de la medición de  $\beta$ -hCG; o como “recién nacido vivo” (RNV), “negativo” (-), “bioquímico” (BQ) o “aborto” (AB) si se tenía en cuenta toda la evolución del embarazo. De esa forma aquellos casos en los que se realizaba una doble transferencia con resultado clínico positivo o negativo, se consideraba cada embrión de forma individual como 2 embriones positivos o 2 embriones negativos. Los negativos, bioquímicos y abortos se han englobado en el grupo de los “no recién nacidos vivos” con el fin de analizar el éxito final del tratamiento (no RNV) (**Tabla 10**).

**Tabla 10.** Descripción de los resultados clínicos por embrión

Resultado Beta		Resultado Final			
% (N)		% (N)			
Positivos	58,2% (78)	RNV	40,3% (54)		
		Bioquímico	12,7% (17)	NO RNV	59,7% (80)
		Aborto	5,2% (7)		
Negativos	41,8% (56)	Negativos	41,8% (56)		

En la **Tabla 9** se pueden consultar los resultados clínicos tras la transferencia embrionaria. Como algunas de las transferencias fueron dobles (2 embriones o *DET*), en concreto 15 de ellas, el total de transferencias realizadas fue de 119; y de las 15 transferencias múltiples, 6 de ellas fueron positivas, correspondiendo en su totalidad a gestaciones múltiples obteniendo 2 recién nacidos vivos, y el resto negativas.

El máximo número de transferencias realizadas por paciente fue de 6.

De los 134 embriones transferidos, 62 de ellos correspondían a embriones donados y 72 a embriones propios. Al considerar tanto el resultado de la medición de la  $\beta$ -hCG como el resultado clínico final de todos los embriones en función del origen ovocitario (propio o donado), no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas mediante la prueba exacta de Fisher (test de Fisher) (**Tabla 11**).

**Tabla 11.** Contingencia de la  $\beta$ -hCG y los RNV con relación al origen de los ovocitos

	Beta – N (%)	Beta + N (%)	No RNV N (%)	RNV N (%)
Ovocitos donados	25 (18,7)	37 (27,6)	39 (29,1)	23 (17,2)
Ovocitos propios	31 (23,1)	41 (30,6)	41 (30,6)	31 (23,1)

Test de Fisher

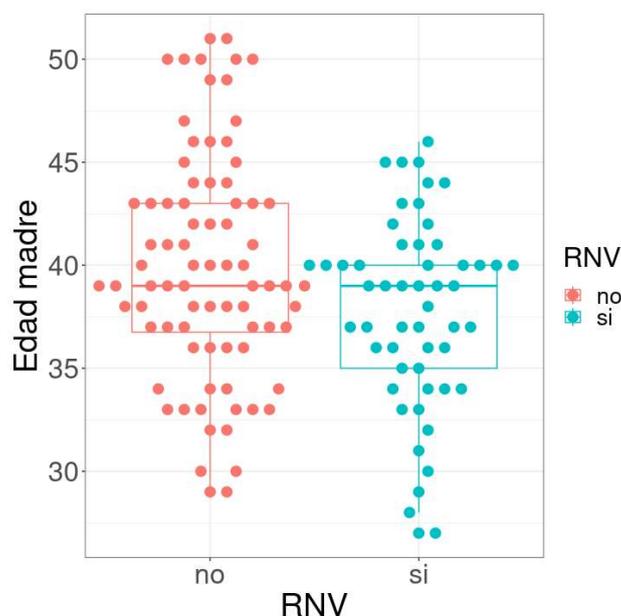
P-value (Beta)= 0,86

P-value (RNV)= 0,60

Finalmente, el porcentaje de las parejas que consiguieron el éxito en el embarazo después de todas las transferencias realizadas a lo largo del proyecto fue del 56%, cuyos datos se reflejan en la última columna de la **Tabla 10**.

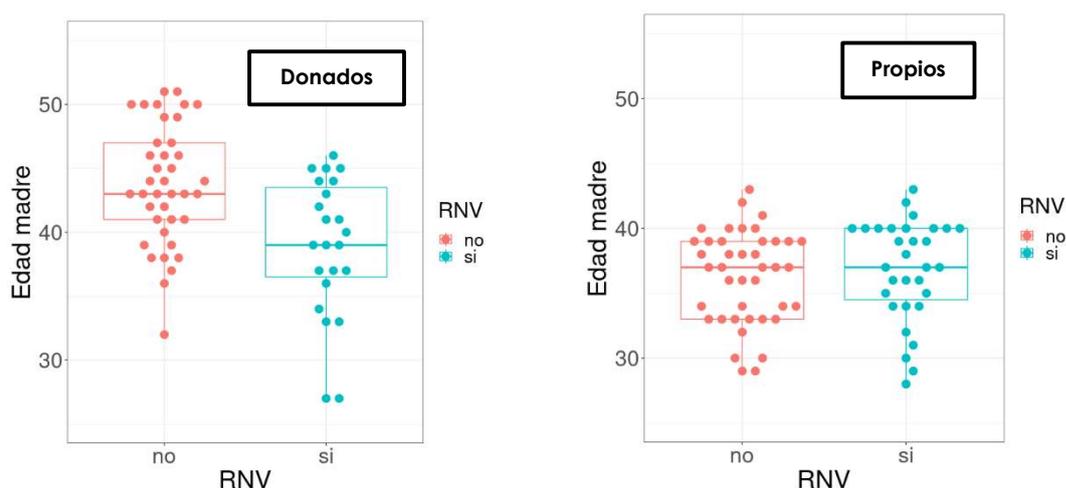
### 5.1.3. Rango de edades en las receptoras

La edad de las receptoras en el momento de la transferencia presentaba una media de 38 años, y se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en cuanto al rango de edades en las que se obtenían gestaciones evolutivas frente a las que no, siendo menor el porcentaje de RNV en el grupo con mayor rango de edad. La media de edad del grupo de los RNV era de  $37,7 \pm 4,7$  años frente a la media de  $39,9 \pm 5,6$  años que presentaba el grupo de los no RNV (n de RNV= 54, n de no RNV= 80) (**Figura 27**).



**Figura 27.** Representación de rango de edades en función del resultado clínico RNV. Prueba T-Student con P-value=0.014.

Al separar los resultados en función de la procedencia del ovocito (propio o donado), la diferencia es más evidente en el grupo de ovocitos donados, donde es mayor, estadísticamente significativa, la media de edad del grupo de no RNV (43,7±4,7 años), respecto a RNV (38,9±5,4 años). Sin embargo, en el grupo de ovocitos de origen propio, la diferencia no es significativa, siendo la media de edad de no RNV de 36,3±3,6 años y RNV 36,8±3,9 años (**Figura 28**).



**Figura 28.** Representación de rango de edades según la procedencia de gameto femenino  
Prueba T-Student con P-value (donados)=0,0009 y P-value (propios)=0,54

## 5.2. Análisis *in silico* de genes de interés

En la **Tabla 5** (apartado de material y métodos 4.6.1.) se muestran los 27 genes detallando su código genético, el valor pLI que define la haploinsuficiencia, la región amplificada del gen conforme a la secuencia del genoma humano GRCh37/hg19, la localización del polimorfismo deletéreo, los fenotipos más característicos que presenta el modelo homocigoto KO en ratón de cada gen, y la referencia (DOI) de su artículo científico. La falta de expresión de cada uno de los genes escogidos para el estudio provoca muerte embrionaria, dando prioridad a la que ocurre durante el periodo cercano a la implantación.

En aquellos genes en los que el modelo KO de ratón no estaba disponible en la base de datos de “*Mouse Genome Database*” (MGI) (<https://www.informatics.jax.org>), se consideraron las referencias del consorcio IMPC (*International Mouse Phenotyping Consortium*)

(<https://www.mousephenotype.org/>) para describir el fenotipo correspondiente, como es el caso del gen RFT1.

### 5.3. Análisis de resultados y selección de marcadores polimórficos.

Para la selección de mutaciones potencialmente deletéreas se estudió cada mutación, su localización y su posible efecto dañino sobre los embriones. Para ello:

- Las mutaciones detectadas en homocigosis en embriones que dieron lugar a un RNV se catalogaron como no dañinas, por lo que también fueron descartadas en los embriones negativos (recogidas en **Anexo 1**).
- Se descartaron las mutaciones sinónimas, es decir, aquellas en las que el cambio de base en su ADN no produce un cambio de aminoácido en la proteína final, por lo que no se consideran potencialmente dañinas.
- Se descartaron todas las mutaciones intrónicas que entraban dentro del rango de la secuenciación, a excepción de las que se localizaban en las zonas de empalme (en inglés *splicing site*) o en zonas de regulación de la expresión (UTR 3' y 5').
- Se seleccionaron las mutaciones en homocigosis que producían un codón de terminación prematuro o cambio en el patrón de lectura.
- Se seleccionaron las mutaciones en homocigosis de cambio de aminoácido en la proteína final que cumplían los requisitos del algoritmo de filtrado IMHOTEP (del inglés *Integrating Molecular Heuristics and Other Tools for Effect Prediction*), basado en un árbol de toma de decisiones a partir de otros predictores de malignidad popularmente utilizados: MutationTaster2, MutPred, FATHMM y PolyPhen-2 (Knecht et al., 2017).

### 5.4. Análisis de mutaciones

#### 5.4.1. Tipo de mutaciones

Antes de proceder al análisis y filtrado de las mutaciones para identificar aquellas deletéreas y no deletéreas en el desarrollo embrionario temprano, se clasificaron los distintos tipos de mutaciones detectadas en los embriones en función de su manifestación a nivel genético (**Tabla 12**).

**Tabla 12.** Clasificación de las mutaciones en función de su manifestación a nivel genético

Naturaleza	Mutaciones	RNV Homocigotos <sup>1</sup>	no RNV Homocigotos <sup>2</sup>	% mutaciones	% RNV Homocigotos	% no RNV Homocigotos
<b>Intrónicas</b>	377	31	43	44,8	47,0	45,3
<b>utr_3</b>	123	12	23	14,6	18,2	24,2
<b>Missense</b>	166	6	10	19,7	9,1	10,5
<b>Sinónimas</b>	90	10	10	10,7	15,2	10,5
<b>utr_5</b>	25	3	4	3,0	4,5	4,2
<b>Aguas arriba</b>	21	4	3	2,5	6,1	3,2
<b>Aguas abajo</b>	6	0	1	0,7	0,0	1,1
<b>Marco de lectura/delección</b>	18	0	1	2,1	0,0	1,1
<b>Sin sentido</b>	9	0	0	1,1	0,0	0,0
<b>Zona de empalme_3</b>	4	0	0	0,5	0,0	0,0
<b>Zona de empalme_5</b>	2	0	0	0,2	0,0	0,0
<b>Marco de lectura/inserción</b>	1	0	0	0,1	0,0	0,0
<b>Total</b>	842	66	95	100%	100%	100%

<sup>1</sup>RNV Homocigotos se refiere a los embriones con resultado positivo o recién nacido vivo y la mutación en homocigosis.

<sup>2</sup>no RNV Homocigotos se refiere a los embriones con resultado negativo, bioquímico o aborto y la mutación en homocigosis.

Se registraron un total de 842 mutaciones, la mayoría aparentemente inocuas, es decir que correspondían a zonas intrónicas, UTR, aguas arriba/aguas abajo y sinónimas (76,3%).

No hay diferencias estadísticamente significativas con relación al tipo de mutación que presentan los embriones que dieron lugar a RNV frente a las de no RNV, aunque el número de mutaciones totales encontradas en positivos homocigotos (RNV) es ligeramente menor al de las encontradas en negativos homocigotos (no RNV) (66 vs 95, respectivamente).

#### 5.4.2. Mutaciones no deletéreas en el desarrollo embrionario temprano

Para evaluar las mutaciones potencialmente deletéreas en el desarrollo embrionario temprano, lo primero que hicimos fue recopilar todas las mutaciones que aparecían en homocigosis en embriones positivos, y que por lo tanto consideramos como no dañinas con respecto al desarrollo embrionario temprano. Esto nos permitía poder descartarlas en los sucesivos análisis de embriones negativos, bioquímicos, o que hubiesen resultado en aborto.

Al final del estudio compusimos un listado de 66 mutaciones que nombramos como “no deletéreas”, y que se pueden consultar en el **Anexo 1**.

#### 5.4.3. Mutaciones potencialmente deletéreas en el desarrollo embrionario temprano

Después de proceder al filtrado de las mutaciones potencialmente deletéreas para el desarrollo temprano siguiendo los criterios explicados en el apartado de material y métodos, obtuvimos 5 polimorfismos presentes en embriones negativos (incluyendo negativos, bioquímicos y aborto). Tres de ellos pertenecen al gen *F2*, uno al gen *PIKFYVE* y otro al gen *RAE1* (**Tabla 13**).

Todos los polimorfismos aparecen en homocigosis excepto *RAE1*, que al tener un valor pLI de 1, podría actuar ejerciendo un efecto dominante negativo sobre el mismo.

Las mutaciones de los genes *PIKFYVE* y *RAE1* corresponden a cambio del marco de lectura introduciendo un codón stop prematuro, y las otras 3 mutaciones del gen *F2* son de cambio de aminoácido.

**Tabla 13.** Descripción de mutaciones potencialmente deletéreas en el desarrollo embrionario temprano

Gen	pLI <sup>1</sup>	Embriones portadores <sup>2</sup>	Genotipo	Cambio genómico <sup>3</sup>	Cambio proteico <sup>4</sup>	Resultado clínico
<b>PIKFYVE</b>	0	P4E3	Homocigoto	chr2:209179025A>*	Frameshift Deletion p.Leu568fs	BQ
<b>F2</b>	0	P5E12	Homocigoto	chr11:46749646C>T	Missense p.Pro411Ser	-
		P33E1	Homocigoto	chr11:46750236A>T	Missense p.Ile441Leu	-
		P4E3	Homocigoto	chr11:46751102T>A	Missense p.Phe549Ile	BQ
<b>RAE1</b>	1	P4E3	Heterocigoto	chr20:55941902C>*	Frameshift Deletion p.Pro139fs	BQ

<sup>1</sup>pLI mide la intolerancia a la pérdida de función considerando un gen haploinsuficiente si  $pLI \geq 0.9$  y tolerante si  $pLI \leq 0.1$ .

<sup>2</sup>Código de embriones "PXEY", donde PX es el número de paciente y EY el número de embrión correspondiente.

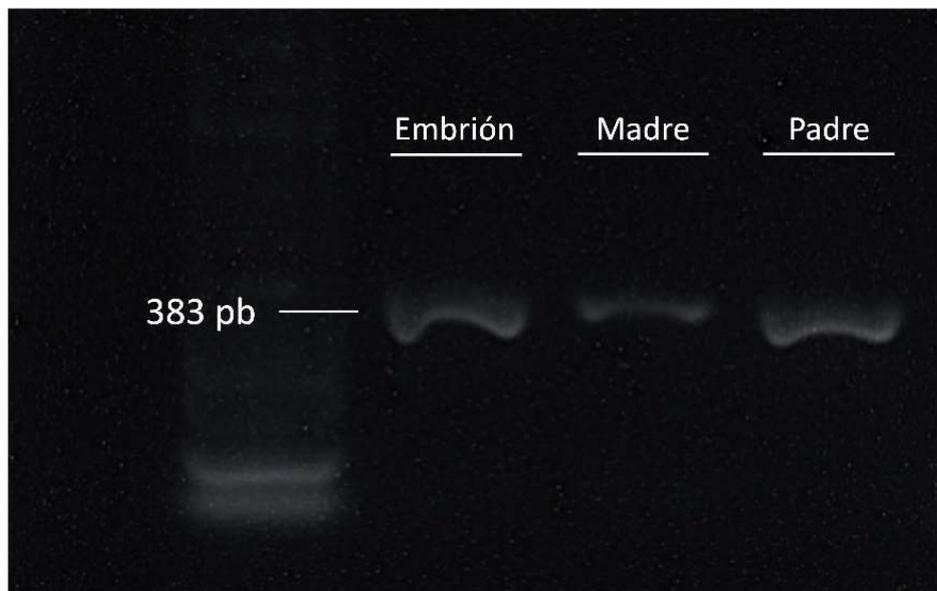
<sup>3</sup>Localización del cambio genómico. A>B, donde A es el nucleótido de referencia y B el nucleótido detectado. "\*" hace referencia a la delección del nucleótido de referencia.

<sup>4</sup>Los cambios de la secuencia proteica están nombrados en inglés como *Frameshift, Deletion*: mutación con cambio de marco de lectura (en este caso por delección del nucleótido de referencia), *Missense*: mutación con cambio de sentido (cambio del nucleótido de referencia)

5.4.4. Detección del polimorfismo chr2:209179025A>\* del gen *PIKFYVE* mediante PCR convencional y secuenciación de Sanger a partir las muestras de ADN embrionario y progenitores

Para validar los resultados y verificar las lecturas obtenidas tras la NGS del embrión P4E3 (mutación chr2:209179025A>\* en homocigosis), se procedió a la amplificación de la muestra de ADN embrionaria mediante la técnica PCR convencional, incluyendo el ADN procedente de los hisopos bucales de sus progenitores recogidos en una de las fases del proyecto *Embryogene*.

Al revelar las muestras de PCR en el gel de agarosa, se detectó señal positiva en las tres calles correspondiente al ADN embrionario y progenitores paterno y materno (**Figura 29**).



**Figura 29.** PCR convencional de la región que incluye el polimorfismo chr2:209179025A>\* del gen *PIKFYVE* sobre las muestras del embrión P4E3 y sus progenitores.

Posteriormente se secuenciaron las muestras mediante la técnica Sanger, detectándose el genotipo mutado únicamente en el embrión y en heterocigosis, a diferencia de lo detectado por el panel Ampliseq. Sin embargo, el genotipo de los progenitores no presentaba dicha mutación (**Figura 30**).



**Figura 30.** Cromatograma de secuenciación de Sanger correspondiente al ADN de los progenitores (arriba) y del embrión P4E3 (abajo) incluyendo el polimorfismo chr2:209179025A>\* de PIKFYVE.

#### 5.4.5. Otras mutaciones potencialmente deletéreas en el desarrollo embrionario temprano presentes en embriones negativos.

Las mutaciones recogidas en la **Tabla 14** se han descrito, según los predictores bioinformáticos, como potencialmente peligrosas cuando se presentan en homocigosis. Sin embargo, en el presente estudio, han sido detectadas en heterocigosis, aunque el resultado de la transferencia ha sido negativo.

**Tabla 14.** Descripción de mutaciones potencialmente deletéreas cuando aparecen en homocigosis.

Gen	pLI <sup>1</sup>	Embriones portadores	Genotipo	Cambio genómico <sup>2</sup>	Cambio proteico <sup>3</sup>	Resultado clínico
<b>NR5A2</b>	0,24	P36E11	Heterocigosis	chr1:200017554T>*	Frameshift Deletion p.Phe240fs	-
		P20E2	Heterocigosis	chr1:200080331T>*	Frameshift Deletion p.Asp372fs	-
<b>RFT1</b>	0	P75E1	Heterocigosis	chr3:53164412C>T	Missense p.Gly2Asp	-
<b>ABCA1</b>	0	P36E11	Heterocigosis	chr9:107546660A>G	Missense p.Val2241Ala	-
		P20E2	Heterocigosis	chr9:107550322G>A	Missense p.Ala2028Val	-
		P57E7	Heterocigosis	chr9:107550766T>C	Missense p.Arg2004Gly	BQ
		P50E2	Heterocigosis	chr9:107555450A>G	Splice Site	-
		P30E1	Heterocigosis	chr9:107562834A>T	Nonsense p.Leu1577Ter	BQ
		P29E3	Heterocigosis	chr9:107564342A>G	Missense p.Leu1564Pro	-
		P15E4	Heterocigosis	chr9:107568555A>T	Nonsense p.Cys1477Ter	-
		P74E3	Heterocigosis	chr9:107568654G>*	Frameshift Deletion p.Ile1445fs	-
		P56E4	Heterocigosis	chr9:107578618C>T	Missense p.Ala1182Thr	AB
		P82E4	Heterocigosis	chr9:107581959C>*	Frameshift Deletion p.Gly1050fs	-
		P56E9	Heterocigosis	chr9:107582262G>*	Frameshift Deletion p. p.Leu1017fs	BQ
		P27E1	Heterocigosis	chr9:107584807C>*	Frameshift Deletion p.Gly933fs	-
		P29E3	Heterocigosis	chr9:107586755T>*	Frameshift Deletion p.Ile883fs	-

Gen	pLI <sup>1</sup>	Embriones portadores	Genotipo	Cambio genómico <sup>2</sup>	Cambio proteico <sup>3</sup>	Resultado clínico
<b>ABCA1</b>	0	P45E3	Heterocigosis	chr9:107591422G>*	Splice Site	AB
		P36E10	Heterocigosis	chr9:107593999C>*	Frameshift Deletion p.Gly540fs	-
		P4E3	Heterocigosis	chr9:107602723G>*	Frameshift Deletion p.Thr298fs	BQ
<b>RFK</b>	0,06	P2E2	Heterocigosis	chr9:79002397C>T	Missense p.Arg129Gln	-
<b>KMT2A</b>	1	P35E7	Heterocigosis	chr11:118373179G>A	Missense p.Arg2191Gln	-
<b>F2</b>	0	P2E2	Heterocigosis	chr11:46744793T>*	Frameshift Deletion p.Ile127fs	-
		P53E2	Heterocigosis	chr11:46747515G>*	Frameshift Deletion p.Arg224fs	-
		P28E12	Heterocigosis	chr11:46749544A>T	Splice Site	-
		P33E1	Heterocigosis	chr11:46750213G>*	Splice Site	-
		P36E4	Heterocigosis	chr11:46760932A>T	Nonsense p.Lys615Ter	-
<b>GDF3</b>	0	P56E9	Heterocigosis	chr12:7842840G>T	Nonsense p.Cys243Ter	BQ
<b>MYO18A</b>	0.99	P36E5	Heterocigosis	chr17:27446450T>C	Missense p.Met578Val	-

<sup>1</sup>pLI mide la intolerancia a la pérdida de función considerando un gen haploinsuficiente si pLI≥0.9 y tolerante si pLI≤0.1.

<sup>2</sup>Código de embriones "PX EY", donde PX es el código del paciente y EY el código del embrión correspondiente.

<sup>3</sup>Localización del cambio genómico. A>B, donde A es el nucleótido de referencia y B el nucleótido detectado. "\*" deleción del nucleótido de referencia.

<sup>4</sup>Los cambios de la secuencia proteica están nombrados en inglés como *Frameshift Deletion*: mutación con cambio del marco de lectura por deleción, *Missense*: mutación con cambio de sentido, *Nonsense*: mutación sin sentido, esta mutación produce un codón stop en la proteína, que viene indicado con las siglas "Ter" de terminación, *Splice Site*: mutación localizada en un sitio de empalme.

#### 5.4.6. Otros hallazgos de interés

En la **Tabla 15** se han recogido aquellos polimorfismos que aparecen como deletéreos en homocigosis según la base de datos de gnomAD, o que no han sido descritos hasta la fecha, identificados en embriones heterocigotos que han obtenido un resultado de  $\beta$ -hCG positivo, indicando que la presencia del polimorfismo en una sola copia del gen no estaría relacionada con el fallo de implantación del embrión.

Se han encontrado mutaciones en varios embriones no hermanos, como la localizada en rs1060499568 del gen *MMACHC* (mutación por cambio del marco de lectura por inserción chr1:45973216\*>A) que aparece en 2 embriones; o la localizada en rs185366134 del gen *RFT1* (mutación por pérdida de sentido chr3:53164412C>T) presente en 4 embriones no hermanos.

El valor pLI en todos ellos no supera el 0.9, exceptuando la mutación del gen *MYO18A* cuyo embrión no ha sufrido ningún efecto negativo en su evolución al perder una copia del gen, dato incoherente con su categoría de haploinsuficiencia.

Se exponen 2 casos de embriones homocigotos para una mutación con cambio de sentido en el gen *ABCA1* (chr9:107646709T>C) y otra en el gen *F2* (chr11:46750995C>T) sin predicción bioinformática de carácter deletéreo con resultado negativo.

Por último, en la **Tabla 16** se han recogido aquellos embriones con resultado clínico negativo que presentaban más de una mutación potencialmente deletérea.

**Tabla 15.** Polimorfismos catalogados como deletéreos en homocigosis (gnomAD) o sin previa descripción en gnomAD, localizados en embriones heterocigotos que han evolucionado hacia  $\beta$ -hCG positiva

Gen	pLI	Embriones portadores	Genotipo	Cambio genómico	Cambio proteico	Resultado clínico
<b>NR5A2</b>	0,24	P37E1	Heterocigoto	chr1:200008822C>A	Missense p.Pro34His	RNV
	0,24	P38E3	Heterocigoto	chr1:200014707T>C	Missense p.Leu153Pro	RNV
	0,24	P77E16	Heterocigoto	chr1:200080447C>T	Nonsense p.Gln410Ter	RNV
<b>MMACHC</b>	0	P48E12	Heterocigoto	chr1:45973194TG>*	Frameshift Deletion p.Val83fs	RNV
		P19E1, P23E2	Heterocigoto	chr1:45973216*>A	Frameshift Insertion p.Arg91fs**	RNV
<b>RFT1</b>	0	P19E1, P24E4, P38E2, P54E9	Heterocigoto	chr3:53164412C>T	Missense p.Gly2Asp***	RNV
<b>ABCA1</b>	0	P41E5	Heterocigoto	chr9:107560726C>T	Nonsense p.Trp1699Ter	RNV
	0	P62E8	Heterocigoto	chr9:107568596G>*	Frameshift Deletion p.Gln1464fs	RNV
	0	P38E2	Heterocigoto	chr9:107582217G>A	Nonsense p.Gln1032Ter	RNV
	0	P61E3	Heterocigoto	chr9:107591405A>G	Missense p.Met636Thr	RNV
	0	P25E10	Heterocigoto	chr9:107595010G>A	Nonsense p.Gln452Ter	RNV
	0	P38E2	Heterocigoto	chr9:107599320C>T	Missense p.Glu418Lys	RNV
	0	P41E5	Heterocigoto	chr9:107602726G>*	Frameshift Deletion p.Ser297fs	RNV
	0	P67E2	Homocigoto	chr9:107646709T>C	Missense p.Ile101Val	BQ

Gen	pLI	Embriones portadores	Genotipo	Cambio genómico	Cambio proteico	Resultado clínico
<b>RFK</b>	0,06	P43E7	Heterocigoto	chr9:79002447T>C	Splice Site	RNV
<b>F2</b>	0	P7E8	Heterocigoto	chr11:46740842T>A	Nonsense p.Cys19Ter	RNV
	0	P3E5	Heterocigoto	chr11:46748387G>*	Frameshift Deletion p.Trp377fs	RNV
	0	P31E3	Heterocigoto	chr11:46749647C>T	Missense p.Pro411Leu	RNV
	0	P26E2	Homocigoto	chr11:46750995C>T	Missense p.Ala513Val	AB
<b>RBM19</b>	0	P74E1	Heterocigoto	chr12:114352772A>G	Splice Site	RNV
<b>GDF3</b>	0	P3E5	Heterocigoto	chr12:7842643T>C	Missense p.Asn309Ser	RNV
<b>MYO18A</b>	0,99	P48E11	Heterocigoto	chr17:27446366C>*	Frameshift Deletion p.Asp606fs	RNV

<sup>1</sup>pLI mide la intolerancia a la pérdida de función considerando un gen haploinsuficiente si pLI≥0.9 y tolerante si pLI≤0.1.

<sup>2</sup>Código de embriones “PXEY”, donde PX es el código del paciente y EY el código del embrión correspondiente.

<sup>3</sup>Localización del cambio genómico. A>B, donde A es el nucleótido de referencia y B el nucleótido detectado. “\*” hace referencia a la delección del nucleótido de referencia.

<sup>4</sup>Los cambios de la secuencia proteica están nombrados en inglés como *Frameshift, Deletion*: mutación con cambio del marco de lectura por delección, *Frameshift, Insertion*: mutación con cambio del marco de lectura por inserción, *Missense*: mutación con cambio de sentido, *Nonsense*: mutación sin sentido, *Splice Site* : mutación localizada en un sitio de empalme.

\*\*Mutación patogénica según ClinVar ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/1421/?new\\_evidence=true](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/1421/?new_evidence=true))

\*\*\*Mutación de significado incierto según ClinVar ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/697945/?new\\_evidence=true](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/697945/?new_evidence=true))

Tabla 16. Embriones con más de una mutación potencialmente deletérea identificada

Embrión <sup>1</sup>	Gen	pLI <sup>2</sup>	Genotipo	Cambio genómico <sup>3</sup>	Cambio proteico <sup>4</sup>	Resultado clínico
P2E2	<i>RFK</i>	0,06	Heterocigosis	chr9:79002397C>T	missense p.Arg129Gln	-
	<i>F2</i>	0	Heterocigosis	chr11:46744793T>*	frameshift p.Ile127fs	
P4E3	<i>PIKFYVE</i>	0	Homocigosis	chr2:209179025A>*	frameshift deletion p. Leu568fs	BQ
	<i>F2</i>	0	Homocigosis	chr11:46751102T>A	missense p.Phe549Ile	
	<i>RAE1</i>	1	Heterocigosis	chr20:55941902C>*	frameshift deletion p. Pro139fs	
	<i>ABCA1</i>	0	Heterocigosis	chr9:107602723G>*	frameshift p.Thr298fs	
P20E2	<i>NR5A2</i>	0,24	Heterocigosis	chr1:200080331T>*	frameshift p.Asp372fs	-
	<i>ABCA1</i>	0	Heterocigosis	chr9:107550322G-A	missense p.Ala2028Val	
P29E3	<i>ABCA1</i>	0	Heterocigosis**	chr9:107564342A>G	missense p.Leu1564Pro	-
	<i>ABCA1</i>	0	Heterocigosis**	chr9:107586755T>*	frameshift p.Ile883fs	
P33E1	<i>F2</i>	0	Homocigosis	chr11:46750236A>T	missense p.Ile441Leu	-
	<i>F2</i>	0	Heterocigosis	chr11:46750213G>*	splice site	
P36E11	<i>NR5A2</i>	0,24	Heterocigosis	chr1:200017554T>*	frameshift p.Phe240fs	-
	<i>ABCA1</i>	0	Heterocigosis	chr9:107546660A>G	missense p.Val2241Ala	
P56E9	<i>ABCA1</i>	0	Heterocigosis	chr9:107582262G>*	frameshift p. p.Leu1017fs	BQ
	<i>GDF3</i>	0	Heterocigosis	chr12:7842840G>T	nonsense p.Cys243Ter	

<sup>1</sup> Código de embriones "PX EY", donde PX es el código del paciente y EY el código del embrión correspondiente.

<sup>2</sup> pLI mide la intolerancia a la pérdida de función considerando un gen haploinsuficiente si pLI ≥ 0.9 y tolerante si pLI ≤ 0.1.

<sup>3</sup> Localización del cambio genómico. A>B, donde A es el nucleótido de referencia y B el nucleótido detectado. "\*" deleción del nucleótido de referencia.

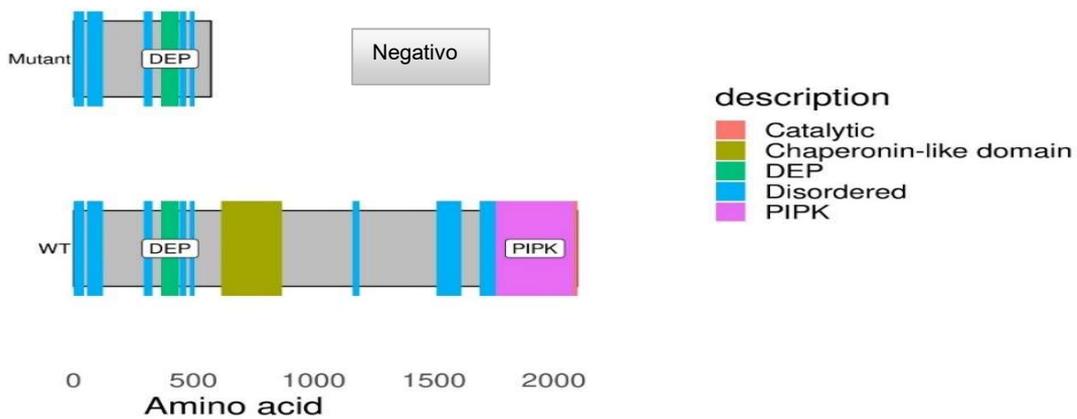
<sup>4</sup> Los cambios de la secuencia proteica están nombrados en inglés como *Frameshift Deletion*: mutación con cambio del marco de lectura por deleción, *Missense*: mutación con cambio de sentido, *Nonsense*: mutación sin sentido, esta mutación produce un codón stop en la proteína, que viene indicado con las siglas "Ter" de terminación, *Splice Site*: mutación localizada en un sitio de empalme.

\*\*Posible Heterocigoto compuesto.

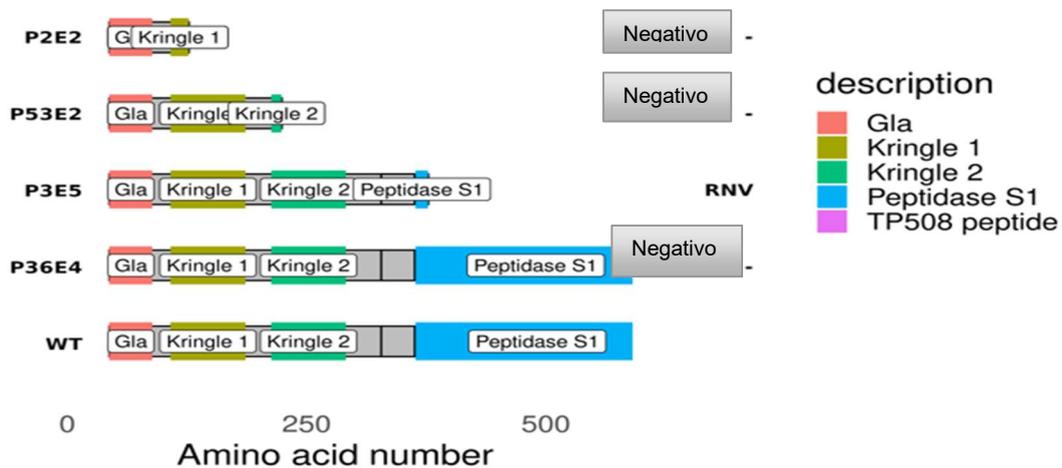
5.4.7. Esquema proteico de las mutaciones relevantes

Algunas de las mutaciones encontradas pueden producir una proteína truncada si apareciesen en homocigosis o heterocigosis con haploinsuficiencia. En este grupo incluiríamos todas aquellas con una alteración proteica tipo cambio de marco de lectura o mutación sin sentido.

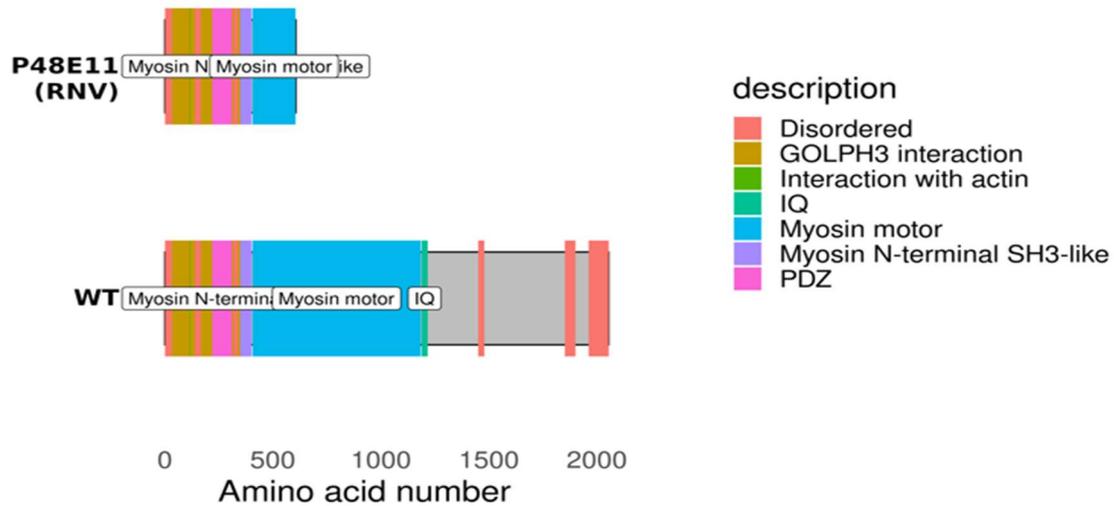
Conforme a nuestros resultados, los genes *PIKFYVE*, *F2*, *MMACHC*, *MYO18A*, *ABCA1*, *RAE1*, *NR5A2* y *GDF3* presentan este tipo de mutación, por lo que a continuación, se ha representado de forma gráfica la proteína WT y cómo sería la potencialmente mutada según su localización. Para ello se ha tenido en cuenta la localización de sus dominios según la base de datos de Uniprot (**Figura 31 a 37**).



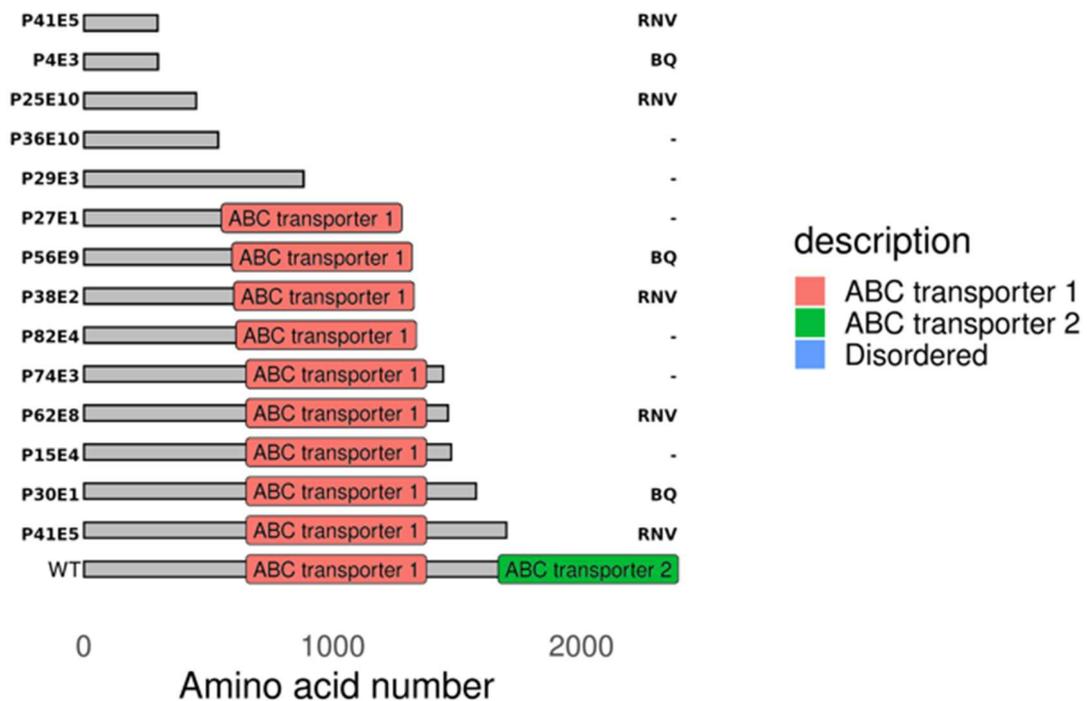
**Figura 31.** Esquema proteico del gen PIKFYVE (WT) y su mutante (mutant) (Brennan, 2018)



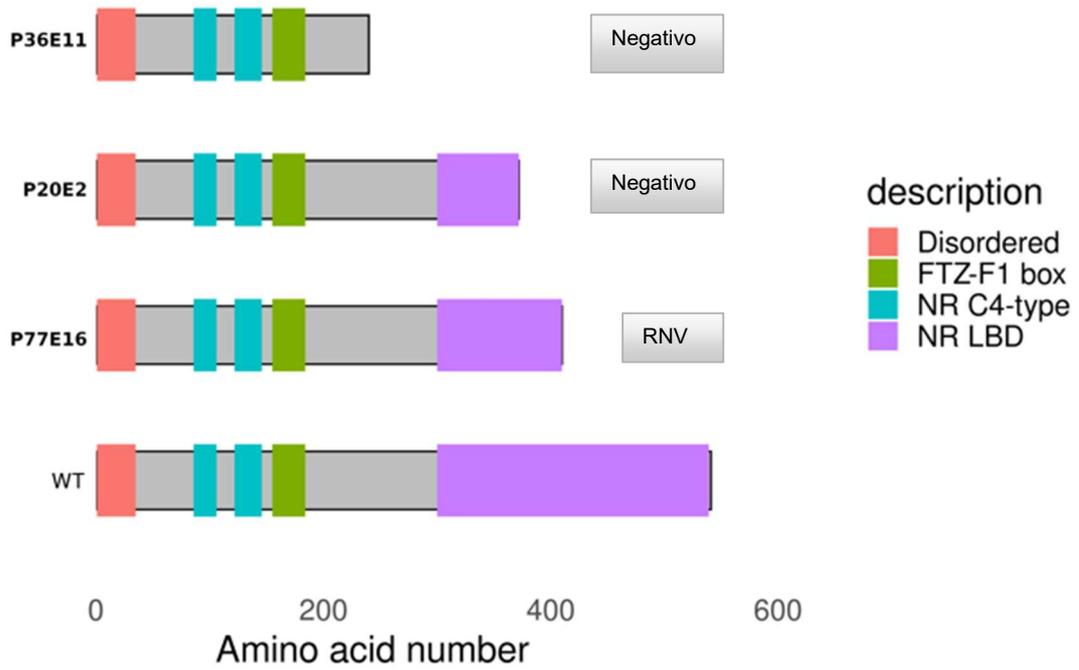
**Figura 32.** Esquema proteico del gen F2 y sus mutantes (a la derecha el resultado clínico obtenido) (Brennan, 2018).



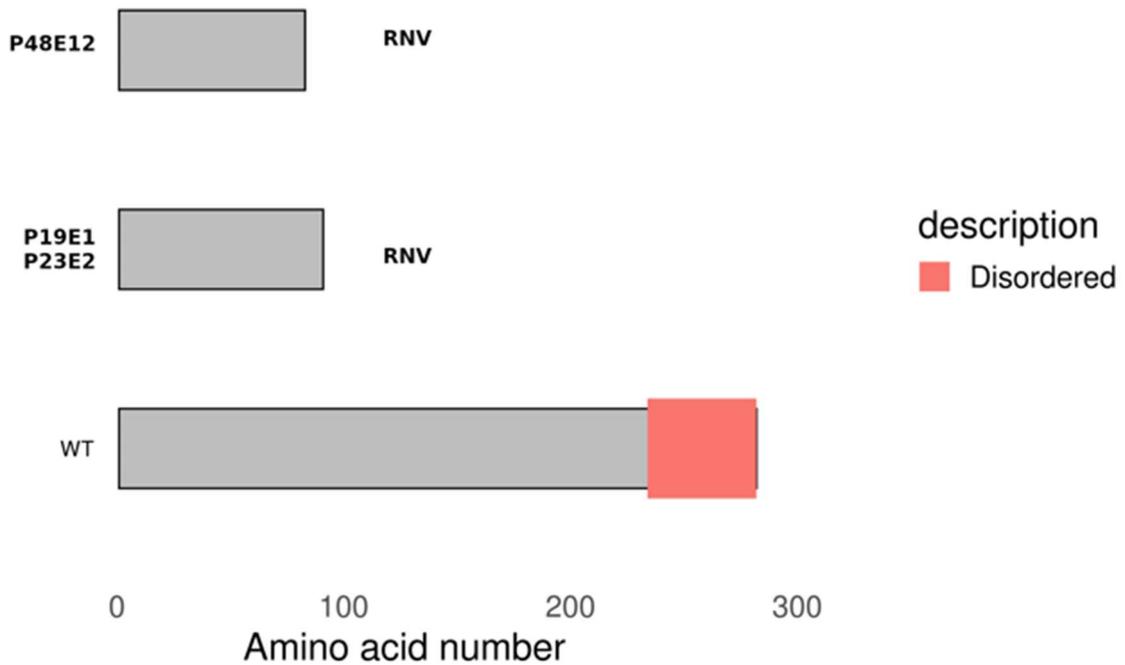
**Figura 33.** Esquema proteico del **Gen MYO18A** y su mutante (resultado clínico debajo del código embrionario) (Brennan, 2018).



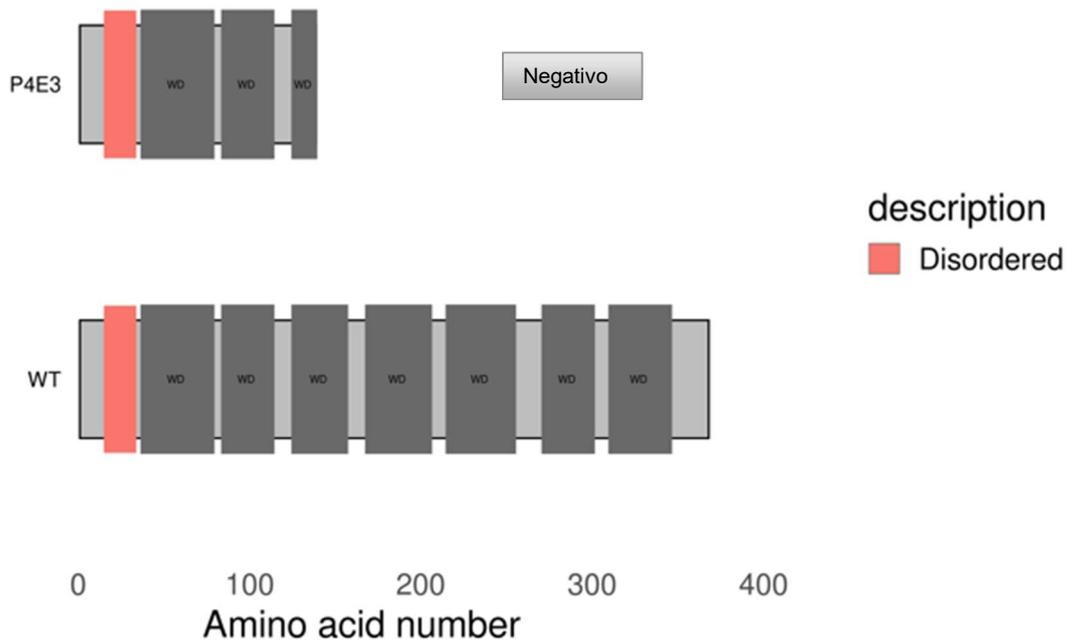
**Figura 34.** Esquema proteico del **Gen ABCA1** y sus mutantes (a la derecha el resultado clínico obtenido) (Brennan, 2018).



**Figura 35.** Esquema proteico del Gen NR5A2 y sus mutantes (a la derecha el resultado clínico obtenido) (Brennan, 2018).



**Figura 36.** Esquema proteico del Gen MMACHC y sus mutantes (a la derecha el resultado clínico obtenido) (Brennan, 2018).



**Figura 37.** Esquema proteico del Gen RAE1 y la variante mutante (resultado clínico debajo del código embrionario).

Respecto al gen *GDF3*, presenta una mutación que introduce un codón stop en el aminoácido 243, lo que conlleva una pérdida completa del factor de crecimiento que en condiciones normales es separado por una proteasa de su propéptido mediante corte entre los aminoácidos 250 y 251.

## 5.5. Método de selección embrionaria mediante IA

### 5.5.1. Selección del modelo de clasificación embrionaria

Se obtuvieron distintos valores de puntuación balanceada para cada uno de los modelos probados, usando las dos estrategias de estandarización para los datos cinéticos (Zvalue y Min-Max) (**Tabla 17**).

El clasificador basado en máquina de soporte de vectores (SVC) sin *ADABOOST* con *ZValue* es el que mejor resultados ofrece en cuanto a la puntuación del *Cross Validation* (aprendizaje). Sin embargo, no ocurre lo mismo con la puntuación del *Test* (validación), lo que sugiere un claro sobreajuste en los datos de entrenamiento u “overfitting”. En general, *ADABOOST* no mejora el algoritmo básico (exceptuando el modelo *Random Forest* con *ZValue*).

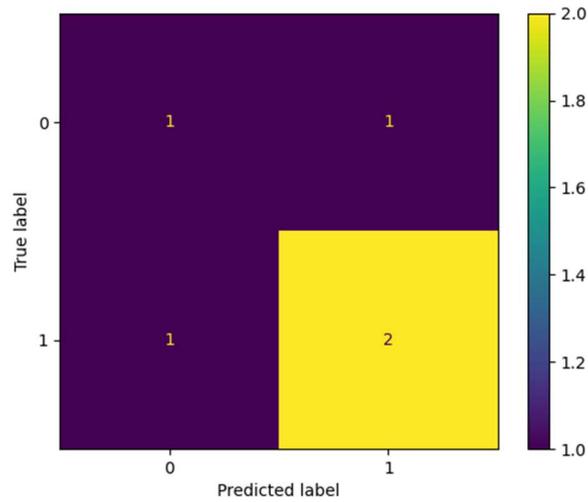
**Tabla 17.** Puntuación balanceada de los distintos modelos de clasificación probados

Modelo	ADABOOST	ZValue		Min-Max	
		CV Score	Test Score	CV Score	Test Score
Decision Tree	No	0,650	<b>0,583</b>	<b>0,700</b>	<b>0,583</b>
	Si	0,533	0,000	0,533	0,000
Random Forest	No	0,383	0,167	0,650	<b>0,583</b>
	Si	0,467	0,333	0,467	0,333
SVC	No	<b>0,767</b>	0,333	0,433	0,167
	Si	0,333	0,333	0,333	0,333
KNC	No	0,567	0,333	0,567	0,333
Gaussian Naive Bayes	No	0,500	0,500	0,500	0,500
	Si	0,5	0,500	0,5	0,500

El siguiente modelo con mejores resultados de puntuación del *Cross Validation* es *Decision Tree* con *Min-Max*. En este modelo (sin *ADABOOST*), los resultados con el set de datos *Test* son superiores a 0,5, sugiriendo que no existe “overfitting”. No obstante, el set de datos de *Test* era muy pequeño (5 observaciones), por lo que es estrictamente necesario probarlo con un set de datos más grande.

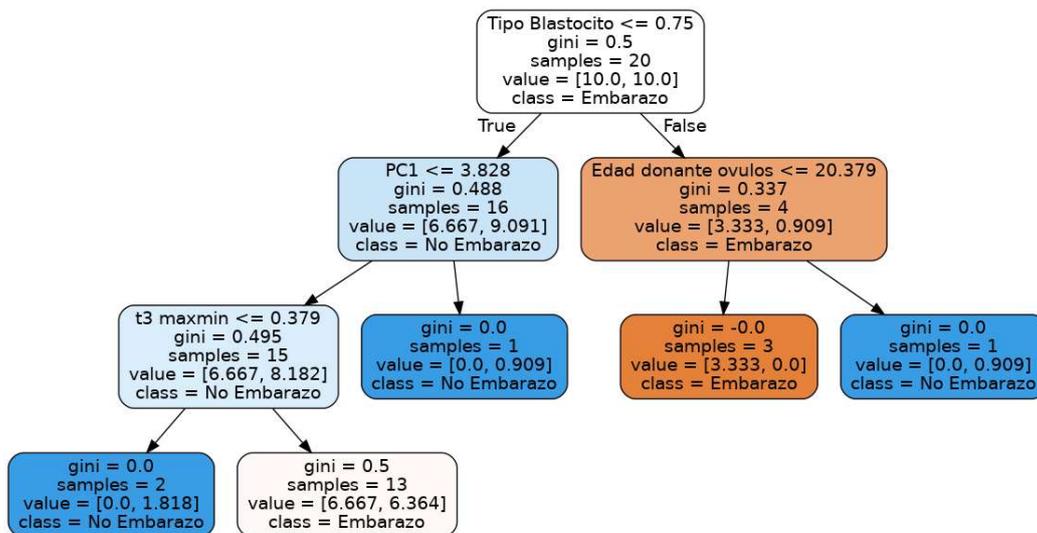
#### 5.5.2. Aplicación del modelo *Decision Tree*

Finalmente, ha sido el modelo *Decision Tree* sin *ADABOOST* con *Min-Max* el que se ha tomado como referencia para seguir estudiando. La matriz de confusión obtenida tras su aplicación durante la validación se puede observar en la **Figura 38**, donde tres de las muestras se clasificaron de manera correcta: dos  $\beta$ -hCG positivos y uno negativo.



**Figura 38.** Matriz de confusión con el set de datos test. Se representa el grado de acierto en la clasificación de cada una de las muestras (5) en  $\beta$ -hCG positiva o negativa. En el eje Y se muestra la clasificación real de las muestras, mientras que en el eje X se muestra la clasificación realizada por el modelo supervisado.

Analizando la construcción de este modelo, al ser un árbol de toma de decisiones se puede extraer información muy valiosa acerca de cómo se ha formado, observando en qué basa sus decisiones para la clasificación entre embarazo o no embarazo (en este caso  $\beta$ -hCG positiva o negativa). *A priori*, de todas las variables introducidas en el sistema, las que parecen tener más peso en la clasificación son el tipo de blastocisto, la meta-variable genética PC1, la edad de la donante de óvulos (este concepto se refiere a la edad de la paciente que ha sido sometida a la punción ovocitaria) y la variable cinética t3 (**Figura 39**).



**Figura 39.** Estructura del árbol de decisiones entrenado.

## 6. DISCUSIÓN

### 6.1. Selección embrionaria y PGT-A

Una de las grandes aspiraciones de la medicina reproductiva se centra en lograr la tecnología capaz de identificar y seleccionar el embrión con mayor potencial reproductivo, traducido en el embrión que posea buena capacidad para implantar, desarrollarse y obtener un recién nacido vivo sano en casa (Tiegs et al., 2021). Con esta herramienta, sería posible hacer frente a la pérdida de embarazo espontánea que ocurre desde el momento de la fecundación hasta las 20 semanas de gestación, y que se estima que afecta a un 10-15% de los embarazos al año (Grandone et al., 2021). Además, en un pequeño porcentaje de esas mujeres (3-5%), puede convertirse en recurrente (Tise et al., 2021) y se ha visto como mujeres con historia previa de pérdida de embarazo son más propensas a volver a sufrir otro episodio (Magnus et al., 2019; Grandone et al., 2021).

Muchos de estos embriones no llegan a implantar, y así se define el fallo repetido de implantación (RIF del inglés *Recurrent Implantation Failure*) como la ausencia de embarazo clínico tras la transferencia de 4 embriones de “buena calidad” en un mínimo de 3 ciclos de RA, considerando que estos pacientes son de buen pronóstico reproductivo (Coughlan et al., 2014). El porcentaje de pacientes que sufre el RIF puede alcanzar el 15% y superarlo en casos de infertilidad (Busnelli et al., 2020).

La mayoría de las interrupciones de embarazo se asocian a un origen genético, y en concreto las alteraciones cromosómicas han demostrado su efecto deletéreo sobre la implantación y desarrollo embrionario, presentes no sólo en mujeres de edad avanzada, donde claramente son más frecuentes, sino también en otro tipo de pacientes que se someten a TRA para lograr el embarazo (Brezina & Kutteh, 2015; Sciorio et al., 2020; Yang et al., 2022). Recientemente, la presencia de aneuploidías ha sido descrita en un alto porcentaje de mujeres con edades inferiores a los 20 años (Charalambous et al., 2023).

Gracias al avance de las TRA y la genética molecular, analizar el estado genético de los embriones previamente a su transferencia al útero materno es una práctica muy común en las clínicas de RA, y los cribados genéticos que se

ofrecen consisten en el análisis de alteraciones cromosómicas numéricas (PGT-A), estructurales (PGT-SR), o alteraciones monogénicas (PGT-M) relacionadas con enfermedades hereditarias específicas (como fibrosis quística, enfermedad de Huntington, etc) (Matteo, 2022).

La práctica del diagnóstico genético preimplantacional ha sido muy recomendada en pacientes que obtienen un buen número de embriones de buena calidad y que previamente han sufrido múltiples episodios de transferencias embrionarias con resultado fallido (Gleicher & Orvieto, 2017). A su vez, se ha convertido en una alternativa muy esperanzadora para pacientes con historia clínica de pérdida gestacional recurrente, logrando el embarazo tras la transferencia de embriones euploides (Wang et al., 2019).

Sin embargo, existe cierta controversia en cuanto a su utilización debido a algunos casos de nacimiento de bebés sanos tras la transferencia de embriones clasificados como aneuploides o mosaico (Patrizio et al., 2019; Gleicher et al., 2023). Además, el hecho de que la biopsia embrionaria se centra en 8-10 células del trofoectodermo, cuya línea celular difiere de la MCI, es un dato relevante que crea bastante cautela a la hora de interpretar los resultados y extrapolarlos a todo el embrión (Gleicher & Orvieto, 2017). Estudios en ratón revelan una capacidad de autocorrección de las aneuploidías en la MCI y TE más allá del estadio de blastocisto, siendo incluso mayor en la línea celular de la MCI (Bolton et al., 2016). El grupo de la Dra. Marta Shahbazi, utilizando una reciente plataforma de cultivo para prolongar el desarrollo de embriones humanos tras la implantación, también detectó cambios en la dotación cromosómica de células embrionarias que habían sido clasificados como aneuploides según la biopsia de trofoectodermo realizada en día 5 de desarrollo, y, por el contrario, en día 9 los embriones presentaban euploidía en sus células. Estos resultados podrían indicar que existe también una capacidad de autocorrección en embriones humanos posterior al estado de blastocisto, similar a la que ocurre en ratón (Shahbazi et al., 2020).

A pesar de todo, continúan los trabajos que defienden el PGT como mejor herramienta de selección embrionaria, y abogan por un niPGT que se espera que pronto pueda ponerse en marcha (Cimadomo et al., 2023).

Por otro lado, entre los factores que influyen en la pérdida de embarazo ajenos a las aneuploidías se han propuesto otros como el grosor endometrial, el microbioma uterino, defectos genéticos o aneuploidías que no son detectadas con PGT-A, causas inmunológicas, endocrinas, deterioro de los embriones durante su manipulación por congelación/descongelación o biopsia, entre otros (Maxwell et al., 2016; Meldrum, 2016; Meldrum & de Ziegler, 2016).

En otras especies animales existen alteraciones genéticas ajenas a las cromosopatías, tipo SNPs, que desembocan igualmente en fallos de implantación e interrupción del embarazo (Voss et al., 2000; Guo et al., 2002; Wanderling et al., 2007; Yurttas et al., 2008; Stetson et al., 2012; Rosario et al., 2014; Su et al., 2018). Con el propósito de seguir esta línea de investigación en el ser humano nació el proyecto *Embryogene* y el resultado de esta tesis, ya que, con la tecnología genética actual, la aplicación de ese tipo de valoración sería posible en la clínica de RA, pero todavía no se han definido biomarcadores fiables que permitan su cribado y lo conviertan en una herramienta adicional y disponible para la selección embrionaria humana.

En el presente trabajo, se ha reclutado un grupo de pacientes que se sometían a un tratamiento de ICSI con PGT-A en el que, a partir del ADN de embriones euploides, se estudiaban determinadas regiones genéticas previamente seleccionadas, con el fin de identificar posibles biomarcadores causantes de fallo de implantación o interrupción del desarrollo embrionario temprano.

## 6.2. Muestra poblacional

Primeramente, se evaluó el porcentaje de alteraciones numéricas (aneuploidías) presentes en todas las muestras embrionarias que fueron biopsiadas, comparando aquellas cuyo origen ovocitario había sido donado con las que provenían de ovocitos de la propia pareja. Se comprobó que existía una diferencia estadísticamente significativa, con un mayor porcentaje de alteraciones numéricas en aquellos casos en los que los ovocitos procedían de

la paciente. Este dato concuerda con otros estudios que apoyan el hecho de que la edad avanzada de los progenitores influye sobre la dotación cromosómica aneuploide de los embriones (McCoy et al., 2015; Demko et al., 2016; Simon et al., 2018; Gruhn et al., 2019).

En cuanto a la población seleccionada, ni el origen de los ovocitos (donados o propios), ni la edad de las receptoras fueron motivo de exclusión, y analizando hasta qué punto ambos factores influían en los resultados clínicos del tratamiento, se observó que con relación al origen de los ovocitos no había diferencias significativas. Sin embargo, el grupo de pacientes con ovocitos donados mostraba diferencias estadísticamente significativas con relación a la edad de la receptora, obteniendo mayor porcentaje de RNV cuanto menor era la edad de las pacientes. Realmente, la media de edad en el grupo de pacientes que utiliza ovocitos donados es significativamente mayor que el grupo de pacientes de ovocitos propios (43,7 años en el grupo de ovocitos donados vs 36,3 años en el grupo de ovocitos propios para no RNV y 38,9 años en el grupo de ovocitos donados vs 36,8 años en el grupo de ovocitos propios para RNV). Este dato conduce a pensar que, independientemente de que se transfieran embriones con dotación cromosómica euploide, la edad materna avanzada influye sobre otros aspectos ajenos a los embriones, contrariamente a publicaciones anteriores (Navot et al., 1991; Paulson et al., 1997; Shapiro et al., 2016; Simon et al., 2018; Rubio et al., 2019).

De todas formas, hay otras características, como el índice de masa corporal (IMC), grosor endometrial o niveles de progesterona que no se han tenido en cuenta en este trabajo, y que podrían ayudar a discernir de forma más precisa los factores que afectan a los resultados clínicos, por lo que considero relevante incluirlos en futuros estudios (Liu et al., 2018).

De las 84 parejas seleccionadas para el proyecto, 43 lograron el nacimiento de un recién nacido vivo (56%) contando con todas las transferencias embrionarias que llevaron a cabo en la clínica. Si se tiene en cuenta el porcentaje de partos por transferencia (40,3%), los resultados concuerdan con los obtenidos en el registro de la SEF del año 2020 (39,7%) (SEF, 2020), pero todavía existe un importante rango de mejora, por lo que considero relevante proseguir la

identificación de las causas vinculadas al factor embrionario que estén provocando el fallo de implantación e interrupción temprana del embarazo.

### 6.3. Panel Ampliseq

El panel Ampliseq utilizado incluye 27 genes, seleccionados mediante análisis *in silico* a partir del estudio de modelos KO en ratón para genes que producen muerte embrionaria y, aunque podría haber enfermedades del ser humano adulto relacionadas con alteraciones en algunos de los genes estudiados, se desconocen las repercusiones que podrían tener durante el desarrollo embrionario humano.

Para predecir el carácter deletéreo de las mutaciones encontradas se ha utilizado una predicción computacional, en este caso *IMOTHEP* (Knecht et al., 2017), ya que en la mayoría de los casos no hay datos experimentales en humanos que incluyan estas variantes concretas. El ratón KO es letal según las revisiones bibliográficas, pero el hecho de que cualquiera de estos polimorfismos corresponda a un alelo KO, hipomorfo o incluso deletéreo permanece incierto en repetidas ocasiones.

Respecto a los tipos de mutaciones estudiadas (*missense*, *nonsense*, *splicesite*, etc), no se encontraron grandes diferencias entre los que afectaban a embriones que dieron lugar a RNV vs los que no. Existe un número total de mutaciones en homocigosis detectadas en embriones positivos (RNV) ligeramente menor que el obtenido en los embriones negativos (no RNV), aunque en general destaca el alto número de mutaciones en ambos grupos. Esto concuerda con trabajos realizados con secuenciación del genoma embrionario completo (WGS), en los que se describe la existencia de millones de variantes o mutaciones heredadas, así como variantes *de novo*, que surgen tras la fecundación (Peters et al., 2015; Murphy et al., 2020; Kumar et al., 2022).

Entre los genes analizados en el proyecto, 3 de ellos han resultado más relevantes en cuanto a su posible efecto deletéreo: *F2*, *PIKFIVE* y *RAE1*.

El gen **F2** codifica para la proteína protrombina, un factor de coagulación que participa en numerosas funciones celulares, entre ellas la coagulación, angiogénesis, la proliferación celular y el sistema inmune (Martineau et al., 2004; Hurley et al., 2013). Su modelo KO en ratón cursa con muerte embrionaria de penetrancia incompleta alrededor del día 10 de gestación (Sun et al., 1998; Xue

et al., 1998), y la alteración de este gen en humanos está asociada a una enfermedad rara que cursa con trastornos en la coagulación (Lancellotti et al., 2013; Daneshi et al., 2018). Mediante estudios de proteómica en placentas de mujeres con pérdida temprana de embarazo se ha detectado la participación de esta proteína durante el desarrollo embrionario, cuyo defecto predispone a trombosis, una de las causas principales que desencadenan la pérdida de embarazo (Pan et al., 2018).

En el presente estudio, este gen se secuenció por completo, y entre los polimorfismos detectados cabe destacar como potencialmente deletéreos 3 de ellos que aparecían en homocigosis, de tipo *missense* o cambio de sentido, que provoca un cambio en la secuencia proteica. Los embriones afectados fueron: P5E12 (chr11:46749646C>T) y P33E1 (chr11:46750236A>T), cuya mutación afectaba al aminoácido 411 y 441 respectivamente, y el análisis de  $\beta$ -hCG en sangre fue negativo; y P4E3 (chr11:46751102T>A), que obtuvo como resultado clínico un embarazo bioquímico y cuya mutación se localizaba en el aminoácido 549 (**Tabla 13**). La protrombina está formada por 622 aminoácidos que se disponen en 3 fragmentos (fragmento 1, fragmento 2 y dominio proteasa), constituyendo la forma inactivada de la proteína. Para dar lugar a su forma activa, la trombina, la protrombina debe perder los fragmentos 1 y 2 y conservar únicamente el dominio proteasa que se encuentra en el extremo C-terminal, el cual comienza a partir del aminoácido 272 (Pozzi et al., 2014). Las 3 mutaciones mencionadas se localizaron en el dominio proteasa de la proteína, por lo que podrían tener un efecto deletéreo alterando su función. Ninguna de las 3 mutaciones, que según la predicción computacional estarían clasificadas como deletéreas, se encuentra en la base de datos de gnomAD, es decir, no han sido descritas anteriormente en el ser humano, bien porque su frecuencia es irrelevante, o bien porque su letalidad impide que hayan podido ser identificadas en el individuo adulto (Karczewski et al., 2020).

Otro dato por considerar en el embrión P33E1, es la presencia de otra mutación de *F2* en heterocigosis. Dicha mutación se localiza en un sitio de empalme o *splice site* (chr11:46750213G>\*). *Splicing* es el nombre que recibe el proceso de eliminación de intrones en un gen, y cuando la mutación se localiza en esta región, puede dar lugar a diferentes escenarios, entre ellos la exclusión

de un exón, la retención de parte del intrón o la inclusión de secuencias intrónicas (Scotti & Swanson, 2016; Vaz-Drago et al., 2017). Cualquiera de estos cambios puede desencadenar tanto en la formación de una proteína truncada o con secuencia alterada, como en la introducción de un codón de parada prematuro que finalmente produzca la pérdida de función de la proteína (Singh & Cooper, 2012). Dicho esto, se concluye que el embrión P33E1 correspondería a un caso de heterocigosidad compuesta, referida a aquellos individuos que portan dos variantes diferentes en el mismo gen, una en cada copia del gen y que puede tener como consecuencia un efecto recesivo en el fenotipo (Jiang et al., 2015). En este caso un alelo contendría la mutación *missense* del aminoácido 441 y el otro la mutación de *splice site* mencionada (además de la misma mutación *missense* del otro alelo que se presentaba en homocigosis).

Por otro lado, el embrión P26E2 presentó también una mutación en homocigosis chr11:46750995C>T tipo *missense* localizada en el aminoácido 513 cambiando una alanina por una valina. A pesar de que esta mutación no ha sido clasificada como deletérea según las predicciones bioinformáticas utilizadas, además de que tampoco se ha descrito hasta la fecha en la base de datos de gnomAD con carácter homocigoto (aunque sí en heterocigosis), su hallazgo resultó también de interés al aparecer únicamente en un embrión que resultó en aborto, por lo que no se puede descartar que no esté relacionado con el resultado clínico obtenido (**Tabla 15**).

Por último, se detectaron otros polimorfismos en heterocigosis en 5 embriones con resultado negativo tras el análisis de  $\beta$ -hCG en sangre (**Tabla 14**) estando su presencia en homocigosis catalogada como deletérea según la predicción computacional. El polimorfismo chr11:46744793T>\* presente en el embrión P2E2 produce un cambio del marco de lectura por delección a partir del aminoácido 127. Esta mutación sí aparece en la base de datos de gnomAD en heterocigosis, por lo que en este caso no puede considerarse que esté involucrado en el fallo de implantación, aunque su hallazgo ilustra sobre la incidencia en la población de embriones estudiados y la gravedad potencial que supondría encontrarla en homocigosis si se aumentara el número de casos a estudiar. El resto de los polimorfismos no han sido descritos en la base de datos de gnomAD ni en homocigosis ni en heterocigosis, por lo que, teniendo en cuenta

el resultado clínico, se podría pensar que puedan haber influido en el fracaso de la implantación.

Con los hallazgos encontrados, sería interesante verificar el genotipo del embrión mediante PCR convencional y secuenciación de Sanger. Después se podrían realizar ensayos funcionales tipo cultivo celular para identificar la actividad de la proteína mutada, y finalmente crear un modelo animal transgénico para comprobar el efecto de esa mutación en ratón y evaluar el posible daño durante la implantación embrionaria. Con respecto a las mutaciones que aparecen en heterocigosis y que han sido consideradas hallazgos interesantes, habría que seguir considerándolas como biomarcadores potenciales hasta que la presencia de un RNV no demostrase lo contrario, por lo que el aumento del número de embriones a estudiar sería un requisito indispensable y quizás el principal para continuar esta investigación y obtener conclusiones más robustas.

El gen **PIKFYVE** sintetiza una enzima con 2098 aminoácidos que actúa sobre el metabolismo de los fosfolípidos de membrana (*PIs*), en concreto PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>/PtdIns5P, por ello se relaciona también con la homeostasis de los endosomas/lisosomas, con el transporte retrógrado, las vías de degradación y la autofagia celular (Sbrissa et al., 1999; Rutherford et al., 2006; Martin et al., 2013; Bissig et al., 2017). La falta de expresión del gen en ratón (individuos *KO*) provoca muerte embrionaria en el estadio de 32-64 células (Ikononov et al., 2011); en otros organismos como *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila*, la pérdida de función de este gen se asocia con alteraciones en el desarrollo y letalidad temprana (Nicot et al., 2006; Rusten et al., 2006). En el ser humano, la presencia de determinados polimorfismos en **PIKFYVE** son causantes de la distrofia corneal moteada, una enfermedad rara autosómica dominante que se caracteriza por múltiples opacidades asintomáticas no progresivas que se diseminan por todo el estroma corneal (Li et al., 2005). Esta enfermedad fue descrita por primera vez en 1957, y en el año 2012 se publicó el hallazgo de una paciente con distrofia corneal moteada que presentaba una nueva mutación en el aminoácido 1389 con una delección de 4 bases, ocasionando un cambio en el marco de lectura y un codón stop prematuro que provocaba un impacto significativo sobre la función de la proteína. Hasta esa fecha, todas las mutaciones descritas habían sido localizadas en regiones anteriores al aminoácido

1389, es decir que, incluso apareciendo una mutación con una localización posterior, sigue causando alteraciones relevantes sobre la función de la proteína (Kawasaki et al 2012).

La proteína del gen *PIKFYVE*, a la hora de regular los niveles de *PIs*, no actúa de forma independiente, sino formando un complejo denominado *PAS* en el que están implicados otros dos genes: *Sac3* y *ArPIKfyve* (Shisheva, 2012). En un principio parecía interesante plantear el estudio del complejo entero en futuras investigaciones, puesto que es el conjunto de los 3 genes el que colabora en mantener los niveles de *PIs* *PtdIns* (3,5) *P2/PtdIns5P* en las células (Shisheva, 2012). Sin embargo, para estos genes el modelo KO de ratón cursa con letalidad poco después de nacer; el ratón *ArPIKfyve* (-/-) lo hace 1 o 2 días tras su nacimiento, y el ratón *Sac3* (-/-) pasados 45 días (Chow et al., 2007; Zhang et al., 2007), por lo que de momento se descartaría su estudio con respecto a la investigación del periodo periimplantacional.

Para el estudio de este gen se seleccionó una región localizada en el exón 14 de los 43 exones que componen este gen. Como se detalla en material y métodos, estas regiones fueron seleccionadas teniendo en cuenta aquellas que contenían polimorfismos que no se encontraban en homocigosis en la población y cuyo fenotipo no había sido descrito como benigno. Tras su estudio, se identificó la mutación *chr2:209179025A>\** en homocigosis de tipo cambio del marco de lectura por deleción como potencialmente deletérea en un embrión con resultado clínico bioquímico. Esta mutación no ha sido anteriormente descrita en la base de datos de gnomAD, y su repercusión podría desembocar en una proteína truncada poco después del aminoácido 568, con la consecuente pérdida de gran parte de los dominios de la proteína, entre ellos el dominio catalítico *PIPKc*, que es el responsable de la localización de la membrana, o el dominio tipo chaperona *TCP-1*, esencial para el ensamblaje con otras estructuras proteicas (Sasaki, 2009; Shisheva, 2008). Debido a la relevancia de estos resultados, se procedió a verificar la presencia de la mutación en el ADN del embrión y de ambos progenitores mediante secuenciación con el método de Sanger. La mutación fue detectada en el embrión en heterocigosis estando ausente en ambos progenitores, con lo que se determinan dos conclusiones relevantes: por un lado, la existencia de un error de secuenciación inicial, identificando la mutación en homocigosis en lugar de heterocigosis, y por otro,

que la mutación encontrada correspondería a una mutación *de novo* al no estar presente en ninguno de los progenitores. Ambas conclusiones ponen de manifiesto la necesidad de realizar estudios complementarios para confirmar la presencia de una determinada mutación en el embrión cuando se emplean muestras de ADN utilizadas para PGT-A.

Uno de los errores que puede causar el exceso en la identificación de homocigotos reduciendo la capacidad diagnóstica de la PCR molecular es la originada por el fenómeno drop-out alélico (*Allele drop out* o ADO), que se define como el fallo de amplificación de un alelo. Este fenómeno puede ocurrir cuando las muestras de ADN son muy pequeñas o de poca calidad, como podría ser este caso en el que las muestras de ADN son derivadas de una biopsia para PGT-A de un máximo de 8-10 células de TE; o bien debido a la propia naturaleza del locus investigado, en el que puede haber presencia de SNPs en las zonas de unión de los cebadores que conduce a errores en la amplificación del amplicón (Wang et al., 2012). Para este último caso se ha propuesto como solución diseñar nuevos cebadores que eviten la zona de conflicto (Shestak et al., 2021), pero dada la escasa cantidad de ADN de la que se dispone en este tipo de estudios, esta solución no sería la más factible, por lo que para futuras investigaciones se ha propuesto incluir la verificación mediante PCR convencional y secuenciación por Sanger de las mutaciones más relevantes, sobre todo las que aparecen en homocigosis.

En cuanto a las mutaciones *de novo*, surgen tras la fecundación y son en general más deletéreas que las mutaciones heredadas, jugando un papel importante en enfermedades humanas (Murphy et al., 2020; Noyes et al., 2022). Ocurren en cada generación a partir de errores en la replicación, reparación del ADN alterado o recombinación de alelos no homólogos entre otros mecanismos, y cuando se expresan de forma dominante o como heterocigoto compuesto pueden causar fenotipos de carácter patogénico severo. Su presencia se ha relacionado con la edad avanzada de los progenitores, sobre todo con la edad paterna (Besenbacher et al., 2016). En este caso concreto la pareja utilizó ovocitos propios siendo la edad materna de 39 años y la paterna de 46 años respectivamente, por lo que concuerda con lo descrito en la bibliografía. Recientes estudios han llegado a detectar hasta SNPs *de novo* de media por individuo, cuando anteriormente se había estimado un número máximo de 75

SNPs (Besenbacher et al., 2016; Noyes et al., 2022). De todos los SNPs *de novo*, alrededor de un 3% ocurren como resultado de un fenómeno conocido como variación de múltiples nucleótidos (MNVs), definido como la acumulación de dos o más mutaciones *de novo* a muy poca distancia (menos de 20kb) dentro de un mismo individuo (Besenbacher et al., 2016). Teniendo en cuenta estos datos, sería interesante secuenciar ampliar la región a estudiar del gen o incluso incluir todo el gen para comprobar si la mutación ha ocurrido de forma independiente o ligada a fenómenos de MNVs, lo que podría comprometer otras zonas del gen.

La nucleoporina codificada por el gen ***RAE1***, es una proteína transportadora de ARNm (Brown et al., 1995; Kraemer & Blobel, 1997; Nakano et al., 2011), aunque también ejerce un importante papel en la regulación de la mitosis (Babu et al., 2003, Chen et al., 2021). *RAE1* es un gen haploinsuficiente, por lo que la presencia de una sola copia normal del gen es insuficiente para obtener un fenotipo normal del organismo (Lek et al., 2016; Karczewski et al., 2020). El modelo KO de ratón es letal durante la etapa embrionaria, y los embriones no consiguen superar el día 8,5 de desarrollo; sin embargo, no hay alteraciones apreciables a nivel del complejo del poro nuclear (NPC), teniendo en cuenta su función como transportador de ARNm. Ello significa que esta función continúa realizándose en su ausencia, dirigiendo la causa de su muerte al papel que ejerce sobre los puntos de control de la mitosis (Babu et al., 2003). *RAE1* guarda gran similitud con *BUB3*, otro regulador de los puntos de control de la mitosis cuyo ratón KO también muere durante la etapa embrionaria temprana, alrededor del día 4.5-6.5 (Kalitsis et al., 2000; Dove, 2003). Por otro lado, los ratones heterocigotos de ambos genes muestran un fenotipo similar, y aunque en este caso es viable, presenta deficiencias en los puntos de control de la mitosis y la disgregación cromosómica (Babu et al., 2003; Oh et al., 2017). En humanos, la alteración de este gen no tiene ninguna enfermedad asociada en la base de datos de OMIM, aunque se ha visto su papel colaborador en la progresión de algunos tipos de cáncer como el colorrectal o de pulmón (Oh et al., 2017; Kobayashi et al., 2021). En futuros estudios, sería interesante añadir el estudio del gen *BUB3* para profundizar en este aspecto.

En cuanto a la estructura de la proteína, se organiza en un dominio N-terminal de 30 aminoácidos (NTE) seguido de la repetición de 7 dominios WD40 que forman una hélice plegada ( $\beta$ ) de 7 aspas actuando como una plataforma de

interacción proteína-proteína capaz de mediar la asociación con diversas proteínas (Reddy et al., 2008; Ren et al., 2010). La mutación identificada en el embrión P4E3 (chr20:55941902C>\*) corresponde a un cambio en el marco de lectura por la delección de un nucleótido. El alelo alterado produciría un cambio en la secuencia proteica a partir del aminoácido 139 que tendría como resultado una proteína truncada en el aminoácido 145, que corresponde con la localización del tercer dominio WD40 (**Figura 37** de apartado de resultados 5.4.7.). El embrión tuvo como resultado clínico un bioquímico y, aunque esta mutación haya aparecido en heterocigosis, debido al carácter haploinsuficiente del gen, la predicción computacional de su efecto deletéreo y la ausencia de su descripción en la base de datos de gnomAD, se ha considerado su papel relevante como posible causante del fallo postimplantacional que sufre el embrión.

Con respecto al grupo de polimorfismos expuestos en la **Tabla 14** (apartado de resultados 5.4.5.) en genes como *NR52A*, *RFT1*, *ABCA1*, *RFK*, *KMT2A*, *F2*, *GDF3* y *MYO18A*, su presencia en homocigosis ha sido catalogada como deletérea según la predicción computacional. Además, ninguno de estos polimorfismos ha sido descrito en homocigosis en la base de datos de gnomAD, aunque alguno de ellos sí aparece en heterocigosis. En el presente estudio, han estado presentes en heterocigosis, pero su frecuencia no ha sido lo suficientemente alta como para encontrar homocigotos o heterocigotos compuestos. Sin embargo, ninguno de estos embriones ha evolucionado favorablemente, por lo que la causa de su fracaso podría estar relacionada con casos de heterocigosidad compuesta, o bien con la acumulación de diferentes polimorfismos en heterocigosis localizados en genes funcionalmente conectados con el fallo de implantación, algo similar a lo que se ha descrito para el síndrome de múltiples anomalías morfológicas del flagelo espermático (MMAF) en ratón. Los varones que presentaban un mayor número de mutaciones en heterocigosis para genes implicados en el síndrome de MMAF mostraban un espermograma alterado con un aumento significativo del porcentaje de anomalías morfológicas y una disminución de la motilidad espermática (Martínez et al., 2021).

Una vez más el aumento del número de embriones a investigar, así como la ampliación de la región a estudiar de algunos genes e incluso el hecho de

incluir más genes relacionados con el fallo de implantación y el desarrollo embrionario temprano serían los objetivos por tratar en futuras investigaciones.

En los genes que se han secuenciado por completo: *F2*, *ABCA1* y *NR5A2*, se han detectado únicamente 2 embriones que tuviesen más de una mutación por gen, el caso ya comentado de *F2* y otro caso relacionado con el gen *ABCA1*.

El gen ***ABCA1*** codifica para una proteína de 2261 aminoácidos que participa en la exportación celular del colesterol y los fosfolípidos (Quazi & Molday, 2013), con una estructura molecular que contiene dos dominios transmembrana (TMD de *transmembrane domain*) y dos dominios citosólicos (ABC o NBD de *ATP-binding cassette domain*) (Segrest et al., 2022). Su modelo *KO* en ratón no sobrevive más allá del día 14 de gestación, mostrando alteraciones en la placenta y disminución del crecimiento intrauterino (Christiansen-Weber et al., 2000). En el ser humano, la alteración de este gen produce la enfermedad de Tangier, un trastorno autosómico recesivo que cursa con la ausencia casi completa de HDL en plasma desencadenando la acumulación de esteres de colesterol en los tejidos (Brook et al., 1977; Bodzioch et al., 1999). En el presente estudio se detectó en el embrión P29E3 dos mutaciones de este gen en heterocigosis: una mutación tipo *frameshift* o cambio del marco de lectura por delección (chr9:107586755T>\*) que produciría una proteína truncada a partir del aminoácido 883 y otra mutación tipo missense (chr9:107564342A>G) que modificaría el aminoácido 1564 cambiando una leucina por una prolina. Este embrión resultó en un análisis  $\beta$ -hCG negativo, aunque como no se puede identificar mediante la técnica empleada si ambas mutaciones están localizadas en el mismo alelo o en diferentes (heterocigosis compuesta), además de que se desconoce el impacto que podría tener la mutación *missense* sobre la proteína, no hay criterios suficientes para concluir que estos polimorfismos hayan sido la causa del resultado clínico obtenido. Por otro lado, se identificó en el embrión P67E2 una mutación en homocigosis (chr9:107646709T>C) tipo cambio de sentido, en la que se sustituye una isoleucina por una valina localizada en el aminoácido 101 de su secuencia proteica. Esta mutación no fue clasificada como deletérea según los predictores bioinformáticos, pero tampoco está descrita en la base de datos de gnomAD y

resultar el embrión objeto en un embarazo bioquímico, hace que se pueda sospechar de un posible efecto deletéreo.

El gen **NR5A2** codifica un nucleoreceptor, NR5A2, al que se le han asociado funciones relacionadas con el transporte del colesterol, pluripotencialidad de las células embrionarias, esteroidogénesis, o desarrollo y diferenciación del embrión entre otras funciones (Sandhu et al., 2021). Comparte similitudes con el gen *Nr5a1* que regula la expresión de *Oct4* en las células del epiblasto de ratón, función que finalmente también se le atribuyó a *Nr5a2* (Gu et al., 2005). El gen *Oct4* es uno de los factores de transcripción que juega un papel esencial tanto en el mantenimiento de la pluripotencialidad, como en las primeras decisiones embrionarias de diferenciación (Niwa et al., 1998; Gu et al., 2005). La expresión de *Nr5a2* en el ratón se hace evidente a partir del embrión de 8 células (Festuccia et al., 2023) y los embriones KO mueren durante la etapa de E6.5-7.5 (Paré et al., 2004; Sandhu et al., 2021). En el ser humano, la alteración de su función está asociada a la inflamación y cáncer gastrointestinal, pancreatitis crónica, cáncer de páncreas y otra multitud de enfermedades (Sandhu et al., 2021). En cuanto a la proteína, contiene 541 aminoácidos estructurados en 4 dominios principales: el dominio amino terminal (A/B) que contiene la región de activación AF-1, seguido del dominio de unión a ADN (DBD), responsable de dirigir el receptor a secuencias de ADN específicas; la caja Ftz-F1, característica distintiva y común a varios miembros de la subfamilia NR5A, responsable de la identificación de la secuencia específica de ADN, un dominio D o bisagra que conecta DBD con LBD y al que se le han asignado funciones relevantes de regulación y fosforilación, y el dominio carboxilo terminal que corresponde a la región E o dominio de unión a ligandos (LBD) capaz de unirse a otros fosfolípidos, este último dominio incluye la región de activación AF-2 que regula el inicio de la transcripción (Meinsohn et al., 2019; Sandhu et al., 2021).

Este gen se secuenció por completo y se identificaron 2 SNPs de tipo cambio de marco de lectura por delección en heterocigosis que resultaron en embriones con  $\beta$ -hCG negativa: el embrión P36E11 con chr1:200017554T>\* (que produciría la proteína truncada a partir del aminoácido 240) y el embrión P20E2 con chr1:200080331T>\* (que produciría la proteína truncada a partir del aminoácido 372). Estos SNPs han sido categorizados como potencialmente

deletéreos en homocigosis según la predicción computacional. En la base de datos de gnomAD han sido descritos en heterocigosis por lo que, no se pueden considerar como deletéreos y causantes del fallo de implantación en estos casos. Sin embargo, fue interesante el hallazgo de que uno de estos embriones, en concreto el embrión P20E2, presentaba además otra mutación en heterocigosis del gen *ABCA1*: chr9:107550322G-A, tipo cambio de sentido, que sustituye una alanina por una valina en el aminoácido 2028. Esta mutación también ha sido descrita en heterocigosis en gnomAD, y según la herramienta computacional, sería deletérea en homocigosis. Ambos genes comparten la función que ejercen sobre el metabolismo del colesterol, por lo que, la hipótesis de que pudiesen causar, junto con otras mutaciones en heterocigosis de genes que también participan en el metabolismo del colesterol, un efecto deletéreo podría ser interesante de investigar.

Por otro lado, se identificó otro embrión, P77E16, con una mutación sin sentido en heterocigosis (chr1:200080447C>T). El alelo mutado produciría una proteína truncada a nivel del aminoácido 410, correspondiendo con la localización del dominio LBD. Sin embargo, en este caso el embrión evolucionó favorablemente, siendo claramente no deletéreo, aunque cabe destacar que este SNPs no ha sido descrito hasta la fecha en la base de datos de gnomAD.

Otro hallazgo a tener en cuenta es el relacionado con los genes *KMT2A* y *MYO18A*, en los que se ha estimado una posible haploinsuficiencia en el ser humano, presentando valores de pLI de 1 y 0,99 respectivamente (Lek et al., 2016; Sun et al., 2017; Buschman & Field, 2018). Conforme a esto, la presencia de una copia mutada cabría esperar que causase algún efecto en el individuo. Sin embargo, tanto en el gen *KMT2A* como en el *MYO18A* se han descrito en la población individuos heterocigotos que presentan mutaciones que provocan una proteína truncada (base de datos de *gnomAD*) con fenotipos normales. Esto pone de manifiesto que los valores de pLI han de considerarse como estimaciones, y que en determinados casos no corresponden con la realidad. Como he comentado, en el presente trabajo las mutaciones detectadas en estos dos genes aparecían en heterocigosis descritas previamente en la base de datos de *gnomAD*, por lo que no se ha considerado que hayan sido la causa del fallo de implantación.

El gen **MYO18A** codifica para una glicoproteína transmembrana que se corresponde con el marcador de linfocitos CD245, con 2054 aminoácidos. Se le han asociado funciones de migración celular, receptor de la proteína surfactante tipo A, citotoxicidad de las células NK (del inglés *Natural Killer*), entre otras (Yang et al., 2005; De Masson et al., 2016; Horsthemke et al., 2019). El modelo *KO* en ratón es letal durante la fase embrionaria, expresándose mayoritariamente en el corazón e impidiendo que los individuos progresen más allá del día 12.5 de desarrollo (Horsthemke et al., 2019). En humanos, recientemente se ha descrito la utilidad de su proteína como posible biomarcador diagnóstico y pronóstico de pacientes con leucemia mieloide aguda, en los que los niveles de la proteína están incrementados (Ali et al., 2023).

En el presente trabajo se detectó una mutación categorizada como potencialmente deletérea en homocigosis según la predicción computacional, pero que en este caso se presentaba en heterocigosis: una mutación de tipo *missense* (chr17:27446450T>C) en el embrión P36E5, localizada en el aminoácido 578, cambiando una metionina por una valina y dando lugar a un resultado de análisis  $\beta$ -hCG negativo. Por otro lado, el embrión P48E11 presentó una mutación tipo *frameshift* (chr17:27446366C>\*) que afectaría al producto proteico a partir del aminoácido 606 y generando un codón stop a partir del aminoácido 650. Esta mutación también se caracterizó como deletérea en homocigosis según la predicción computacional, aunque en el presente trabajo se presentaba en heterocigosis, pero en este caso resultando en una gestación evolutiva. Esta última mutación, sin embargo, no ha sido descrita en la base de datos de gnomAD ni en homocigosis ni en heterocigosis, por lo que podría considerarse como un caso de SNPs con una frecuencia muy baja en la población o bien una nueva variante que todavía no ha sido descrita.

En cuanto al gen **GDF3** codifica para un factor de crecimiento que activa las vías de señalización que regulan la proliferación y diferenciación celular, el establecimiento de los patrones celulares y el mantenimiento de la pluripotencialidad celular (Shen, 2007; Sherbet, 2011; Morikawa et al., 2016; Miller & Hill, 2016). Mientras en el ser humano es la sobreexpresión de este gen el que mantiene la pluripotencialidad de las células madre, en el ratón es necesaria la baja expresión del gen para su mantenimiento (Levine & Brivanlou,

2006). La expresión del gen en ratones se ha detectado en las células pluripotentes de la masa celular interna y el epiblasto (Chen et al., 2006), y en las células del epiblasto en humanos (Blakeley et al., 2015). El modelo *KO* de ratón cursa con letalidad entre E6.0 y E8.5, aunque parte de la camada sobrevive, presentando alrededor de un 30% fenotipos alterados (Chen et al., 2006). Este gen en humanos se expresa en diversidad de tejidos del individuo adulto, involucrado en la regulación del desarrollo de tejido esquelético y ocular, con mutaciones descritas asociadas al síndrome de Klippel-Feil, Microftalmia y Coloboma (Tracy et al., 2004; Ye et al., 2010). En cuanto a la proteína GDF3 posee 364 aminoácidos y está estructurada en 3 segmentos: la señal peptídica en el extremo amino-terminal, que se desprende durante la translocación al retículo endoplasmático, un predominio largo, y el extremo carboxilo-terminal, que corresponde con la proteína activa o madura (Morikawa et al., 2016; Ratcliff et al., 2021). Para que el factor de crecimiento se una a su receptor afín y desencadene la vía de señalización, debe liberarse del predominio mediante un proceso de proteólisis, por lo que, hasta ese momento, el predominio actuará compitiendo con el receptor afín e impidiendo su unión (Sherbet, 2011; Miller & Hill, 2016; Hinck et al., 2016; Ratcliff et al., 2021).

En el presente trabajo se detectó en el embrión P56E9 un polimorfismo (chr12:7842840G>T) en heterocigosis del gen *GDF3* correspondiente a una mutación sin sentido que provocaría una proteína truncada en el aminoácido 243. Este embrión tuvo como resultado un embarazo bioquímico. La mutación detectada no ha sido descrita ni en homocigosis ni en heterocigosis en la base de datos de gnomAD, y según la predicción computacional su presencia en homocigosis sería deletérea. La mutación detectada se localiza en el predominio de la proteína, por lo que se podría llegar a hipotetizar que el predominio esté compitiendo con el receptor afín, impidiendo la unión de la proteína activa. Por lo tanto, no hay criterios suficientes para descartar que este polimorfismo pueda haber sido la causa del fallo de implantación.

En cuanto a aquellos polimorfismos que se han encontrado repetidos en más de un embrión, se identificaron el polimorfismo del gen ***MMACHC*** (chr1:45973216\*>A), que corresponde con un cambio en el marco de lectura por inserción que produciría una proteína truncada a partir del aminoácido 91 de los

282 aminoácidos que componen la proteína. Estaba presente en dos embriones en heterocigosis, P19E1 y P23E2. Esta variante está clasificada en ClinVar como patogénica ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/1421/?new\\_evidence=true](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/1421/?new_evidence=true)) y ha sido identificada en 81 individuos homocigotos y 86 individuos en heterocigosidad compuesta con aciduria metilmalónica y homocistinuria tipo cbIC, localizándose la proteína truncada 14 aminoácidos aguas abajo (Lerner-Ellis et al., 2006; Richard et al., 2009). Con estos resultados el uso de este polimorfismo por sí solo no sería relevante como biomarcador genético.

En cuanto al gen **RFT1**, se identificó el polimorfismo chr3:53164412C>T que corresponde a un cambio de sentido en el aminoácido 2, sustituyendo una glicina por una asparagina. Este polimorfismo fue detectado en 4 embriones no hermanos en heterocigosis: P19E1, P24E4, P38E2 y P54E9. Todos ellos dieron lugar a recién nacido vivo. Con respecto a esta mutación, en un principio fue considerada de significado incierto con relación a la enfermedad congénita de glicosilación ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/1421/?new\\_evidence=true](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/1421/?new_evidence=true)), pero estudios posteriores la han caracterizado como probablemente benigna

Por último, mencionar la identificación de otros dos polimorfismos localizados en un sitio de empalme (*splice site*) correspondientes a los genes **RFK** (chr9:79002447T>C) en el embrión P43E7 y **RBM19** (chr12:114352772A>G) en el embrión P74E1. Ninguno de estos polimorfismos ha sido descrito en la base de datos de gnomAD, aunque su presencia en heterocigosis ha dado lugar a dos embriones con una gestación evolutiva satisfactoria, por lo que su efecto deletéreo en heterocigosis está descartado, aunque se desconoce en efecto que podrían tener en homocigosis.

Teniendo en cuenta las mutaciones detectadas en el presente análisis y el total de embriones que no han llegado a implantar, es evidente que queda mucho trabajo por hacer. Por un lado, el aumento de embriones a analizar es crucial para obtener resultados y conclusiones más potentes. Para futuros experimentos, se ha propuesto incluir aquellos embriones de pacientes que se han sometido a un PGT-A combinado con un PGT-M para ampliar el número de casos. A su vez, esto permite reducir los fallos ADO, ya que en estos casos se utiliza una técnica de ampliación de ADN más compatible con los posteriores

análisis que se llevan a cabo en el panel Ampliseq pudiendo disponer de muestras de ADN de mayor calidad.

Por otro lado, la posibilidad de añadir nuevos genes al panel en base a estudios recientes publicados sobre etapas del desarrollo postimplantación es otro de los puntos objetivos que se pretende analizar (Gong et al., 2023), así como añadir la secuenciación de todo el gen en lugar de buscar regiones con polimorfismos concretos, que en parte dificulta la detección de embriones heterocigotos compuestos. Al aumentar el número de genes también se podría mejorar la selección teniendo en cuenta los niveles de expresión génica en base a estudios realizados tanto en el ser humano como en ratón con RNAseq (Yan et al., 2013; Groff et al., 2019).

Otro punto a tener en cuenta es la verificación de los resultados mediante PCR y secuenciación de Sanger, la cual se ha podido comprobar que es esencial es este tipo de investigaciones. Del mismo modo, la participación en el estudio de los progenitores y la posibilidad de analizar su ADN ha permitido la confirmación de los resultados obtenidos y la identificación de mutaciones generadas *de novo*, por lo que también se considera su inclusión en futuras investigaciones.

De todas formas, se ha podido observar casos clínicos en los que la paciente no ha conseguido una gestación tras un número elevado de transferencias embrionarias, por lo que cabe esperar la presencia de otros factores como puedan ser problemas endometriales, que siguen sin ser esclarecidos. Además, hay que tener en cuenta que las manipulaciones y el impacto al que se somete el embrión en las TRA no son las condiciones óptimas para su desarrollo y terminan afectando a la viabilidad embrionaria.

#### 6.4. Inteligencia artificial aplicada a las TRA

La inteligencia artificial está ganando terreno a pasos agigantados en los diferentes ámbitos que rodean al ser humano, solucionando nuevos problemas y acortando el tiempo de respuesta a muchos de los retos a los que se enfrenta. Todo ello gracias al desarrollo tecnológico de algoritmos avanzados, la acumulación masiva de datos y el poder del almacenamiento computacional a bajo coste (Ergen, 2019).

En los últimos años, la IA ha iniciado un camino de investigación en el campo de la reproducción asistida, con el propósito de crear una potente herramienta que pueda ser utilizada en las clínicas de fertilidad. Esta tecnología podría en unos años automatizar por completo las TRA, aunque su objetivo no pretende sustituir el trabajo médico, sino facilitar y optimizar su productividad. Entre sus posibilidades, además de lograr disminuir el problema de la subjetividad del observador, se encuentra la capacidad de poder ajustar los protocolos de medicación, realizar la selección y valoración de la calidad de los gametos y/o embriones, o ayudar en la selección de donantes entre otros. Sin embargo, también se enfrenta a barreras como la protección de datos, la legislación establecida, o la integración de la propia experiencia médica en la toma de decisiones clínicas, que impiden en cierta manera su completo avance y puesta en marcha (Kragh & Karstoft, 2021; Raimundo & Cabrita, 2021).

Ya son varios los trabajos que han aplicado esta herramienta para la selección de blastocistos euploides a partir de datos morfocinéticos recogidos en sistemas *time-lapse*, y a la vez de obtener datos prometedores, han encontrado limitaciones en cuanto al número de datos introducidos. Una cantidad masiva de datos es necesaria para fidelizar el algoritmo utilizado en estos sistemas y conseguir trasladar su aplicación a la práctica clínica (Nicolielo Barreto et al., 2022; Meseguer et al., 2022; Buldo-Licciardi et al., 2023; Cimadomo et al., 2023; Duval et al., 2023)

En el presente estudio, se ha realizado una prueba de la aplicación de esta tecnología en las TRA con el objetivo de seleccionar el mejor embrión a transferir en base a los datos clínicos, morfocinéticos y genéticos obtenidos durante la elaboración de esta tesis, además de incluir los datos genéticos cedidos por los estudios de investigación de la Dr. Cots (Cots, 2022). Esta tecnología tiene una fase de aprendizaje y otra de verificación, y el primer problema que hubo que solventar fue el de cumplir los criterios de inclusión necesarios para optimizar la fase de aprendizaje. Finalmente, de los 134 embriones de los que se disponía en este estudio, solo pudieron incluirse un total de 26 embriones (21 para la fase de aprendizaje y 5 para la de verificación), todos ellos con fertilidad probada, es decir que el útero de las pacientes había sido funcional en cuanto a receptividad endometrial, por lo que se eliminaba en gran parte el efecto deletéreo que causa

el factor endometrial sobre la implantación embrionaria. Teniendo en cuenta el escaso número de elementos introducidos para “entrenar” al sistema, la herramienta fue capaz de alcanzar un alto grado de presión.

El algoritmo con el que mejor resultados se obtuvo la clasificación embrionaria fue el árbol de toma de decisiones, aunque una vez más sería necesario probarlo con un mayor número de datos para potenciar estas conclusiones. Este algoritmo permite averiguar de qué forma “piensa” el sistema, es decir, en qué basa sus decisiones para elaborar la clasificación. De esta manera fue posible averiguar cuales habían sido las variables más representativas, entre las que se encontraban el tipo de blastocisto, esto es, blastocisto expandido, cavitado o realizando eclosión; la PC1, que correspondía a una variable genética; la edad de las donantes, que correspondía a la edad de la paciente sometida a punción ovocitaria para obtener los ovocitos, y la t3, una variable cinética que corresponden al número de horas en las que el embrión alcanza el estadio de 3 células desde la ICSI. De todas ellas, la variable genética PC1, ocupaba el segundo lugar, por lo que a partir de aquí sería interesante comprobar qué genes y polimorfismos están influyendo en esta variable. En cuanto a la variable cinética t3, ha sido la más destacada con respecto a otras como t2, t4, t5, tB o cc2. Este dato concuerda con otros estudios previos como los del grupo de Rubio o Basile, en los que analizaban la aplicación de la morfocinética como predictor de la implantación embrionaria, e identificaban t3 como el mejor predictor cinético (Basile et al., 2015; Rubio et al., 2014).

Estos resultados son prometedores y dejan constancia de que, con muy poca información utilizada, el sistema es capaz de generar resultados muy potentes, por lo que, a medida que avancen este tipo de investigaciones, la IA se convierte en una herramienta complementaria muy valiosa, y conforme aumenta el número de datos introducidos al sistema, el poder de predicción de cara a la selección embrionaria irá alcanzando una mayor precisión.

## 7. CONCLUSIONES

- Se ha identificado la presencia de diferentes polimorfismos genéticos en diferentes embriones que podrían ser la causa de un fallo en el desarrollo embrionario durante el periodo periimplantacional.
- Con los resultados obtenidos, se ha comprobado la necesidad de diseñar un panel de genes para investigar los SNPs más relevantes en el desarrollo embrionario una vez formado el blastocisto.
- La PCR convencional y el método de secuenciación de Sanger son un requisito indispensable para poder verificar los resultados del panel.
- A partir del ADN de los progenitores pueden identificarse mutaciones generadas *de novo*, por lo que su participación en este tipo de proyectos es esencial para diferenciar el origen de los SNPs.
- El efecto ADO podría ser el causante de la aparición de falsos homocigotos, que con la mejora y/o el aumento de la calidad de las muestras de ADN se lograría su reducción.
- Los resultados preliminares del modelo de IA obtenidos arrojan un futuro muy prometedor, teniendo en cuenta el tamaño de muestras tan reducido que se ha utilizado en el estudio preliminar realizado.
- Un modelo basado en un árbol de toma de decisiones parece ser el algoritmo más adecuado, siendo las meta-variables “tipo de blastocisto, PC1, edad de las donantes y t3” las más representativas.
- Es necesario obtener mayor número muestral, tanto para verificar los resultados obtenidos con relación a SNPs deletéreos, como para el entrenamiento y validación del sistema de IA.

## 8. ABREVIATURAS

AB: aborto

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADO: drop-out alélico

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

ASEBIR: asociación para el estudio de la biología de la reproducción

BQ: bioquímico

CCO: complejo cúmulo oóforo

CTB: citotrofoblasto

DET: transferencia de dos embriones

EMs: endometriosis

EMT: transición epitelio-mesénquima

EPI: epiblasto

FIV: fecundación *in vitro*

FIV-ET: fecundación in vitro y transferencia embrionaria

FSH: hormona estimuladora de folículos

GnRH: hormona liberadora de gonadotropinas

hCG: gonadotropina coriónica humana

HDL: lipoproteínas de alta densidad

IA: inteligencia artificial

ICSI: inyección intracitoplasmática del espermatozoide

IMHOTEP: herramienta de predicción funcional de SNPs no sinónimos

INE: instituto nacional de estadística

KD: *knock down*

KO: *knock out*

LIF: factor inhibidor de la leucemia

MCI: masa celular interna

miRNA: micro ácido ribonucleico

MNVs: variación de múltiples nucleótidos

NGS: secuenciación de segunda generación

niPGT-A: análisis genético preimplantacional para aneuploidías no invasivo

OMS: organización mundial de la salud

PC: componente principal

PCA: análisis de componentes principales

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PGT: análisis genético preimplantacional

PGT-A: análisis genético preimplantacional de aneuploidías

PGT-M: análisis genético preimplantacional de enfermedades monogénicas

PGT-SR: análisis genético preimplantacional de anomalías estructurales

PLC-zeta: factor fosfolipasa C zeta

pLI: probabilidad de ser intolerante a la pérdida de función

PrE: endodermo primitivo o hipoblasto

RA: reproducción asistida

RIF: fallo repetido de implantación

RNAseq: secuenciación de ácido ribonucleico

RNV: recién nacido vivo

SEF: sociedad española de fertilidad

SET: transferencia de un embrión

SNPs: polimorfismo de un único nucleótido

STB: sincitiotrofoblasto

TE: trofoectodermo

TRA: técnicas de reproducción asistida

UTJ: unión útero-tubárica

WES: secuenciación de exoma completo

WGS: secuenciación de genoma completo

ZP: zona pelúcida

## 9. ANEXO

*Anexo 1: Polimorfismos no deletéreos presentados en homocigosis*

	<b>Localización</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Gen</b>
1	chr1-199996685	C-G	NR5A2
2	chr1-199996821	AT-A	NR5A2
3	chr1-199996821	ATT-A	NR5A2
4	chr1-199997218	CA-C	NR5A2
5	chr1-200008941	G-T	NR5A2
6	chr1-200013123	C-A	NR5A2
7	chr1-200014560	C-T	NR5A2
8	chr1-200014762	A-G	NR5A2
9	chr1-200014766	G-T	NR5A2
10	chr1-200014790	A-G	NR5A2
11	chr1-200017586	C-G	NR5A2
12	chr1-200055509	G-A	NR5A2
13	chr1-200055535	T-G	NR5A2
14	chr1-200080463	C-T	NR5A2
15	chr1-200080463	CCA-TCAA	NR5A2
16	chr1-200089872	C-T	NR5A2
17	chr1-200090120	G-A	NR5A2
18	chr1-200143281	C-T	NR5A2
19	chr1-200143442	T-C	NR5A2
20	chr1-200143844	C-G	NR5A2
21	chr1-200143844	CAG-GAG	NR5A2
22	chr1-200144089	T-G	NR5A2
23	chr1-200145509	G-A	NR5A2

Continúa

	<b>Localización</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Gen</b>
24	chr1-200145533	G-A	NR5A2
25	chr1-200145662	G-T	NR5A2
26	chr1-200145893	A-G	NR5A2
27	chr1-200146493	GAAT-GAT	NR5A2
28	chr3-53164193	C-T	RFT1
29	chr7-154745910	GAA-GA	PAXIP1
30	chr9-107544700	C-T	ABCA1
31	chr9-107545156	G-A	ABCA1
32	chr9-107545903	G-A	ABCA1
33	chr9-107562804	T-C	ABCA1
34	chr9-107564217	T-C	ABCA1
35	chr9-107566877	C-A	ABCA1
36	chr9-107568503	C-T	ABCA1
37	chr9-107568773	A-C	ABCA1
38	chr9-107576563	A-G	ABCA1
39	chr9-107576665	A-G	ABCA1
40	chr9-107578529	T-C	ABCA1
41	chr9-107579632	C-G	ABCA1
42	chr9-107586753	T-C	ABCA1
43	chr9-107591221	A-G	ABCA1
44	chr9-107591272	G-T	ABCA1
45	chr9-107593182	A-T	ABCA1
46	chr9-107599412	AAGG-A	ABCA1
47	chr9-107599438	G-GC	ABCA1
48	chr9-107602665	GC-GT	ABCA1
49	chr9-107607763	G-C	ABCA1
50	chr9-107620867	C-T	ABCA1

Continua

	<b>Localización</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Gen</b>
<b>51</b>	chr9-107624029	C-T	ABCA1
<b>52</b>	chr9-107624242	A-G	ABCA1
<b>53</b>	chr9-107651495	A-T	ABCA1
<b>54</b>	chr9-107651526	A-G	ABCA1
<b>55</b>	chr9-107665978	C-G	ABCA1
<b>56</b>	chr9-107666035	G-GC	ABCA1
<b>57</b>	chr9-107690450	G-A	ABCA1
<b>58</b>	chr11-46742489	A-G	F2
<b>59</b>	chr11-46744925	G-C	F2
<b>60</b>	chr11-46745003	C-T	F2
<b>61</b>	chr11-46747979	T-C	F2
<b>62</b>	chr11-46749648	G-A	F2
<b>63</b>	chr11-46760756	G-A	F2
<b>64</b>	chr16-46723598	T-C	ORC6
<b>65</b>	chr17-2203348	T-C	SMG6
<b>66</b>	chr17-2203453	A-G	SMG6

**10. BIBLIOGRAFÍA**

1. Achache, H., & Revel, A. (2006). Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. *Human reproduction update*, 12(6), 731-746.
2. Afshar, Y., Stanculescu, A., Miele, L., & Fazleabas, A. T. (2007). The role of chorionic gonadotropin and Notch1 in implantation. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 24, 296-302.
3. Agarwal, A., Baskaran, S., Parekh, N., Cho, C. L., Henkel, R., Vij, S., ... & Shah, R. (2021). Male infertility. *The Lancet*, 397(10271), 319-333.
4. Agarwal, A., Mulgund, A., Hamada, A., & Chyatte, M. R. (2015). A unique view on male infertility around the globe. *Reproductive biology and endocrinology*, 13(1), 1-9.
5. Aghajanova, L., Stavreus-Evers, A., Nikas, Y., Hovatta, O., & Landgren, B. M. (2003). Coexpression of pinopodes and leukemia inhibitory factor, as well as its receptor, in human endometrium. *Fertility and sterility*, 79, 808-814.
6. Aiello, R. J., Brees, D., & Francone, O. L. (2003). ABCA1-deficient mice: insights into the role of monocyte lipid efflux in HDL formation and inflammation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 23(6), 972-980.
7. Ajduk, A., & Zernicka-Goetz, M. (2012). Advances in embryo selection methods. *F1000 Biology Reports*, 4.
8. Alarcon, V. B., & Marikawa, Y. (2022). Trophectoderm formation: regulation of morphogenesis and gene expressions by RHO, ROCK, cell polarity, and HIPPO signaling. *Reproduction*, 164(4), R75-R86.
9. Alda-Catalinas, C., Bredikhin, D., Hernando-Herraez, I., Santos, F., Kubinyecz, O., Eckersley-Maslin, M. A., ... & Reik, W. (2020). A single-cell transcriptomics CRISPR-activation screen identifies epigenetic regulators of the zygotic genome activation program. *Cell Systems*, 11(1), 25-41.
10. Ali, Y. O., Radwan, S. M., Saeed, A. M., & El-Mesallamy, H. O. (2023). Golgi signalling proteins GOLPH3, MYO18A, PITPNC1 and RAB1B: implications in prognosis and survival outcomes of AML patients. *Biomarkers*, 1-9.

11. Andersson, O., Korach-Andre, M., Reissmann, E., Ibáñez, C. F., & Bertolino, P. (2008). Growth/differentiation factor 3 signals through ALK7 and regulates accumulation of adipose tissue and diet-induced obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(20), 7252-7256.
12. Aplin, J. D., & Ruane, P. T. (2017). Embryo–epithelium interactions during implantation at a glance. *Journal of cell science*, 130(1), 15-22.
13. Artzt, K. (2012). Mammalian developmental genetics in the twentieth century. *Genetics*, 192(4), 1151-1163.
14. Asami, M., Lam, B. Y., Ma, M. K., Rainbow, K., Braun, S., VerMilyea, M. D., ... & Perry, A. C. (2022). Human embryonic genome activation initiates at the one-cell stage. *Cell Stem Cell*, 29(2), 209-216.
15. Azizi, E., Mofarahe, Z. S., & Naji, M. (2023). MicroRNAs, small regulatory elements with significant effects on human implantation: a review. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 1-21.
16. Babu, J. R., Jeganathan, K. B., Baker, D. J., Wu, X., Kang-Decker, N., & Van Deursen, J. M. (2003). Rae1 is an essential mitotic checkpoint regulator that cooperates with Bub3 to prevent chromosome missegregation. *The Journal of cell biology*, 160(3), 341-353.
17. Balaban, B., Brison, D., Calderon, G., Catt, J., Conaghan, J., Cowan, L., ... & Van den Abbeel, E. (2011). Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Reproductive BioMedicine Online*, 22(6), 632-646.
18. Balaban, B., Urman, B., Isiklar, A., Alatas, C., Aksoy, S., Mercan, R., ... & Nuhoglu, A. (2001). The effect of pronuclear morphology on embryo quality parameters and blastocyst transfer outcome. *Human Reproduction*, 16(11), 2357-2361.
19. Barnhart, K., Dunsmoor-Su, R., & Coutifaris, C. (2002). Effect of endometriosis on in vitro fertilization. *Fertility and sterility*, 77(6), 1148-1155.
20. Barratt, C. L., Björndahl, L., De Jonge, C. J., Lamb, D. J., Osorio Martini, F., McLachlan, R., ... & Tournaye, H. (2017). The diagnosis of male infertility: an analysis of the evidence to support the development of global WHO guidance—challenges and future research opportunities. *Human reproduction update*, 23(6), 660-680.

21. Bashiri, A., Halper, K. I., & Orvieto, R. (2018). Recurrent Implantation Failure—update overview on etiology, diagnosis, treatment and future directions. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 16, 1-18.
22. Basile, N., Vime, P., Florensa, M., Aparicio Ruiz, B., Garcia Velasco, J. A., Remohí, J., & Meseguer, M. (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), 276-283.
23. Bedford, J. M. (1977). Sperm/egg interaction: the specificity of human spermatozoa. *The Anatomical Record*, 188(4), 477-487.
24. Bedzhov, I. & Zernicka-Goetz, M. (2014). Self-organizing properties of mouse pluripotent cells initiate morphogenesis upon implantation. *Cell* 156, 1032–1044.
25. Bedzhov, I., Leung, C. Y., Bialecka, M. & Zernicka-Goetz, M. (2014). In vitro culture of mouse blastocysts beyond the implantation stages. *Nature Protocols* 9, 2732–2739.
26. Benirschke, K. (1973). *The human placenta*. JD Boyd and WJ Hamilton. Heffer, Cambridge, 365 pp. 1970.
27. Berg, D. K., Smith, C. S., Pearton, D. J., Wells, D. N., Broadhurst, R., Donnison, M., & Pfeffer, P. L. (2011). Trophectoderm lineage determination in cattle. *Developmental cell*, 20(2), 244-255.
28. Besenbacher, S., Sulem, P., Helgason, A., Helgason, H., Kristjansson, H., Jonasdottir, A., ... & Stefansson, K. (2016). Multi-nucleotide de novo mutations in humans. *PLoS genetics*, 12(11), e1006315.
29. Best, D., & Bhattacharya, S. (2015). Obesity and fertility. *Hormone molecular biology and clinical investigation*, 24(1), 5-10.
30. Bhakta, H. H., Refai, F. H., & Avella, M. A. (2019). The molecular mechanisms mediating mammalian fertilization. *Development*, 146(15), dev176966.
31. Biadasiewicz, K., Sonderegger, S., Haslinger, P., Haider, S., Saleh, L., Fiala, C., ... & Knöfler, M. (2011). Transcription factor AP-2 $\alpha$  promotes EGF-dependent invasion of human trophoblast. *Endocrinology*, 152(4), 1458-1469.
32. Bianchi, E., & Wright, G. J. (2016). Sperm meets egg: the genetics of mammalian fertilization. *Annual review of genetics*, 50, 93-111.

33. Bianchi, E., & Wright, G. J. (2020). Find and fuse: Unsolved mysteries in sperm–egg recognition. *PLoS biology*, 18(11), e3000953.
34. Bianchi, E., Sun, Y., Almansa-Ordonez, A., Woods, M., Goulding, D., Martinez-Martin, N., & Wright, G. J. (2021). Control of oviductal fluid flow by the G-protein coupled receptor *Adgrd1* is essential for murine embryo transit. *Nature communications*, 12(1), 1251.
35. Biggers, J. D. (2012). IVF and embryo transfer: historical origin and development. *Reproductive biomedicine online*, 25(2), 118-127.
36. Biondic, S., Canizo, J., Vandal, K., Zhao, C., & Petropoulos, S. (2023). Cross-species comparison of mouse and human preimplantation development with an emphasis on lineage specification. *Reproduction*, 165(4), R103-R116.
37. Bissig, C., Hurbain, I., Raposo, G., & van Niel, G. (2017). PIKfyve activity regulates reformation of terminal storage lysosomes from endolysosomes. *Traffic*, 18(11), 747-757.
38. Björndahl, L., & Brown, J. K. (2022). The sixth edition of the WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen: ensuring quality and standardization in basic examination of human ejaculates. *Fertility and sterility*, 117(2), 246-251.
39. Blakeley, P., Fogarty, N. M., Del Valle, I., Wamaitha, S. E., Hu, T. X., Elder, K., ... & Niakan, K. K. (2015). Defining the three cell lineages of the human blastocyst by single-cell RNA-seq. *Development*, 142(18), 3151-3165.
40. Blower, M. D., Nachury, M., Heald, R., & Weis, K. (2005). A Rae1-containing ribonucleoprotein complex is required for mitotic spindle assembly. *Cell*, 121(2), 223-234.
41. Bodzioch, M., Orsó, E., Klucken, J., Langmann, T., Böttcher, A., Diederich, W., ... & Schmitz, G. (1999). The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nature genetics*, 22(4), 347-351.
42. Boedt, T., Vanhove, A. C., Vercoe, M. A., Matthys, C., Dancet, E., & Lie Fong, S. (2021). Preconception lifestyle advice for people with infertility. *The Cochrane database of systematic reviews*, 4(4), CD008189.
43. Boivin, J., Bunting, L., Collins, J. A., & Nygren, K. G. (2007). International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Human reproduction*, 22(6), 1506-1512.

44. Boroviak, T., & Nichols, J. (2017). Primate embryogenesis predicts the hallmarks of human naïve pluripotency. *Development*, 144(2), 175-186.
45. Boroviak, T., Stirparo, G. G., Dietmann, S., Hernando-Herraez, I., Mohammed, H., Reik, W., ... & Bertone, P. (2018). Single cell transcriptome analysis of human, marmoset and mouse embryos reveals common and divergent features of preimplantation development. *Development*, 145(21), dev167833.
46. Boutari, C., Pappas, P. D., Mintziori, G., Nigdelis, M. P., Athanasiadis, L., Goulis, D. G., & Mantzoros, C. S. (2020). The effect of underweight on female and male reproduction. *Metabolism*, 107, 154229.
47. Bracke, A., Peeters, K., Punjabi, U., Hoogewijs, D., & Dewilde, S. (2018). A search for molecular mechanisms underlying male idiopathic infertility. *Reproductive biomedicine online*, 36(3), 327-339.
48. Braude, P., Bolton, V., & Moore, S. (1988). Human gene expression first occurs between the four-and eight-cell stages of preimplantation development. *Nature*, 332, 459-461.
49. Brennan, P. (2018). drawProteins: a Bioconductor/R package for reproducible and.
50. Brezina, P. R., & Kutteh, W. H. (2015). Clinical applications of preimplantation genetic testing. *Bmj*, 350.
51. Brook, J. G., Lees, R. S., Yules, J. H., & Cusack, B. (1977). Tangier disease ( $\alpha$ -lipoprotein deficiency). *Jama*, 238(4), 332-334.
52. Brown, J. A., Bharathi, A., Ghosh, A., Whalen, W., Fitzgerald, E., & Dhar, R. (1995). A Mutation in the *Schizosaccharomyces pombe* rae1 Gene Causes Defects in Poly (A)<sup>+</sup> RNA Export and in the Cytoskeleton (\*). *Journal of Biological Chemistry*, 270(13), 7411-7419.
53. Buldo-Licciardi, J., Large, M. J., McCulloh, D. H., McCaffrey, C., & Grifo, J. A. (2023). Utilization of standardized preimplantation genetic testing for aneuploidy (PGT-A) via artificial intelligence (AI) technology is correlated with improved pregnancy outcomes in single thawed euploid embryo transfer (STEET) cycles. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 1-11.
54. Burkart, A. D., Xiong, B., Baibakov, B., Jiménez-Movilla, M., & Dean, J. (2012). Ovastacin, a cortical granule protease, cleaves ZP2 in the zona pellucida to prevent polyspermy. *Journal of Cell Biology*, 197(1), 37-44.

55. Buschman, M. D., & Field, S. J. (2018). MYO18A: An unusual myosin. *Advances in biological regulation*, 67, 84-92.
56. Busnelli, A., Reschini, M., Cardellicchio, L., Vegetti, W., Somigliana, E., & Vercellini, P. (2020). How common is real repeated implantation failure? An indirect estimate of the prevalence. *Reproductive BioMedicine Online*, 40(1), 91-97.
57. Cammas, F., Mark, M., Dollé, P., Dierich, A., Chambon, P., & Losson, R. (2000). Mice lacking the transcriptional corepressor TIF1beta are defective in early postimplantation development. *Development*, 127(13), 2955-2963.
58. Campbell, A., Fishel, S., Bowman, N., Duffy, S., Sedler, M., & Hickman, C. F. L. (2013). Modelling a risk classification of aneuploidy in human embryos using non-invasive morphokinetics. *Reproductive biomedicine online*, 26(5), 477-485.
59. Canovas, S., & Coy, P. (2018). Epigenetic Reprogramming in Early Embryo Development. In *Epigenetics and Assisted Reproduction* (pp. 29-49). CRC Press.
60. Capalbo, A., Poli, M., Riera-Escamilla, A., Shukla, V., Kudo Høffding, M., Krausz, C., ... & Simon, C. (2021). Preconception genome medicine: current state and future perspectives to improve infertility diagnosis and reproductive and health outcomes based on individual genomic data. *Human reproduction update*, 27(2), 254-279.
61. Capalbo, A., Ubaldi, F. M., Cimadomo, D., Maggiulli, R., Patassini, C., Dusi, L., ... & Rienzi, L. (2016). Consistent and reproducible outcomes of blastocyst biopsy and aneuploidy screening across different biopsy practitioners: a multicentre study involving 2586 embryo biopsies. *Human reproduction*, 31(1), 199-208.
62. Carlson, B. M. (2019). *Embriología humana y biología del desarrollo*. Elsevier.
63. Carson, S. A., & Kallen, A. N. (2021). Diagnosis and management of infertility: a review. *Jama*, 326(1), 65-76.
64. Carvalho, F., Coonen, E., Goossens, V., Kokkali, G., Rubio, C., ... & De Rycke, M. ESHRE PGT Consortium Steering Committee (2020). ESHRE PGT Consortium good practice recommendations for the organisation of PGT. *Human reproduction open*, 2020(3), hoaa021.

65. Chambers, G. M., Dyer, S., Zegers-Hochschild, F., de Mouzon, J., Ishihara, O., Banker, M., ... & Adamson, G. D. (2021). International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technologies world report: assisted reproductive technology, 2014. *Human Reproduction*, 36(11), 2921-2934.
66. Charalambous, C., Webster, A., & Schuh, M. (2023). Aneuploidy in mammalian oocytes and the impact of maternal ageing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 24(1), 27-44.
67. Chaudhuri, A. (2023). Polycystic ovary syndrome: Causes, symptoms, pathophysiology, and remedies. *Obesity Medicine*, 100480.
68. Chavez, S. L., Loewke, K. E., Han, J., Moussavi, F., Colls, P., Munne, S., ... & Reijo Pera, R. A. (2012). Dynamic blastomere behaviour reflects human embryo ploidy by the four-cell stage. *Nature communications*, 3(1), 1251.
69. Chazaud, C., & Yamanaka, Y. (2016). Lineage specification in the mouse preimplantation embryo. *Development*, 143(7), 1063-1074.
70. Che, Y., Yu, J., Li, Y. S., Zhu, Y. C., & Tao, T. (2023). Polycystic Ovary Syndrome: Challenges and Possible Solutions. *Journal of Clinical Medicine*, 12(4), 1500.
71. Chen, C., Ware, S. M., Sato, A., Houston-Hawkins, D. E., Habas, R., Matzuk, M. M., ... & Brown, C. W. (2006). The Vg1-related protein Gdf3 acts in a Nodal signaling pathway in the pre-gastrulation mouse embryo. *Development*, 133(2): 319-29.
72. Chen, H. F., Chen, M., & Ho, H. N. (2020). An overview of the current and emerging platforms for preimplantation genetic testing for aneuploidies (PGT-A) in in vitro fertilization programs. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*, 59(4), 489-495.
73. Chen, J., Jia, L., Li, T., Guo, Y., He, S., Zhang, Z., ... & Fang, C. (2021). Diagnostic efficiency of blastocyst culture medium in noninvasive preimplantation genetic testing. *F&S Reports*, 2(1), 88-94.
74. Chen, T., Bian, Y., Liu, X., Zhao, S., Wu, K., Yan, L., ... & Chen, Z. J. (2017). A recurrent missense mutation in ZP3 causes empty follicle syndrome and female infertility. *The American Journal of Human Genetics*, 101(3), 459-465.
75. Chow, C. Y., Zhang, Y., Dowling, J. J., Jin, N., Adamska, M., Shiga, K., ... & Meisler, M. H. (2007). Mutation of FIG4 causes neurodegeneration in the pale tremor mouse and patients with CMT4J. *Nature*, 448(7149), 68-72.

76. Christiansen-Weber, T. A., Volland, J. R., Wu, Y., Ngo, K., Roland, B. L., Nguyen, S., ... & Fung-Leung, W. P. (2000). Functional loss of ABCA1 in mice causes severe placental malformation, aberrant lipid distribution, and kidney glomerulonephritis as well as high-density lipoprotein cholesterol deficiency. *The American journal of pathology*, 157(3), 1017-1029.
77. Cimadomo, D., Capalbo, A., Ubaldi, F. M., Scarica, C., Palagiano, A., Canipari, R., & Rienzi, L. (2016). The impact of biopsy on human embryo developmental potential during preimplantation genetic diagnosis. *BioMed research international*, 7193075.
78. Cimadomo, D., Chiappetta, V., Innocenti, F., Saturno, G., Taggi, M., Marconetto, A., ... & Rienzi, L. (2023). Towards Automation in IVF: Pre-Clinical Validation of a Deep Learning-Based Embryo Grading System during PGT-A Cycles. *Journal of Clinical Medicine*, 12(5), 1806.
79. Clift, D., & Schuh, M. (2013). Restarting life: fertilization and the transition from meiosis to mitosis. *Nature reviews Molecular cell biology*, 14(9), 549-562.
80. Cockburn, K., & Rossant, J. (2010). Making the blastocyst: lessons from the mouse. *The Journal of clinical investigation*, 120(4), 995-1003.
81. Cole, L. A. (2010). Biological functions of hCG and hCG-related molecules. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 8(1), 1-14.
82. Collins, J. A. (2002). An international survey of the health economics of IVF and ICSI. *Human reproduction update*, 8(3), 265-277.
83. Coticchio, G., Lagalla, C., Sturmey, R., Pennetta, F., & Borini, A. (2019). The enigmatic morula: mechanisms of development, cell fate determination, self-correction and implications for ART. *Human reproduction update*, 25(4), 422-438.
84. Cots Rodríguez, P. (2022). Estudio de la expresión génica y polimorfismos relacionados con la espermatogénesis y la infertilidad. Proyecto de investigación.
85. Coughlan, C., Ledger, W., Wang, Q., Liu, F., Demirel, A., Gurgan, T., ... & Li, T. C. (2014). Recurrent implantation failure: definition and management. *Reproductive biomedicine online*, 28(1), 14-38.
86. Coulam, C. B., Bustillo, M., & Schulman, J. D. (1986). Empty follicle syndrome. *Fertility and sterility*, 46(6), 1153-1155.

87. Cox, C. M., Thoma, M. E., Tchangalova, N., Mburu, G., Bornstein, M. J., Johnson, C. L., & Kiarie, J. (2022). Infertility prevalence and the methods of estimation from 1990 to 2021: a systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction Open*, 2022(4), hoac051.
88. Coy, P., García-Vázquez, F. A., Visconti, P. E., & Avilés, M. (2012). Roles of the oviduct in mammalian fertilization. *Reproduction*, 144(6), 649-660.
89. Curchoe, C. L. (2021). The paper chase and the big data arms race. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 38(7), 1613-1615.
90. Daneshi, M., Naderi, T., Tabibian, S., Shams, M., Rashidpanah, J., & Dorgalaleh, A. (2018). Congenital prothrombin deficiency. *Journal of Cellular & Molecular Anesthesia*, 3(4), 146-154.
91. Davies, J. (2017). Using synthetic biology to explore principles of development. *Development*, 144(7), 1146-1158.
92. De Masson, A., Giustiniani, J., Marie-Cardine, A., Bouaziz, J. D., Dulphy, N., Gossot, D., ... & Bensussan, A. (2016). Identification of CD245 as myosin 18A, a receptor for surfactant A: A novel pathway for activating human NK lymphocytes. *Oncoimmunology*, 5(5), e1127493.
93. De Mouzon, J., Goossens, V., Bhattacharya, S., Castilla, J. A., Ferraretti, A. P., Korsak, V., ... & Consortium for the European Society on Human Reproduction and Embryology (ESHRE). (2012). Assisted reproductive technology in Europe, 2007: results generated from European registers by ESHRE. *Human Reproduction*, 27(4), 954-966.
94. de Oliveira Rodrigues, V., Polisseni, F., Pannain, G. D., & Carvalho, M. A. G. (2020). Genetics in human reproduction. *JBRA Assisted Reproduction*, 24(4), 480.
95. De Paepe, C., Cauffman, G., Verloes, A., Sterckx, J., Devroey, P., Tournaye, H., ... & Van de Velde, H. (2013). Human trophectoderm cells are not yet committed. *Human reproduction*, 28(3), 740-749.
96. De Rycke, M., Goossens, V., Kokkali, G., Meijer-Hoogeveen, M., Coonen, E., & Moutou, C. (2017). ESHRE PGD Consortium data collection XIV–XV: cycles from January 2011 to December 2012 with pregnancy follow-up to October 2013. *Human Reproduction*, 32(10), 1974-1994.

97. Dean, J. (2014). A ZP2 cleavage model of gamete recognition and the postfertilization block to polyspermy. *Sexual Reproduction in Animals and Plants* (pp. 401-408).
98. Demko, Z. P., Simon, A. L., McCoy, R. C., Petrov, D. A., & Rabinowitz, M. (2016). Effects of maternal age on euploidy rates in a large cohort of embryos analyzed with 24-chromosome single-nucleotide polymorphism-based preimplantation genetic screening. *Fertility and sterility*, 105(5), 1307-1313.
99. Deyheul, N., Mohamaddoost, T. and Hossini, M. (2017). Infertility related risk factors: A systematic review. *International Journal of women health and reproduction science*, 5 (1): 24-29.
100. Dimitriadis, F., Adonakis, G., Kaponis, A., Mamoulakis, C., Takenaka, A., & Sofikitis, N. (2017). Pre-testicular, testicular, and post-testicular causes of male infertility. *Endocrinology of the testis and male reproduction*, 1, 981.
101. Dimitriadis, I., Zaninovic, N., Badiola, A.C., Bormann, C.L. (2022). Artificial intelligence in the embryology laboratory: a review. *Reproductive Biomedicine Online*, 44(3):435-448.
102. Dorfman, S. F. (2008). Tobacco and fertility: our responsibilities. *Fertility and sterility*, 89(3), 502-504.
103. Dove, A. W. (2003). A model of missegregation. *The Journal of Cell Biology*, 160(3), 284.
104. Du, Q. Y., Wang, E. Y., Huang, Y., Guo, X. Y., Xiong, Y. J., Yu, Y. P., ... & Sun, Y. P. (2016). Blastocoele expansion degree predicts live birth after single blastocyst transfer for fresh and vitrified/warmed single blastocyst transfer cycles. *Fertility and Sterility*, 105(4), 910-919.
105. Duffy, J. M. N., Adamson, G. D., Benson, E., Bhattacharya, S., Bhattacharya, S., Bofill, M., ... & Farquhar, C. M. (2020). Top 10 priorities for future infertility research: an international consensus development study. *Human Reproduction*, 35(12), 2715-2724.
106. Duval, A., Nogueira, D., Dissler, N., Maskani Filali, M., Delestro Matos, F., Chansel-Debordeaux, L., ... & Boussommier-Calleja, A. (2023). A hybrid artificial intelligence model leverages multi-centric clinical data to improve fetal heart rate pregnancy prediction across time-lapse systems. *Human Reproduction*, 38(4), 596-608.

107. Eckersley-Maslin, M. A., Alda-Catalinas, C., & Reik, W. (2018). Dynamics of the epigenetic landscape during the maternal-to-zygotic transition. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(7), 436-450.
108. Eckersley-Maslin, M., Alda-Catalinas, C., Blotenburg, M., Kreibich, E., Krueger, C., & Reik, W. (2019). Dppa2 and Dppa4 directly regulate the Dux-driven zygotic transcriptional program. *Genes & development*, 33(3-4), 194-208.
109. Edwards, R. G., Bavister, B. D., & Steptoe, P. C. (1969). Early stages of fertilization in vitro of human oocytes matured in vitro. *Nature*, 221, 632-635.
110. Edwards, R. G., Fishel, S. B., Cohen, J., Fehilly, C. B., Purdy, J. M., Slater, J. M., ... & Webster, J. M. (1984). Factors influencing the success of in vitro fertilization for alleviating human infertility. *Journal of In Vitro Fertilization and Embryo Transfer*, 1, 3-23.
111. Edwards, R. G., Steptoe, P. C., & Purdy, J. M. (1970). Fertilization and cleavage in vitro of preovulator human oocytes. *Nature*, 227, 1307-1309.
112. Eijkemans, M. J., Van Poppel, F., Habbema, D. F., Smith, K. R., Leridon, H., & Te Velde, E. R. (2014). Too old to have children? Lessons from natural fertility populations. *Human Reproduction*, 29(6), 1304-1312.
113. Eldarov, C., Gamisonia, A., Chagovets, V., Ibragimova, L., Yarigina, S., Smolnikova, V., ... & Bobrov, M. (2022). LC-MS analysis revealed the significantly different metabolic profiles in spent culture media of human embryos with distinct morphology, karyotype and implantation outcomes. *International journal of molecular sciences*, 23(5), 2706.
114. Enders, A. C., & Schlafke, S. (1967). A morphological analysis of the early implantation stages in the rat. *American Journal of Anatomy*, 120(2), 185-225.
115. Ergen, M. (2019). What is artificial intelligence? Technical considerations and future perception. *Anatolian Journal of Cardiology*, 22(2), 5-7.
116. Evers, J. L. (2002). Female subfertility. *The lancet*, 360(9327), 151-159.
117. Ezzati, M., Djahanbakhch, O., Arian, S., & Carr, B. R. (2014). Tubal transport of gametes and embryos: a review of physiology and pathophysiology. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 31, 1337-1347.

118. Faddy, M. J., Gosden, M. D., & Gosden, R. G. (2018). A demographic projection of the contribution of assisted reproductive technologies to world population growth. *Reproductive biomedicine online*, 36(4), 455-458.
119. Fahrenkamp, E., Algarra, B., & Jovine, L. (2020). Mammalian egg coat modifications and the block to polyspermy. *Molecular Reproduction and Development*, 87(3), 326-340.
120. Feng, R., Yan, Z., Li, B., Yu, M., Sang, Q., Tian, G., ... & Wang, L. (2016). Mutations in TUBB8 cause a multiplicity of phenotypes in human oocytes and early embryos. *Journal of medical genetics*, 53(10), 662-671.
121. Festuccia, N., Vandormael-Pournin, S., Chervova, A., Geiselman, A. M., Langa-Vives, F., Coux, R. X., ... & Navarro, P. (2023). Nr5a2 is essential for morula development. *bioRxiv*, 2023-01.
122. Fierro-González, J. C., White, M. D., Silva, J. C., & Plachta, N. (2013). Cadherin-dependent filopodia control preimplantation embryo compaction. *Nature Cell Biology*, 15(12), 1424-1433.
123. Firmin, J., & Maître, J. L. (2021, December). Morphogenesis of the human preimplantation embryo: bringing mechanics to the clinics. In *Seminars in Cell & Developmental Biology* (Vol. 120, pp. 22-31). Academic Press.
124. Firmin, J., Ecker, N., Danon, D. R., Lange, V. B., Turlier, H., Patrat, C., & Maître, J. L. (2022). Mechanics of human embryo compaction. *bioRxiv*.
125. Fleming, T. P., McConnell, J., Johnson, M. H., & Stevenson, B. R. (1989). Development of tight junctions de novo in the mouse early embryo: control of assembly of the tight junction-specific protein, ZO-1. *The Journal of cell biology*, 108(4), 1407-1418.
126. Franasiak, J. M., Forman, E. J., Hong, K. H., Werner, M. D., Upham, K. M., Treff, N. R., & Scott Jr, R. T. (2014). The nature of aneuploidy with increasing age of the female partner: a review of 15,169 consecutive trophectoderm biopsies evaluated with comprehensive chromosomal screening. *Fertility and sterility*, 101(3), 656-663.
127. Franasiak, J. M., Forman, E. J., Hong, K. H., Werner, M. D., Upham, K. M., Treff, N. R., & Scott, R. T. (2014). Aneuploidy across individual chromosomes at the embryonic level in trophectoderm biopsies: changes with patient age and chromosome structure. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 31, 1501-1509.

128. Friedenthal, J., Maxwell, S. M., Munné, S., Kramer, Y., McCulloh, D. H., McCaffrey, C., & Grifo, J. A. (2018). Next generation sequencing for preimplantation genetic screening improves pregnancy outcomes compared with array comparative genomic hybridization in single thawed euploid embryo transfer cycles. *Fertility and sterility*, 109(4), 627-632.
129. Fu, J., Warmflash, A., & Lutolf, M. P. (2021). Stem-cell-based embryo models for fundamental research and translation. *Nature materials*, 20(2), 132-144.
130. Gao, L., Wu, K., Liu, Z., Yao, X., Yuan, S., Tao, W., ... & Liu, J. (2018). Chromatin accessibility landscape in human early embryos and its association with evolution. *Cell*, 173(1), 248-259.
131. García-Pascual, C. M., Navarro-Sánchez, L., Ichikawa-Ceschin, I., Bakalova, D., Martínez-Merino, L., Simón, C., & Rubio, C. (2023). Cell-free DNA analysis in preimplantation genetic testing. *F&S Science*.
132. Gardner, D. K., & Balaban, B. (2016). Assessment of human embryo development using morphological criteria in an era of time-lapse, algorithms and 'OMICS': is looking good still important?. *MHR: Basic science of reproductive medicine*, 22(10), 704-718.
133. Garolla, A., Pizzol, D., Carosso, A. R., Borini, A., Ubaldi, F. M., Calogero, A. E., ... & Foresta, C. (2021). Practical clinical and diagnostic pathway for the investigation of the infertile couple. *Frontiers in Endocrinology*, 11, 1032.
134. Gasser, R. F., Cork, R. J., Stillwell, B. J., & McWilliams, D. T. (2014). Rebirth of human embryology. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 243(5), 621.
135. Gauster, M., Moser, G., Wernitznig, S., Kupper, N., & Huppertz, B. (2022). Early human trophoblast development: from morphology to function. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 79(6), 345.
136. Geldziler, B. D., Marcello, M. R., Shakes, D. C., & Singson, A. (2011). The genetics and cell biology of fertilization. *Methods in cell biology*, 106, 343-375.
137. Gerri, C., Menchero, S., Mahadevaiah, S. K., Turner, J. M., & Niakan, K. K. (2020). Human embryogenesis: a comparative perspective. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 36, 411-440.
138. Ghimire, S., Mantziou, V., Moris, N., & Arias, A. M. (2021). Human gastrulation: The embryo and its models. *Developmental biology*, 474, 100-108.

139. Glatstein, I., Chavez-Badiola, A., & Curchoe, C. L. (2023). New frontiers in embryo selection. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 1-12.
140. Gleicher, N., & Orvieto, R. (2017). Is the hypothesis of preimplantation genetic screening (PGS) still supportable? A review. *Journal of ovarian research*, 10(1), 1-7.
141. Gleicher, N., Patrizio, P., & Brivanlou, A. (2021). Preimplantation genetic testing for aneuploidy—a castle built on sand. *Trends in molecular medicine*, 27(8), 731-742.
142. Gleicher, N., Patrizio, P., Mochizuki, L., & Barad, D. H. (2023). Previously reported and here added cases demonstrate euploid pregnancies followed by PGT-A as “mosaic” as well as “aneuploid” designated embryos. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 21(1), 1-5.
143. Godini, R., & Fallahi, H. (2019). Dynamics changes in the transcription factors during early human embryonic development. *Journal of Cellular Physiology*, 234(5), 6489-6502.
144. Gong, Y., Bai, B., Sun, N., ... & Wu, J., Chen, Y., Tan, T. (2023). Ex utero monkey embryogenesis from blastocyst to early organogenesis. *Cell*, 186(10), 2092-2110.
145. Grandone, E., Tiscia, G. L., Mastroianno, M., Larciprete, G., Kovac, M., Tamborini Permunian, E., ... & Margaglione, M. (2021). Findings from a multicentre, observational study on reproductive outcomes in women with unexplained recurrent pregnancy loss: the OTTILIA registry. *Human Reproduction*, 36(8), 2083-2090.
146. Greco, E., Litwicka, K., Minasi, M. G., Cursio, E., Greco, P. F., & Barillari, P. (2020). Preimplantation genetic testing: where we are today. *International journal of molecular sciences*, 21(12), 4381.
147. Green, M. P., Harvey, A. J., Finger, B. J., & Tarulli, G. A. (2021). Endocrine disrupting chemicals: Impacts on human fertility and fecundity during the peri-conception period. *Environmental research*, 194, 110694.
148. Greenwood, E. A., Pasch, L. A., Cedars, M. I., & Huddleston, H. G. (2020). Obesity and depression are risk factors for future eating disorder-related attitudes and behaviors in women with polycystic ovary syndrome. *Fertility and sterility*, 113(5), 1039-1049.

149. Groff, A. F., Resetkova, N., DiDomenico, F., Sakkas, D., Penzias, A., Rinn, J. L., & Eggan, K. (2019). RNA-seq as a tool for evaluating human embryo competence. *Genome research*, 29(10), 1705-1718.
150. Gruhn, J. R., Zielinska, A. P., Shukla, V., Blanshard, R., Capalbo, A., Cimadomo, D., ... & Hoffmann, E. R. (2019). Chromosome errors in human eggs shape natural fertility over reproductive life span. *Science*, 365(6460), 1466-1469.
151. Gu, P., Goodwin, B., Chung, A. C. K., Xu, X., Wheeler, D. A., Price, R. R., ... & Cooney, A. J. (2005). Orphan nuclear receptor LRH-1 is required to maintain Oct4 expression at the epiblast stage of embryonic development. *Molecular and cellular biology*, 25(9), 3492-3505.
152. Gunes, S., Metin Mahmutoglu, A., Arslan, M. A., & Henkel, R. (2018). Smoking-induced genetic and epigenetic alterations in infertile men. *Andrologia*, 50(9), e13124.
153. Gunn, D. D., & Bates, G. W. (2016). Evidence-based approach to unexplained infertility: a systematic review. *Fertility and sterility*, 105(6), 1566-1574.
154. Guo, G., Stirparo, G.G., Strawbridge, S.E., Yang, J., Clarke, J., Li, M.A., Myers, S., Ozel, B.N., Nichols, J., & Smith, A.G. (2020). Trophectoderm Potency is Retained Exclusively in Human Naïve Cells. *bioRxiv*.
155. Guo, L., Nakamura, K., Lynch, J., Opas, M., Olson, E. N., Agellon, L. B., & Michalak, M. (2002). Cardiac-specific expression of calcineurin reverses embryonic lethality in calreticulin-deficient mouse. *Journal of Biological Chemistry*, 277(52), 50776-50779.
156. Guo, R. J., Funakoshi, S., Lee, H. H., Kong, J., & Lynch, J. P. (2010). The intestine-specific transcription factor Cdx2 inhibits  $\beta$ -catenin/TCF transcriptional activity by disrupting the  $\beta$ -catenin–TCF protein complex. *Carcinogenesis*, 31(2), 159-166.
157. Gupta, S. K. (2023). Zona pellucida glycoproteins: Relevance in fertility and development of contraceptive vaccines. *American Journal of Reproductive Immunology*, 89(2), e13535.
158. Gurunath, S., Pandian, Z., Anderson, R. A., & Bhattacharya, S. (2011). Defining infertility—a systematic review of prevalence studies. *Human reproduction update*, 17(5), 575-588.

159. Habbema, J. D. F., Collins, J., Leridon, H., Evers, J. L., Lunenfeld, B., & teVelde, E. R. (2004). Towards less confusing terminology in reproductive medicine: a proposal. *Human Reproduction*, 19(7), 1497-1501.
160. Hajivandi, L., Noroozi, M., Mostafavi, F., & Ekramzadeh, M. (2020). Food habits in overweight and obese adolescent girls with polycystic ovary syndrome (PCOS): a qualitative study in Iran. *BMC pediatrics*, 20(1), 1-7.
161. Hamilton, W. J. (1972). Hamilton Boyd and Mossman's human embryology. *Prenatal development of form and function*, 174-525.
162. Hamon, Y., Broccardo, C., Chambenoit, O., Luciani, M. F., Toti, F., Chaslin, S., ... & Chimini, G. (2000). ABC1 promotes engulfment of apoptotic cells and transbilayer redistribution of phosphatidylserine. *Nature cell biology*, 2(7), 399-406.
163. Hanna, C. W., Demond, H., & Kelsey, G. (2018). Epigenetic regulation in development: is the mouse a good model for the human?. *Human reproduction update*, 24(5), 556-576.
164. Hardarson, T., Van Landuyt, L., & Jones, G. (2012). The blastocyst. *Human reproduction*, 27(suppl\_1), i72-i91.
165. Hardy, K., Warner, A., Winston, R. M., & Becker, D. L. (1996). Expression of intercellular junctions during preimplantation development of the human embryo. *MHR: Basic science of reproductive medicine*, 2(8), 621-632.
166. Hart, R. J. (2016). Physiological aspects of female fertility: role of the environment, modern lifestyle, and genetics. *Physiological reviews*, 96(3), 873-909.
167. Hashimoto, M., & Sasaki, H. (2019). Epiblast formation by TEAD-YAP-dependent expression of pluripotency factors and competitive elimination of unspecified cells. *Developmental cell*, 50(2), 139-154.
168. Hassold, T., & Hunt, P. (2009). Maternal age and chromosomally abnormal pregnancies: what we know and what we wish we knew. *Current opinion in pediatrics*, 21(6), 703.
169. Hendrickson, P. G., Doráis, J. A., Grow, E. J., Whiddon, J. L., Lim, J. W., Wike, C. L., ... & Cairns, B. R. (2017). Conserved roles of mouse DUX and human DUX4 in activating cleavage-stage genes and MERVL/HERVL retrotransposons. *Nature genetics*, 49(6), 925-934.

170. Herrero, J., Tejera, A., Albert, C., Vidal, C., de los Santos, M. J., & Meseguer, M. (2013). A time to look back: analysis of morphokinetic characteristics of human embryo development. *Fertility and sterility*, 100(6), 1602-1609.
171. Hertig, A. T. (1945). On the development of the amnion and exocoelomic membrane in the pre-villous human ovum. *The Yale journal of biology and medicine*, 18(2), 107.
172. Hertig, A.T., Rock, J., Adams, E.C. (1956). A description of 34 human ova within the first 17 days of development. *The American journal of Anatomy*, 98(3):435-93.
173. Hertwig, O. (1876). Beitr~ ige zur Kenntniss der Bildung, Befruchtung und Theilung des thierischen Eies, *Morphol.*
174. Ho, K., Wolff, C. A., & Suarez, S. S. (2009). CatSper-null mutant spermatozoa are unable to ascend beyond the oviductal reservoir. *Reproduction, Fertility and Development*, 21(2), 345-350.
175. Holmberg, J. C., Haddad, S., Wünsche, V., Yang, Y., Aldo, P. B., Gnainsky, Y., ... & Mor, G. (2012). An in vitro model for the study of human implantation. *American Journal of Reproductive Immunology*, 67(2), 169-178.
176. Horikoshi, M., Day, F. R., Akiyama, M., Hirata, M., Kamatani, Y., Matsuda, K., ... & Perry, J. R. (2018). Elucidating the genetic architecture of reproductive ageing in the Japanese population. *Nature communications*, 9(1), 1977.
177. Horsthemke, M., Nutter, L. M., Bachg, A. C., Skryabin, B. V., Honnert, U., Zobel, T., ... & Hanley, P. J. (2019). A novel isoform of myosin 18A (Myo18A $\gamma$ ) is an essential sarcomeric protein in mouse heart. *Journal of Biological Chemistry*, 294(18), 7202-7218.
178. Hu, W., Feng, Z., Teresky, A. K., & Levine, A. J. (2007). p53 regulates maternal reproduction through LIF. *Nature*, 450(7170), 721-724.
179. Hurley, A., Smith, M., Karpova, T., Hasley, R. B., Belkina, N., Shaw, S., ... & Catalfamo, M. (2013). Enhanced effector function of CD8<sup>+</sup> T cells from healthy controls and HIV-infected patients occurs through thrombin activation of protease-activated receptor 1. *The Journal of infectious diseases*, 207(4), 638-650.
180. Ikawa, M., Inoue, N., Benham, A. M., & Okabe, M. (2010). Fertilization: a sperm's journey to and interaction with the oocyte. *The Journal of clinical investigation*, 120(4), 984-994.

181. Ikonomov, O. C., Sbrissa, D., Delvecchio, K., Xie, Y., Jin, J. P., Rappolee, D., & Shisheva, A. (2011). The phosphoinositide kinase PIKfyve is vital in early embryonic development: preimplantation lethality of PIKfyve<sup>-/-</sup> embryos but normality of PIKfyve<sup>+/-</sup> mice. *Journal of Biological Chemistry*, 286(15), 13404-13413.
182. INE, Instituto Nacional de Estadística (2021) <https://www.ine.es/jaxiT3/Datos.htm?t=1579#!tabs-grafico>
183. Inhorn, M. C., & Patrizio, P. (2015). Infertility around the globe: new thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century. *Human reproduction update*, 21(4), 411-426.
184. Iwata, K., Yumoto, K., Sugishima, M., Mizoguchi, C., Kai, Y., Iba, Y., & Mio, Y. (2014). Analysis of compaction initiation in human embryos by using time-lapse cinematography. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 31, 421-426.
185. Jarvis, G. E. (2016). Early embryo mortality in natural human reproduction: What the data say. *F1000Research*, 5.
186. Jedrusik, A. (2015). Making the first decision: lessons from the mouse. *Reproductive medicine and biology*, 14, 135-150.
187. Jeganathan, K. B., Malureanu, L., & Van Deursen, J. M. (2005). The Rae1–Nup98 complex prevents aneuploidy by inhibiting securin degradation. *Nature*, 438(7070), 1036-1039.
188. Jiang, R., Lan, Y., Norton, C. R., Sundberg, J. P., & Gridley, T. (1998). The Slug gene is not essential for mesoderm or neural crest development in mice. *Developmental biology*, 198(2), 277-285.
189. Jiang, Y., McCarthy, J. M., & Allen, A. S. (2015). Testing the Effect of Rare Compound-Heterozygous and Recessive Mutations in Case–Parent Sequencing Studies. *Genetic epidemiology*, 39(3), 166-172.
190. Jimbo, M., Kunisaki, J., Ghaed, M., Yu, V., Flores, H. A., & Hotaling, J. M. (2022). Fertility in the aging male: a systematic review. *Fertility and Sterility*, 118(6), 1022-1034.
191. Kalitsis, P., Earle, E., Fowler, K. J., & Choo, K. A. (2000). Bub3 gene disruption in mice reveals essential mitotic spindle checkpoint function during early embryogenesis. *Genes & development*, 14(18), 2277-2282.

192. Kalluri, R., & Weinberg, R. A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation*, 119(6), 1420-1428.
- Bischof, P., & Campana, A. (1996). A model for implantation of the human blastocyst and early placentation. *Human reproduction update*, 2(3), 262-270.
193. Kaltsas, A., Moustakli, E., Zikopoulos, A., Georgiou, I., Dimitriadis, F., Symeonidis, E. N., ... & Zachariou, A. (2023). Impact of Advanced Paternal Age on Fertility and Risks of Genetic Disorders in Offspring. *Genes*, 14(2), 486.
194. Karczewski, K. J., Francioli, L. C., Tiao, G., Cummings, B. B., Alföldi, J., Wang, Q., ... & MacArthur, D. G. (2020). The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature*, 581(7809), 434-443.
195. Kawasaki, S., Yamasaki, K., Nakagawa, H., Shinomiya, K., Nakatsukasa, M., Nakai, Y., & Kinoshita, S. (2012). A novel mutation (p. Glu1389AspfsX16) of the phosphoinositide kinase, FYVE finger containing gene found in a Japanese patient with fleck corneal dystrophy. *Molecular Vision*, 18, 2954.
196. Kim, J., Lee, J., & Jun, J. H. (2022). Non-invasive evaluation of embryo quality for the selection of transferable embryos in human in vitro fertilization-embryo transfer. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*, 49(4), 225-238.
197. Kim, S. M., & Kim, J. S. (2017). A review of mechanisms of implantation. *Development & reproduction*, 21(4), 351.
198. Kim, T. H., Yoo, J. Y., Choi, K. C., Shin, J. H., Leach, R. E., Fazleabas, A. T., ... & Jeong, J. W. (2019). Loss of HDAC3 results in nonreceptive endometrium and female infertility. *Science translational medicine*, 11(474), eaaf7533.
199. Kimura, M., Kim, E., Kang, W., Yamashita, M., Saigo, M., Yamazaki, T., ... & Baba, T. (2009). Functional roles of mouse sperm hyaluronidases, HYAL5 and SPAM1, in fertilization. *Biology of reproduction*, 81(5), 939-947.
200. Knecht, C., Mort, M., Junge, O., Cooper, D. N., Krawczak, M., & Caliebe, A. (2017). IMHOTEP—a composite score integrating popular tools for predicting the functional consequences of non-synonymous sequence variants. *Nucleic acids research*, 45(3), e13-e13.
201. Kobayashi, Y., Masuda, T., Fujii, A., Shimizu, D., Sato, K., Kitagawa, A., ... & Mimori, K. (2021). Mitotic checkpoint regulator RAE1 promotes tumor growth in colorectal cancer. *Cancer Science*, 112(8), 3173-3189.

202. Kraemer, D., & Blobel, G. (1997). mRNA binding protein mrnp 41 localizes to both nucleus and cytoplasm. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(17), 9119-9124.
203. Kragh, M. F., & Karstoft, H. (2021). Embryo selection with artificial intelligence: how to evaluate and compare methods?. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 38(7), 1675-1689.
204. Krausz, C. (2011). Male infertility: pathogenesis and clinical diagnosis. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*, 25(2), 271-285.
205. Krausz, C., & Riera-Escamilla, A. (2018). Genetics of male infertility. *Nature Reviews Urology*, 15(6), 369-384.
206. Kroon, B., Johnson, N., Chapman, M., Yazdani, A., Hart, R., & Australasian CREI Consensus Expert Panel on Trial evidence (ACCEPT) group. (2011). Fibroids in infertility—consensus statement from ACCEPT (Australasian CREI Consensus Expert Panel on Trial evidence). *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 51(4), 289-295.
207. Kuckenbergh, P., Kubaczka, C., & Schorle, H. (2012). The role of transcription factor Tcfap2c/TFAP2C in trophoctoderm development. *Reproductive biomedicine online*, 25(1), 12-20.
208. Kumar, A., Im, K., Banjevic, M., Ng, P. C., Tunstall, T., Garcia, G., ... & Rabinowitz, M. (2022). Whole-genome risk prediction of common diseases in human preimplantation embryos. *Nature Medicine*, 28(3), 513-516.
209. Labelle-Dumais, C., Jacob-Wagner, M., Paré, J. F., Bélanger, L., & Dufort, D. (2006). Nuclear receptor NR5A2 is required for proper primitive streak morphogenesis. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 235(12), 3359-3369.
210. Ladstätter, S., & Tachibana, K. (2019). Genomic insights into chromatin reprogramming to totipotency in embryos. *Journal of Cell Biology*, 218(1), 70-82.
211. Lagalla, C., Tarozzi, N., Sciajno, R., Wells, D., Di Santo, M., Nadalini, M., ... & Borini, A. (2017). Embryos with morphokinetic abnormalities may develop into euploid blastocysts. *Reproductive biomedicine online*, 34(2), 137-146.
212. Lancellotti, S., Basso, M., & De Cristofaro, R. (2013, September). Congenital prothrombin deficiency: an update. In *Seminars in thrombosis and hemostasis* (Vol. 39, No. 06, pp. 596-606). Thieme Medical Publishers.

213. Larsen, E. C., Christiansen, O. B., Kolte, A. M., & Macklon, N. (2013). New insights into mechanisms behind miscarriage. *BMC medicine*, 11(1), 1-10.
214. Lawrenz, B., Coughlan, C., Melado, L., & Fatemi, H. M. (2020). The ART of frozen embryo transfer: back to nature!. *Gynecological Endocrinology*, 36(6), 479-483.
215. Lek, M., Karczewski, K. J., Minikel, E. V., Samocha, K. E., Banks, E., Fennell, T., ... & Exome Aggregation Consortium. (2016). Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature*, 536(7616), 285-291.
216. Lepage, J., & Epelboin, S. (2019). Primera consulta de la pareja infértil y estudio de infertilidad. *EMC-Tratado de Medicina*, 23(1), 1-7.
217. Lerner-Ellis, J. P., Tirone, J. C., Pawelek, P. D., Doré, C., Atkinson, J. L., Watkins, D., ... & Rosenblatt, D. S. (2006). Identification of the gene responsible for methylmalonic aciduria and homocystinuria, cblC type. *Nature genetics*, 38(1), 93-100.
218. Levine, A. J., & Brivanlou, A. H. (2006). GDF3, a BMP inhibitor, regulates cell fate in stem cells and early embryos.
219. Levine, H., Jørgensen, N., Martino-Andrade, A., Mendiola, J., Weksler-Derri, D., Jolles, M., ... & Swan, S. H. (2022). Temporal trends in sperm count: a systematic review and meta-regression analysis of samples collected globally in the 20th and 21st centuries. *Human Reproduction Update*.
220. Li, S., Tiab, L., Jiao, X., Munier, F. L., Zografos, L., Frueh, B. E., ... & Schorderet, D. F. (2005). Mutations in PIP5K3 are associated with Francois-Neetens mouchette fleck corneal dystrophy. *The American Journal of Human Genetics*, 77(1), 54-63.
221. Liu, K. E., & Case, A. (2017). No. 346-Advanced reproductive age and fertility. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada*, 39(8), 685-695.
222. Liu, K. E., Hartman, M., Hartman, A., Luo, Z. C., & Mahutte, N. (2018). The impact of a thin endometrial lining on fresh and frozen-thaw IVF outcomes: an analysis of over 40 000 embryo transfers. *Human Reproduction*, 33(10), 1883-1888.
223. Liu, L., Leng, L., Liu, C., Lu, C., Yuan, Y., Wu, L., ... & Lin, G. (2019). An integrated chromatin accessibility and transcriptome landscape of human pre-implantation embryos. *Nature communications*, 10(1), 364.

224. Liu, Y., Qi, F., Matson, P., Morbeck, D. E., Mol, B. W., Zhao, S., & Afnan, M. (2020). Between-laboratory reproducibility of time-lapse embryo selection using qualitative and quantitative parameters: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 37, 1295-1302.
225. López Villaverde, V. (2014). Epidemiología de la esterilidad. Influencia de los factores ambientales. *Rev. iberoam. fertil. reprod. hum*, 31-37.
226. Lu, X., Zhang, Y., Wang, L., Wang, L., Wang, H., Xu, Q., ... & Xie, W. (2021). Evolutionary epigenomic analyses in mammalian early embryos reveal species-specific innovations and conserved principles of imprinting. *Science Advances*, 7(48), eabi6178.
227. Luke, B., & Brown, M. B. (2007). Contemporary risks of maternal morbidity and adverse outcomes with increasing maternal age and plurality. *Fertility and sterility*, 88(2), 283–293.
228. Lundin, K., & Park, H. (2020). Time-lapse technology for embryo culture and selection. *Upsala journal of medical sciences*, 125(2), 77-84.
229. Ma, H., Zhai, J., Wan, H., Jiang, X., Wang, X., Wang, L., ... & Wang, H. (2019). In vitro culture of cynomolgus monkey embryos beyond early gastrulation. *Science*, 366(6467), eaax7890.
230. Macklon, N. S., Geraedts, J. P., & Fauser, B. C. (2002). Conception to ongoing pregnancy: the 'black box' of early pregnancy loss. *Human reproduction update*, 8(4), 333-343.
231. Magendzo, N. A. (2010). Anovulación y disfunción ovulatoria e infertilidad. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 21(3), 377-386.
232. Magli, M. C., Jones, G. M., Lundin, K., & Van den Abbeel, E. (2012). Atlas of human embryology: from oocytes to preimplantation embryos. *Hum Reprod*, 27(Suppl 1), 1-91.
233. Magnus, M. C., Wilcox, A. J., Morken, N. H., Weinberg, C. R., & Håberg, S. E. (2019). Role of maternal age and pregnancy history in risk of miscarriage: prospective register-based study. *bmj*, 364.
234. Mains, L., & Van Voorhis, B. J. (2010). Optimizing the technique of embryo transfer. *Fertility and sterility*, 94(3), 785-790.
235. Marcos, J., Perez-Albala, S., Mifsud, A., Molla, M., Landeras, J., & Meseguer, M. (2015). Collapse of blastocysts is strongly related to lower implantation success: a time-lapse study. *Human Reproduction*, 30(11), 2501-2508.

236. Marquardt, R. M., Kim, T. H., Shin, J. H., & Jeong, J. W. (2019). Progesterone and estrogen signaling in the endometrium: what goes wrong in endometriosis? *International journal of molecular sciences*, 20(15), 3822.
237. Martin, S., Harper, C. B., May, L. M., Coulson, E. J., Meunier, F. A., & Osborne, S. L. (2013). Inhibition of PIKfyve by YM-201636 dysregulates autophagy and leads to apoptosis-independent neuronal cell death. *PLoS one*, 8(3), e60152.
238. Martin-Deleon, P. A. (2011). Germ-cell hyaluronidases: their roles in sperm function. *International journal of andrology*, 34(5pt2), e306-e318.
239. Martineau, I., Lacoste, E., & Gagnon, G. (2004). Effects of calcium and thrombin on growth factor release from platelet concentrates: kinetics and regulation of endothelial cell proliferation. *Biomaterials*, 25(18), 4489-4502.
240. Martínez, A., Cairó, O., Belda, A. G., Cabello, Y., Carrasco, B., Cuadros, M., ... & de Mendoza, M. H. (2021). Uso de la catalogación embrionaria de ASEBIR y de la tecnología time-lapse en los laboratorios de FIV. *ASEBIR*, 26(1), 49-55.
241. Martínez, S. M. A., & Peláez, M. I. G. (2017). Embriología humana y biología del desarrollo. *Médica Panamericana*.
242. Mascarenhas, M. N., Flaxman, S. R., Boerma, T., Vanderpoel, S., & Stevens, G. A. (2012). National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. *PLoS medicine*, 9(12), e1001356.
243. Masoumi, S. Z., Parsa, P., Darvish, N., Mokhtari, S., Yavangi, M., & Roshanaei, G. (2015). An epidemiologic survey on the causes of infertility in patients referred to infertility center in Fatemieh Hospital in Hamadan. *Iranian journal of reproductive medicine*, 13(8), 513.
244. Mastenbroek, S., van der Veen, F., Aflatoonian, A., Shapiro, B., Bossuyt, P., & Repping, S. (2011). Embryo selection in IVF. *Human Reproduction*, 26(5), 964-966.
245. Mateo, S., Parriego, M., Boada, M., Vidal, F., Coroleu, B., & Veiga, A. (2013). In vitro development and chromosome constitution of embryos derived from monopronucleated zygotes after intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and sterility*, 99(3), 897-902.

246. Matsunaga, R., & Horiuchi, T. (2015). ICSI with the assistance of meiotic spindle imaging for the production of high-quality embryos. *Journal of Mammalian Ova Research*, 32(1), 3-10.
247. Matteo, M. (2022). Assisted Reproductive Technology. In *Practical Clinical Andrology* (pp. 237-250). Cham: Springer International Publishing.
248. Matzuk, M. M., & Lamb, D. J. (2008). The biology of infertility: research advances and clinical challenges. *Nature medicine*, 14(11), 1197-1213.
249. Maxwell, S. M., Colls, P., Hodes-Wertz, B., McCulloh, D. H., McCaffrey, C., Wells, D., ... & Grifo, J. A. (2016). Why do euploid embryos miscarry? A case-control study comparing the rate of aneuploidy within presumed euploid embryos that resulted in miscarriage or live birth using next-generation sequencing. *Fertility and sterility*, 106(6), 1414-1419.
250. Mazur, D. J., & Lipshultz, L. I. (2018). Infertility in the aging male. *Current urology reports*, 19, 1-9.
251. Mazur, E.C., Large, M.J., DeMayo, F.J. (2015). Human Oviduct and Endometrium. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, pp. 1077–1097.
252. Mazur, P., & Seki, S. (2011). Survival of mouse oocytes after being cooled in a vitrification solution to -196 C at 95 to 70,000 C/min and warmed at 610 to 118,000 C/min: A new paradigm for cryopreservation by vitrification. *Cryobiology*, 62(1), 1-7.
253. McCoy, R. C., Demko, Z. P., Ryan, A., Banjevic, M., Hill, M., Sigurjonsson, S., ... & Petrov, D. A. (2015). Evidence of selection against complex mitotic-origin aneuploidy during preimplantation development. *PLoS genetics*, 11(10), e1005601.
254. McNeish, J., Aiello, R. J., Guyot, D., Turi, T., Gabel, C., Aldinger, C., ... & Francone, O. L. (2000). High density lipoprotein deficiency and foam cell accumulation in mice with targeted disruption of ATP-binding cassette transporter-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(8), 4245-4250.
255. Meinsohn, M. C., Smith, O. E., Bertolin, K., & Murphy, B. D. (2019). The orphan nuclear receptors steroidogenic factor-1 and liver receptor homolog-1: structure, regulation, and essential roles in mammalian reproduction. *Physiological reviews*, 99(2), 1249-1279.

256. Meistermann, D., Bruneau, A., Loubersac, S., Reignier, A., Firmin, J., François-Campion, V., ... & David, L. (2021). Integrated pseudotime analysis of human pre-implantation embryo single-cell transcriptomes reveals the dynamics of lineage specification. *Cell Stem Cell*, 28(9), 1625-1640.
257. Meldrum, D. R., & de Ziegler, D. (2016). Introduction: Examining the many potential reasons why euploid blastocysts do not always result in viable pregnancies (and deliveries): part 2. *Fertility and sterility*, 105(4), 841-843.
258. Meldrum, D. R., Casper, R. F., Diez-Juan, A., Simon, C., Domar, A. D., & Frydman, R. (2016). Aging and the environment affect gamete and embryo potential: can we intervene? *Fertility and sterility*, 105(3), 548-559.
259. Meseguer Escriva, M., Maor, R., Bori, L., Shapiro, M., Pellicer, A., Seidman, D., ... & Gilboa, D. (2022). O-073 Artificial intelligence (AI) based triage for preimplantation genetic testing (PGT); an AI model that detects novel features in the embryo associated with ploidy. *Human Reproduction*, 37(Supplement\_1), deac104-087.
260. Meseguer, M., Herrero, J., Tejera, A., Hilligsøe, K. M., Ramsing, N. B., & Remohí, J. (2011). The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Human reproduction*, 26(10), 2658-2671.
261. Metzker, M. L. (2010). Sequencing technologies—the next generation. *Nature reviews genetics*, 11(1), 31-46.
262. Mihajlović, A. I., & Bruce, A. W. (2017). The first cell-fate decision of mouse preimplantation embryo development: integrating cell position and polarity. *Open biology*, 7(11), 170210.
263. Milewski, R., Kuć, P., Kuczyńska, A., Stankiewicz, B., Łukaszuk, K., & Kuczyński, W. (2015). A predictive model for blastocyst formation based on morphokinetic parameters in time-lapse monitoring of embryo development. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 32, 571-579.
264. Miller, D. S. J., & Hill, C. S. (2016). TGF- $\beta$  Superfamily Signaling. *Encyclopedia of Cell Biology*, 37–50. doi:10.1016/b978-0-12-394447-4.30003-7
265. Minchiotti, G., Parisi, S., Liguori, G., Signore, M., Lania, G., Adamson, E. D., ... & Persico, M. G. (2000). Membrane-anchorage of Cripto protein by glycosylphosphatidylinositol and its distribution during early mouse development. *Mechanisms of development*, 90(2), 133-142.

266. Mol, B. W., & Hart, R. J. (2020, January). Unexplained infertility. In *Seminars in Reproductive Medicine* (Vol. 38, No. 01, pp. 001-002). Thieme Medical Publishers, Inc.
267. Molè, M. A., Weberling, A., & Zernicka-Goetz, M. (2020). Comparative analysis of human and mouse development: From zygote to pre-gastrulation. *Current topics in developmental biology*, 136, 113-138.
268. Montag, M. H., & Morbeck, D. E. (Eds.). (2017). *Principles of IVF laboratory practice: Optimizing performance and outcomes*. Cambridge University Press.
269. Montag, M., Liebenthron, J., & Köster, M. (2011). Which morphological scoring system is relevant in human embryo development? *Placenta*, 32, S252-S256.
270. Montag, M., Toth, B., & Strowitzki, T. (2013). New approaches to embryo selection. *Reproductive biomedicine online*, 27(5), 539-546.
271. Moore, K. L., Persaud, T. V. N., & Torchia, M. G. (Eds.). (2020). *Embriologia clínica*. Elsevier.
272. Morikawa, M., Derynck, R., & Miyazono, K. (2016). TGF- $\beta$  and the TGF- $\beta$  family: context-dependent roles in cell and tissue physiology. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 8(5), a021873.
273. Moros-Nicolás, C., Chevret, P., Jiménez-Movilla, M., Algarra, B., Cots-Rodríguez, P., González-Brusi, L., ... & Izquierdo-Rico, M. J. (2021). New insights into the mammalian egg zona pellucida. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6), 3276.
274. Motiei, M., Vaculikova, K., Cela, A., Tvrdonova, K., Khalili, R., Rumpik, D., ... & Saha, T. (2020). Non-invasive human embryo metabolic assessment as a developmental criterion. *Journal of Clinical Medicine*, 9(12), 4094.
275. Moustafa, S., & Young, S. L. (2020). Diagnostic and therapeutic options in recurrent implantation failure. *F1000Research*, 9(208), 208.
276. Mrozikiewicz, A. E., Ożarowski, M., & Jędrzejczak, P. (2021). Biomolecular markers of recurrent implantation failure—A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(18), 10082.
277. Mu, J., Zhou, Z., Sang, Q., & Wang, L. (2022). The physiological and pathological mechanisms of early embryonic development. *Fundamental Research*.

278. Mundy, D. C., & Vilchez, G. (2018). Overview of the normal development of the human embryo and fetus. The diagnosis and management of the acute abdomen in pregnancy, 25-39.
279. Munné, S., Chen, S., Colls, P., Garrisi, J., Zheng, X., Cekleniak, N., ... & Tomkin, G. (2007). Maternal age, morphology, development and chromosome abnormalities in over 6000 cleavage-stage embryos. *Reproductive biomedicine online*, 14(5), 628-634.
280. Murphy, N. M., Samarasekera, T. S., Macaskill, L., Mullen, J., & Rombauts, L. J. (2020). Genome sequencing of human in vitro fertilisation embryos for pathogenic variation screening. *Scientific Reports*, 10(1), 1-10.
281. Murray, S. C., & Smith, T. T. (1997). Sperm interaction with fallopian tube apical membrane enhances sperm motility and delays capacitation. *Fertility and Sterility*, 68(2), 351-357.
282. Nakano, H., Wang, W., Hashizume, C., Funasaka, T., Sato, H., & Wong, R. W. (2011). Unexpected role of nucleoporins in coordination of cell cycle progression. *Cell Cycle*, 10(3), 425-433.
283. Nasiri, N., & Eftekhari-Yazdi, P. (2015). An overview of the available methods for morphological scoring of pre-implantation embryos in in vitro fertilization. *Cell Journal (Yakhteh)*, 16(4), 392.
284. Navarro Sánchez, L., Ocali, O., García Pascual, C. M., Mamede Andrade, G., Castelló Salom, D., Lai, F., ... & Sakkas, D. (2022). P-551 High concordance of the embryonic cell-free DNA with the inner cell mass: impact of blastocyst quality, patient age and mode of fertilization. *Human Reproduction*, 37(Supplement\_1), deac107-509.
285. Navot, D., Bergh, R. A., Williams, M. A., Garrisi, G. J., Guzman, I. D. A., Sandler, B. E. N. J. A. M. I. N., & Grunfeld, L. A. W. R. E. N. C. E. (1991). Poor oocyte quality rather than implantation failure as a cause of age-related decline in female fertility. *The Lancet*, 337(8754), 1375-1377.
286. Ng, R. K., Dean, W., Dawson, C., Lucifero, D., Madeja, Z., Reik, W., & Hemberger, M. (2008). Epigenetic restriction of embryonic cell lineage fate by methylation of Elf5. *Nature cell biology*, 10(11), 1280-1290.
287. Niakan, K. K., & Eggan, K. (2013). Analysis of human embryos from zygote to blastocyst reveals distinct gene expression patterns relative to the mouse. *Developmental biology*, 375(1), 54-64.

288. Niakan, K. K., Han, J., Pedersen, R. A., Simon, C., & Pera, R. A. R. (2012). Human pre-implantation embryo development. *Development*, 139(5), 829-841.
289. Nicolielo Barreto, M., Jacobs, C., Souza, R. C. M., Erberelli, R., Alegretti, J. R., Chehin, M. B., ... & Lorenzon, A. R. (2022). O-173 Artificial intelligence blastocyst ploidy distinction through morphokinetics data. *Human Reproduction*, 37(Supplement\_1), deac105-087.
290. Nicot, A. S., Fares, H., Payrastra, B., Chisholm, A. D., Labouesse, M., & Laporte, J. (2006). The phosphoinositide kinase PIKfyve/Fab1p regulates terminal lysosome maturation in *Caenorhabditis elegans*. *Molecular biology of the cell*, 17(7), 3062-3074.
291. Nikas, G., & Makrigiannakis, A. (2003). Endometrial pinopodes and uterine receptivity. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 997(1), 120-123.
292. Nishioka, N., Inoue, K. I., Adachi, K., Kiyonari, H., Ota, M., Ralston, A., ... & Sasaki, H. (2009). The Hippo signaling pathway components Lats and Yap pattern Tead4 activity to distinguish mouse trophectoderm from inner cell mass. *Developmental cell*, 16(3), 398-410.
293. Niu, Y., Sun, N., Li, C., Lei, Y., Huang, Z., Wu, J., ... & Tan, T. (2019). Dissecting primate early post-implantation development using long-term in vitro embryo culture. *Science*, 366(6467), eaaw5754.
294. Niwa, H., & Burdon, T. (1998). chambers I, Smith a. Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STaT3. *Genes Dev*, 12, 2048-2060.
295. Niwa, H., Toyooka, Y., Shimosato, D., Strumpf, D., Takahashi, K., Yagi, R., & Rossant, J. (2005). Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophectoderm differentiation. *Cell*, 123(5), 917-929.
296. Noyes, M. D., Harvey, W. T., Porubsky, D., Sulovari, A., Li, R., Rose, N. R., ... & Eichler, E. E. (2022). Familial long-read sequencing increases yield of de novo mutations. *The American Journal of Human Genetics*, 109(4), 631-646.
297. Ochoa-Bernal, M. A., & Fazleabas, A. T. (2020). Physiologic events of embryo implantation and decidualization in human and non-human primates. *International journal of molecular sciences*, 21(6), 1973.

298. Ochsenkühn, R., Arzberger, A., von Schönfeldt, V., Engel, J., Thaler, C. J., & Noss, U. (2009). Predictive value of early serum  $\beta$ -hCG levels after single blastocyst transfer. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica*, 88(12), 1382-1388.
299. Ochsenkühn, R., Arzberger, A., von Schönfeldt, V., Engel, J., Thaler, C. J., & Noss, U. (2009). Predictive value of early serum  $\beta$ -hCG levels after single blastocyst transfer. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica*, 88(12), 1382-1388.
300. Oghbaei, F., Zarezadeh, R., Jafari-Gharabaghlu, D., Ranjbar, M., Nouri, M., Fattahi, A., & Imakawa, K. (2022). Epithelial-mesenchymal transition process during embryo implantation. *Cell and Tissue Research*, 388(1), 1-17.
301. Ogura, T., Sakaguchi, H., Miyamoto, S., & Takahashi, J. (2018). Three-dimensional induction of dorsal, intermediate and ventral spinal cord tissues from human pluripotent stem cells. *Development*, 145(16), dev162214.
302. Oh, J. H., Hur, H., Lee, J. Y., Kim, Y., Seo, Y., & Kim, M. H. (2017). The mitotic checkpoint regulator RAE1 induces aggressive breast cancer cell phenotypes by mediating epithelial-mesenchymal transition. *Scientific Reports*, 7(1), 1-9.
303. Okabe, M. (2014). Mechanism of fertilization: a modern view. *Experimental Animals*, 63(4), 357-365.
304. Okada, H., Tsuzuki, T., & Murata, H. (2018). Decidualization of the human endometrium. *Reproductive medicine and biology*, 17(3), 220-227.
305. Okun, N., Sierra, S., Wilson, R. D., Audibert, F., Brock, J. A., Campagnolo, C., ... & Robson, H. (2014). Pregnancy outcomes after assisted human reproduction. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada*, 36(1), 64-83.
306. Ombelet, W., Cooke, I., Dyer, S., Serour, G., & Devroey, P. (2008). Infertility and the provision of infertility medical services in developing countries. *Human reproduction update*, 14(6), 605-621.
307. Ombelet, W., De Sutter, P., Van der Elst, J., & Martens, G. (2005). Multiple gestation and infertility treatment: registration, reflection and reaction—the Belgian project. *Human reproduction update*, 11(1), 3-14.
308. O'rahilly, R., & Müller, F. (2010). Developmental stages in human embryos: revised and new measurements. *Cells Tissues Organs*, 192(2), 73-84.

309. Ortega, N. M., Winblad, N., Reyes, A. P., & Lanner, F. (2018). Functional genetics of early human development. *Current Opinion in Genetics & Development*, 52, 1-6.
310. Pacheco, A., Blanco, A., Bronet, F., Cruz, M., García-Fernández, J., & García-Velasco, J. A. (2020). Magnetic-activated cell sorting (MACS): a useful sperm-selection technique in cases of high levels of sperm DNA fragmentation. *Journal of Clinical Medicine*, 9(12), 3976.
311. Palermo, G., Joris, H., Devroey, P., & Van Steirteghem, A. C. (1992). Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *The Lancet*, 340(8810), 17-18.
312. Palmerola, K. L., Vitez, S. F., Amrane, S., Fischer, C. P., & Forman, E. J. (2019). Minimizing mosaicism: assessing the impact of fertilization method on rate of mosaicism after next-generation sequencing (NGS) preimplantation genetic testing for aneuploidy (PGT-A). *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 36, 153-157.
313. Pan, H. T., Ding, H. G., Fang, M., Yu, B., Cheng, Y., Tan, Y. J., ... & Zhang, T. (2018). Proteomics and bioinformatics analysis of altered protein expression in the placental villous tissue from early recurrent miscarriage patients. *Placenta*, 61, 1-10.
314. Paré, J. F., Malenfant, D., Courtemanche, C., Jacob-Wagner, M., Roy, S., Allard, D., & Bélanger, L. (2004). The fetoprotein transcription factor (FTF) gene is essential to embryogenesis and cholesterol homeostasis and is regulated by a DR4 element. *Journal of Biological Chemistry*, 279(20), 21206-21216.
315. Parikh, F. R., Athalye, A. S., Naik, N. J., Naik, D. J., Sanap, R. R., & Madon, P. F. (2018). Preimplantation genetic testing: its evolution, where are we today? *Journal of human reproductive sciences*, 11(4), 306.
316. Patrizio, P., Shoham, G., Shoham, Z., Leong, M., Barad, D. H., & Gleicher, N. (2019). Worldwide live births following the transfer of chromosomally "Abnormal" embryos after PGT/A: results of a worldwide web-based survey. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 36, 1599-1607.

317. Paulson, R. J., Hatch, I. E., Lobo, R. A., & Sauer, M. V. (1997). Cumulative conception and live birth rates after oocyte donation: implications regarding endometrial receptivity. *Human reproduction (Oxford, England)*, 12(4), 835-839.
318. Payne, D., Flaherty, S. P., Barry, M. F., & Matthews, C. D. (1997). Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse video cinematography. *Human reproduction (Oxford, England)*, 12(3), 532-541.
319. Pellicer, A., Oliveira, N., Ruiz, A., Remohí, J., & Simón, C. (1995). Exploring the mechanism (s) of endometriosis-related infertility: an analysis of embryo development and implantation in assisted reproduction. *Human Reproduction*, 10(suppl\_2), 91-97.
- Peng, Y., Lv, J., Xiao, Z., Ding, L., & Zhou, Q. (2022). A framework for the responsible reform of the 14-day rule in human embryo research. *Protein & Cell*, 13(8), 552-558.
320. Pera, M. F. (2017). Human embryo research and the 14-day rule. *Development*, 144(11), 1923-1925.
321. Pérez, J. G. (2022). Selección embrionaria en la reproducción asistida. *canarias pediátrica*, 46(2), 189-191.
322. Perreault, S. D. (1992). Chromatin remodeling in mammalian zygotes. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 296(1-2), 43-55.
323. Peters, B. A., Kermani, B. G., Alferov, O., Agarwal, M. R., McElwain, M. A., Gulbahce, N., ... & Drmanac, R. (2015). Detection and phasing of single base de novo mutations in biopsies from human in vitro fertilized embryos by advanced whole-genome sequencing. *Genome research*, 25(3), 426-434.
324. Petropoulos, S., Edsgard, D., Reinius, B., Deng, Q., Panula, S. P., Codeluppi, S., Plaza Reyes, A., Linnarsson, S., Sandberg, R. and Lanner, F. (2016). SingleCell RNA-Seq Reveals Lineage and X Chromosome Dynamics in Human Preimplantation Embryos. *Cell*, 165, 1012-1026
325. Plant, T. M., & Zeleznik, A. J. (Eds.). (2014). *Knobil and Neill's physiology of reproduction*. Academic Press.
326. Polanski, L. T., Baumgarten, M. N., Quenby, S., Brosens, J., Campbell, B. K., & Raine-Fenning, N. J. (2014). What exactly do we mean by 'recurrent implantation failure'? A systematic review and opinion. *Reproductive biomedicine online*, 28(4), 409-423.

327. Pons, M. C., Carrasco, B., Rives, N., Delgado, A., Moro, Á. M., Saiz, I. C., & Doncos, O. C. (2021). Estudio multicéntrico para la validación del criterio ASEBIR de valoración morfológica de blastocistos. *ASEBIR*, 26(2), 33-37.
328. Posfai, E., Rovic, I., & Jurisicova, A. (2019). The mammalian embryo's first agenda: making trophoctoderm. *International Journal of Developmental Biology*, 63(3-4-5), 157-170.
329. Pozzi, N., & Di Cera, E. (2014). Prothrombin structure: unanticipated features and opportunities. *Expert review of proteomics*, 11(6), 653-655.
330. Qi, S.-T.; Liang, L.-F.; Xian, Y.-X.; Liu, J.-Q.; Wang, W. Arrested Human Embryos Are More Likely to Have Abnormal Chromosomes than Developing Embryos from Women of Advanced Maternal Age. *J. Ovarian Res.* 2014, 7, 65.
331. Que, E. L., Duncan, F. E., Bayer, A. R., Philips, S. J., Roth, E. W., Bleher, R., ... & O'Halloran, T. V. (2017). Zinc sparks induce physiochemical changes in the egg zona pellucida that prevent polyspermy. *Integrative Biology*, 9(2), 135-144.
332. RAE, R. A. E. (2023). Diccionario de la lengua española. pp. versión 23.5 en línea: <https://dle.rae.es>
333. Rafael, F., Rodrigues, M. D., Bellver, J., Canelas-Pais, M., Garrido, N., Garcia-Velasco, J. A., ... & Santos-Ribeiro, S. (2023). The combined effect of BMI and age on ART outcomes. *Human Reproduction*, 38(5), 886-894.
334. Raimundo, J.M., & Cabrita, P. (2021). Artificial intelligence at assisted reproductive technology. *Procedia Computer Science*, vol. 181, pp. 442-447.
335. Rancel, M. C. ESTUDIO DE LA PAREJA CON DISFUNCIÓN REPRODUCTIVA (2017).
336. Ratcliff, M., Zhou, R. X., Jermutus, L., & Hyvönen, M. (2021). The role of pro-domains in human growth factors and cytokines. *Biochemical Society Transactions*, 49(5), 1963-1973.
337. Ray, A., Shah, A., Gudi, A., & Homburg, R. (2012). Unexplained infertility: an update and review of practice. *Reproductive biomedicine online*, 24(6), 591-602.
338. Reddy, D. M., Aspatwar, A., Dholakia, B. B., & Gupta, V. S. (2008). Evolutionary analysis of WD40 super family proteins involved in spindle checkpoint and RNA export: molecular evolution of spindle checkpoint. *Bioinformatics*, 2(10), 461-468.

339. Red-Horse, K., Zhou, Y., Genbacev, O., Prakobphol, A., Foulk, R., McMaster, M., & Fisher, S. J. (2004). Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface. *The Journal of clinical investigation*, 114(6), 744-754.
340. Regin, M., Essahib, W., Demtschenko, A., Dewandre, D., David, L., Gerri, C., ... & Van de Velde, H. (2022). Lineage segregation in human pre-implantation embryos is specified by YAP1 and TEAD1. *bioRxiv*, 2022-09.
341. Remaley, A. T., Rust, S., Rosier, M., Knapper, C., Naudin, L., Broccardo, C., ... & Brewer Jr, H. B. (1999). Human ATP-binding cassette transporter 1 (ABC1): genomic organization and identification of the genetic defect in the original Tangier disease kindred. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(22), 12685-12690.
342. Remohí Giménez, J., Bellver Pradas, J., Ferrando Serrano, M., Requena Miranda, A., & Pellicer Martínez, A. (2018). *Manual práctico de esterilidad y reproducción humana. Aspectos Clínicos. 5ª Edición*. Madrid: Editorial Médica Panamericana.
343. Ren, Y., Seo, H. S., Blobel, G., & Hoelz, A. (2010). Structural and functional analysis of the interaction between the nucleoporin Nup98 and the mRNA export factor Rae1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(23), 10406-10411.
344. Revelli, A., Carosso, A., Grassi, G., Gennarelli, G., Canosa, S., & Benedetto, C. (2017). Empty follicle syndrome revisited: definition, incidence, aetiology, early diagnosis and treatment. *Reproductive BioMedicine Online*, 35(2), 132-138.
345. Richard, E., Jorge-Finnigan, A., Garcia-Villoria, J., Merinero, B., Desviat, L. R., Gort, L., ... & Pérez, B. (2009). Genetic and cellular studies of oxidative stress in methylmalonic aciduria (MMA) cobalamin deficiency type C (cb1C) with homocystinuria (MMACHC). *Human mutation*, 30(11), 1558-1566.
346. Rico, P. M. T. (2022). Time to pregnancy and perinatal outcomes in a cohort of spontaneous pregnancies. *Sexual & Reproductive Healthcare*, 34, 100793.
347. Rienzi, L., Balaban, B., Ebner, T., & Mandelbaum, J. (2012). The oocyte. *Human Reproduction*, 27(suppl\_1), i2-i21.

348. Rock, J., & Hertig, A. T. (1948). The human conceptus during the first two weeks of gestation. *American journal of obstetrics and gynecology*, 55(1), 6-17.
349. Rodrigo, L. (2020). Sperm genetic abnormalities and their contribution to embryo aneuploidy & miscarriage. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 34(6), 101477.
350. Rojas J, Hinojosa F, Vergara S, Pinto-Borguero I, Aguilera F, Fuentes R, Carvacho I. Knockin' on Egg's Door: Maternal Control of Egg Activation That Influences Cortical Granule Exocytosis in Animal Species. *Front Cell Dev Biol*. 2021 Sep 3;9:704867. doi: 10.3389/fcell.2021.704867. PMID: 34540828; PMCID: PMC8446563.
351. Rosario, G. X., Hondo, E., Jeong, J. W., Mutalif, R., Ye, X., Yee, L. X., & Stewart, C. L. (2014). The LIF-mediated molecular signature regulating murine embryo implantation. *Biology of reproduction*, 91(3), 66-1.
352. Rossant, J. (2015). Mouse and human blastocyst-derived stem cells: vive les differences. *Development*, 142(1), 9-12.
353. Rossant, J. (2018). Gene editing in human development: ethical concerns and practical applications. *Development*, 145(16), dev150888.
354. Rossant, J., & Tam, P. P. (2009). Blastocyst lineage formation, early embryonic asymmetries and axis patterning in the mouse.
355. Rossant, J., & Tam, P. P. (2017). New insights into early human development: lessons for stem cell derivation and differentiation. *Cell stem cell*, 20(1), 18-28.
356. Rossant, J., & Tam, P. P. (2022). Early human embryonic development: blastocyst formation to gastrulation. *Developmental cell*, 57(2), 152-165.
357. Rossant, J., Chazaud, C., & Yamanaka, Y. (2003). Lineage allocation and asymmetries in the early mouse embryo. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 358(1436), 1341-1349.
358. Rubio, C., Rienzi, L., Navarro-Sánchez, L., Cimadomo, D., García-Pascual, C. M., Albricci, L., ... & Simón, C. (2019). Embryonic cell-free DNA versus trophoctoderm biopsy for aneuploidy testing: concordance rate and clinical implications. *Fertility and sterility*, 112(3), 510-519.

359. Rubio, C., Rodrigo, L., & Simón, C. (2020). Preimplantation genetic testing: chromosome abnormalities in human embryos. *Reproduction*, 160(5), A33-A44.
360. Rubio, C., Rodrigo, L., Garcia-Pascual, C., Peinado, V., Campos-Galindo, I., Garcia-Herrero, S., & Simón, C. (2019). Clinical application of embryo aneuploidy testing by next-generation sequencing. *Biology of reproduction*, 101(6), 1083-1090.
361. Rubio, I., Galán, A., Larreategui, Z., Ayerdi, F., Bellver, J., Herrero, J., & Meseguer, M. (2014). Clinical validation of embryo culture and selection by morphokinetic analysis: a randomized, controlled trial of the EmbryoScope. *Fertility and sterility*, 102(5), 1287-1294.
362. Rusten, T. E., Rodahl, L. M., Pattni, K., Englund, C., Samakovlis, C., Dove, S., ... & Stenmark, H. (2006). Fab1 phosphatidylinositol 3-phosphate 5-kinase controls trafficking but not silencing of endocytosed receptors. *Molecular biology of the cell*, 17(9), 3989-4001.
363. Ruth, K. S., Day, F. R., Hussain, J., Martínez-Marchal, A., Aiken, C. E., Azad, A., ... & Milani, L. (2021). Genetic insights into biological mechanisms governing human ovarian ageing. *Nature*, 596(7872), 393-397.
364. Rutherford, A. C., Traer, C., Wassmer, T., Pattni, K., Bujny, M. V., Carlton, J. G., ... & Cullen, P. J. (2006). The mammalian phosphatidylinositol 3-phosphate 5-kinase (PIKfyve) regulates endosome-to-TGN retrograde transport. *Journal of cell science*, 119(19), 3944-3957.
365. Rutstein, S. O., & Shah, I. H. (2004). Infecundity, infertility, and childlessness in developing countries. In *Infecundity, infertility, and childlessness in developing countries* (pp. 56-56).
366. Sadler, T. W. (2022). *Langman's medical embryology*. Lippincott Williams & Wilkins.
367. Saiz, I. C., Gatell, M. C. P., Vargas, M. C., Mendive, A. D., Enedáguila, N. R., Solanes, M. M., ... & de Mendoza Acosta, M. V. H. (2018). The Embryology Interest Group: updating ASEBIR's morphological scoring system for early embryos, morulae and blastocysts. *Medicina Reproductiva y Embriología Clínica*, 5(1), 42-54.

368. Saleh, A., Kashir, J., Thanassoulas, A., Safieh-Garabedian, B., Lai, F. A., & Nomikos, M. (2020). Essential role of sperm-specific PLC-zeta in egg activation and male factor infertility: an update. *Frontiers in cell and developmental biology*, 8, 28.
369. Sandhu, N., Rana, S., & Meena, K. (2021). Nuclear receptor subfamily 5 group A member 2 (NR5A2): role in health and diseases. *Molecular Biology Reports*, 48(12), 8155-8170.
370. Sang, Q., Ray, P. F., & Wang, L. (2023). Understanding the genetics of human infertility. *Science*, 380(6641), 158-163.
371. Sang, Q., Zhou, Z., Mu, J., & Wang, L. (2021). Genetic factors as potential molecular markers of human oocyte and embryo quality. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 38(5), 993-1002.
372. Santamarina-Fojo, S., Peterson, K., Knapper, C., Qiu, Y., Freeman, L., Cheng, J. F., ... & Brewer Jr, H. B. (2000). Complete genomic sequence of the human ABCA1 gene: analysis of the human and mouse ATP-binding cassette A promoter. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(14), 7987-7992.
373. Sasaki, T., Takasuga, S., Sasaki, J., Kofuji, S., Eguchi, S., Yamazaki, M., & Suzuki, A. (2009). Mammalian phosphoinositide kinases and phosphatases. *Progress in lipid research*, 48(6), 307-343.
374. Sathananthan, H., Gunasheela, S., & Menezes, J. (2003). Mechanics of human blastocyst hatching in vitro. *Reproductive biomedicine online*, 7(2), 228-234.
375. Sbrissa, D., Ikononov, O. C., & Shisheva, A. (1999). PIKfyve, a mammalian ortholog of yeast Fab1p lipid kinase, synthesizes 5-phosphoinositides: effect of insulin. *Journal of Biological Chemistry*, 274(31), 21589-21597.
376. Schoenwolf, G., Bleyl, S., Brauer, P., & Francis-West, P. (2022). *Larsen. Embriología humana*, 6. Grupo Asís Biomedica SL.
377. Schulz, K. N., & Harrison, M. M. (2019). Mechanisms regulating zygotic genome activation. *Nature Reviews Genetics*, 20(4), 221-234.
378. Schwartz, D., Mayaux, M. J., Spira, A., Moscato, M. L., Jouannet, P., Czyglik, F., & David, G. (1983). Semen characteristics as a function of age in 833 fertile men. *Fertility and sterility*, 39(4), 530-535.

379. Sciorio, R., Thong, J. K., & Pickering, S. J. (2018). Comparison of the development of human embryos cultured in either an EmbryoScope or benchtop incubator. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 35, 515-522.
380. Sciorio, R., Tramontano, L., & Catt, J. (2020). Preimplantation genetic diagnosis (PGD) and genetic testing for aneuploidy (PGT-A): status and future challenges. *Gynecological Endocrinology*, 36(1), 6-11.
381. Scotti, M. M., & Swanson, M. S. (2016). RNA mis-splicing in disease. *Nature Reviews Genetics*, 17(1), 19-32.
382. SEF, S. E. d. F. (2002). Registro FIV-ICSI de la Sociedad Española de Fertilidad. Año 2002. In "Informe estadístico final", pp. 1-33.
383. SEF, S. E. d. F. (2012). Registro de la Sociedad Española de Fertilidad: Técnicas de reproducción asistida (IA y FIV/ICSI).
384. SEF, S. E. d. F. (2020). Registro Nacional de Actividad 2020-Registro SEF. In "Informe estadístico de Técnicas de Reproducción Asistida 2019", pp. 1-61.
385. SEGO, S. E. G. O. (2017). Estudio de la pareja con disfunción reproductiva. *Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia. Prog. obstet. ginecol. (Ed. impr.)*, 267-273.
386. Segrest, J. P., Tang, C., Song, H. D., Jones, M. K., Davidson, W. S., Aller, S. G., & Heinecke, J. W. (2022). ABCA1 is an extracellular phospholipid translocase. *Nature Communications*, 13(1), 4812.
387. Sengupta, P., Dutta, S., & Krajewska-Kulak, E. (2017). The disappearing sperms: analysis of reports published between 1980 and 2015. *American journal of men's health*, 11(4), 1279-1304.
388. Shahbazi, M. N., Jedrusik, A., Vuoristo, S., Recher, G., Hupalowska, A., Bolton, V., ... & Zernicka-Goetz, M. (2016). Self-organization of the human embryo in the absence of maternal tissues. *Nature cell biology*, 18(6), 700-708.
389. Shahbazi, M. N., Scialdone, A., Skorupska, N., Weberling, A., Recher, G., Zhu, M., ... & Zernicka-Goetz, M. (2017). Pluripotent state transitions coordinate morphogenesis in mouse and human embryos. *Nature*, 552(7684), 239-243.

390. Shahbazi, M. N., Siggia, E. D., & Zernicka-Goetz, M. (2019). Self-organization of stem cells into embryos: A window on early mammalian development. *Science*, 364(6444), 948-951.
391. Shahbazi, M. N., Wang, T., Tao, X., Weatherbee, B. A., Sun, L., Zhan, Y., ... & Zernicka-Goetz, M. (2020). Developmental potential of aneuploid human embryos cultured beyond implantation. *Nature communications*, 11(1), 3987.
392. Shahbazi, M.N. (2020). Mechanisms of human embryo development: from cell fate to tissue shape and back. *Development (Cambridge, England)*, 147.
393. Shan, J., Li, D. J., & Wang, X. Q. (2023). Towards a Better Understanding of Endometriosis-Related Infertility: A Review on How Endometriosis Affects Endometrial Receptivity. *Biomolecules*, 13(3), 430.
394. Shao, Y., & Fu, J. (2020). Synthetic human embryology: towards a quantitative future. *Current Opinion in Genetics & Development*, 63, 30-35.
395. Shao, Y., Taniguchi, K., Townshend, R. F., Miki, T., Gumucio, D. L., & Fu, J. (2017). A pluripotent stem cell-based model for post-implantation human amniotic sac development. *Nature communications*, 8(1), 208.
396. Shapiro, B. S., Daneshmand, S. T., Desai, J., Garner, F. C., Aguirre, M., & Hudson, C. (2016). The risk of embryo-endometrium asynchrony increases with maternal age after ovarian stimulation and IVF. *Reproductive biomedicine online*, 33(1), 50-55.
397. Shen, M. M. (2007). Nodal signaling: developmental roles and regulation.
398. Sherbet, G. V. (2011). Growth factors and their receptors in cell differentiation, cancer and cancer therapy. Elsevier.
399. Shestak, A. G., Bukaeva, A. A., Saber, S., & Zaklyazminskaya, E. V. (2021). Allelic dropout is a common phenomenon that reduces the diagnostic yield of PCR-based sequencing of targeted gene panels. *Frontiers in genetics*, 41.
400. Shisheva, A. (2008). PIKfyve: Partners, significance, debates and paradoxes. *Cell biology international*, 32(6), 591-604.
401. Shisheva, A. (2012). PIKfyve and its lipid products in health and in sickness. *Phosphoinositides and Disease*, 127-162.

402. Simon, A. L., Kiehl, M., Fischer, E., Proctor, J. G., Bush, M. R., Givens, C., ... & Demko, Z. P. (2018). Pregnancy outcomes from more than 1,800 in vitro fertilization cycles with the use of 24-chromosome single-nucleotide polymorphism–based preimplantation genetic testing for aneuploidy. *Fertility and sterility*, 110(1), 113-121.
403. Singh, R. K., & Cooper, T. A. (2012). Pre-mRNA splicing in disease and therapeutics. *Trends in molecular medicine*, 18(8), 472-482.
404. Siristatidis, C., Stavros, S., Drakeley, A., Bettocchi, S., Pouliakis, A., Drakakis, P., ... & Vlahos, N. (2021). Omics and artificial intelligence to improve in vitro fertilization (IVF) success: a proposed protocol. *Diagnostics*, 11(5), 743.
405. Sozen, B., Can, A., & Demir, N. (2014). Cell fate regulation during preimplantation development: a view of adhesion-linked molecular interactions. *Developmental biology*, 395(1), 73-83.
406. Sozen, B., Conkar, D., & Veenvliet, J. V. (2022, June). Carnegie in 4D? Stem-cell-based models of human embryo development. In *Seminars in Cell & Developmental Biology*. Academic Press.
407. Spira, A. (1986). Epidemiology of human reproduction. *Human Reproduction*, 1(2), 111-115.
408. SSPA. (2022). Guía de Reproducción Humana Asistida en el Sistema de Salud Pública de Andalucía, 2022 [https://www.sspa.juntadeandalucia.es/servicioandaluzdesalud/sites/default/files/sincfiles/wsas-media-pdf\\_publicacion/2022/Guia%20RHA\\_SSPA\\_2022.pdf](https://www.sspa.juntadeandalucia.es/servicioandaluzdesalud/sites/default/files/sincfiles/wsas-media-pdf_publicacion/2022/Guia%20RHA_SSPA_2022.pdf)
409. Stephenson, R. O., Yamanaka, Y., & Rossant, J. (2010). Disorganized epithelial polarity and excess trophectoderm cell fate in preimplantation embryos lacking E-cadherin. *Development*, 137(20), 3383-3391. Edwards, R. G., Purdy, J. M., Steptoe, P. C., & Walters, D. E. (1981). The growth of human preimplantation embryos in vitro. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 141(4), 408-416.
410. Steptoe, P. C., Edwards, R. G., & Purdy, J. M. (1971). Human blastocysts grown in culture. *Nature*, 229(5280), 132-133.

411. Stetson, I., Izquierdo-Rico, M. J., Moros, C., Chevret, P., Lorenzo, P. L., Ballesta, J., ... & Avilés, M. (2012). Rabbit zona pellucida composition: a molecular, proteomic and phylogenetic approach. *Journal of proteomics*, 75(18), 5920-5935.
412. Stevens, V. C. (1997). Symposium: reproduction in baboons. Some reproductive studies in the baboon. *Human reproduction update*, 3(6), 533-540.
413. Stewart, C. L., Kaspar, P., Brunet, L. J., Bhatt, H., Gadi, I., Köntgen, F., & Abbondanzo, S. J. (1992). Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature*, 359(6390), 76-79.
414. Su, X., Wu, C., Ye, X., Zeng, M., Zhang, Z., Che, Y., ... & Yang, R. (2018). Embryonic lethality in mice lacking Trim59 due to impaired gastrulation development. *Cell death & disease*, 9(3), 302.
415. Suarez, S. S. (2008). Control of hyperactivation in sperm. *Human reproduction update*, 14(6), 647-657.
416. Suarez, S. S. (2015). Gamete and zygote transport. *Knobil and Neill's physiology of reproduction*, 1, 113-145.
417. Sun, W. Y., Witte, D. P., Degen, J. L., Colbert, M. C., Burkart, M. C., Holmbäck, K., ... & Degen, S. J. (1998). Prothrombin deficiency results in embryonic and neonatal lethality in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(13), 7597-7602.
418. Sun, X., Meyers, E. N., Lewandoski, M., & Martin, G. R. (1999). Targeted disruption of Fgf8 causes failure of cell migration in the gastrulating mouse embryo. *Genes & development*, 13(14), 1834-1846.
419. Sun, Y., Hu, G., Liu, H., Zhang, X., Huang, Z., Yan, H., ... & Yu, Y. (2017). Further delineation of the phenotype of truncating KMT2A mutations: The extended Wiedemann–Steiner syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 173(2), 510-514.
420. Tang, S., Lu, Y., Skinner, W. M., Sanyal, M., Lishko, P. V., Ikawa, M., & Kim, P. S. (2022). Human sperm TMEM95 binds eggs and facilitates membrane fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 119(40), e2207805119.

421. Tarazi, S., Aguilera-Castrejon, A., Joubran, C., Ghanem, N., Ashouokhi, S., Roncato, F., ... & Hanna, J. H. (2022). Post-gastrulation synthetic embryos generated ex utero from mouse naive ESCs. *Cell*, 185(18), 3290-3306.
422. Tarozzi, N., Nadalini, M., Coticchio, G., Zacà, C., Lagalla, C., & Borini, A. (2021). The paternal toolbox for embryo development and health. *Molecular Human Reproduction*, 27(7), gaab042.
423. Teklenburg, G., Salker, M., Heijnen, C., Macklon, N. S., & Brosens, J. J. (2010). The molecular basis of recurrent pregnancy loss: impaired natural embryo selection. *Molecular human reproduction*, 16(12), 886-895.
424. Tesarik, J., & Greco, E. (1999). The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. *Human reproduction*, 14(5), 1318-1323.
425. Thurston, L., Abbara, A., & Dhillon, W. S. (2019). Investigation and management of subfertility. *Journal of clinical pathology*, 72(9), 579-587.
426. Tiegs, A. W., Tao, X., Zhan, Y., Whitehead, C., Kim, J., Hanson, B., ... & Scott Jr, R. T. (2021). A multicenter, prospective, blinded, nonselection study evaluating the predictive value of an aneuploid diagnosis using a targeted next-generation sequencing-based preimplantation genetic testing for aneuploidy assay and impact of biopsy. *Fertility and sterility*, 115(3), 627-637.
427. Tiitinen, A. (2012). Prevention of multiple pregnancies in infertility treatment. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 26(6), 829-840.
428. Tiitinen, A. (2019). Single embryo transfer: why and how to identify the embryo with the best developmental potential. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 33(1), 77-88.
429. Tise, C. G., & Byers, H. M. (2021). Genetics of recurrent pregnancy loss: a review. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 33(2), 106-111.
430. Tocci, A. (2020). The unknown human trophoctoderm: implication for biopsy at the blastocyst stage. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 37(11), 2699-2711.
431. Tomic, M., Vrtacnik Bokal, E., & Stimpfel, M. (2022). Non-invasive preimplantation genetic testing for aneuploidy and the mystery of genetic material: A review article. *International journal of molecular sciences*, 23(7), 3568.

432. Tosti, E., & Ménézo, Y. (2016). Gamete activation: basic knowledge and clinical applications. *Human Reproduction Update*, 22(4), 420-439.
433. Tournaye, H., Krausz, C., & Oates, R. D. (2017). Novel concepts in the aetiology of male reproductive impairment. *The lancet Diabetes & endocrinology*, 5(7), 544-553.
434. Toyooka, Y. (2020). Trophoblast lineage specification in the mammalian preimplantation embryo. *Reproductive Medicine and Biology*, 19(3), 209-221.
435. Tracy, M. R., Dormans, J. P., & Kusumi, K. (2004). Klippel-Feil syndrome: clinical features and current understanding of etiology. *Clinical Orthopaedics and Related Research (1976-2007)*, 424, 183-190.
436. Trebichalská, Z., & Holubcová, Z. (2020). Perfect date—the review of current research into molecular bases of mammalian fertilization. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 37, 243-256.
437. Tsevat, D. G., Wiesenfeld, H. C., Parks, C., & Peipert, J. F. (2017). Sexually transmitted diseases and infertility. *American journal of obstetrics and gynecology*, 216(1), 1-9.
438. Turco, M. Y., & Moffett, A. (2019). Development of the human placenta. *Development*, 146(22), dev163428.
439. Tyser, R. C., Mahammadov, E., Nakanoh, S., Vallier, L., Scialdone, A., & Srinivas, S. (2021). Single-cell transcriptomic characterization of a gastrulating human embryo. *Nature*, 600(7888), 285-289.
440. Valdés Valdés, A., Pérez Núñez, H. M., García Rodríguez, R. E., & López Gutiérrez, A. (2010). *Embriología humana*. La Habana: Editorial Ciencias Médicas.
441. Vallejos, Y. C., Dacruz, B. H., & Vallejos, S. C. (2022). Selección de embriones en los tratamientos de fecundación in vitro. *Clínica e Investigación en Ginecología y Obstetricia*, 49(1), 100709.
442. Van Blerkom, J., Davis, P., Merriam, J., & Sinclair, J. (1995). Nuclear and cytoplasmic dynamics of sperm penetration, pronuclear formation and microtubule organization during fertilization and early preimplantation development in the human. *Human Reproduction Update*, 1(5), 429-461.

443. van Noord-Zaadstra, B. M., Looman, C. W., Alsbach, H., Habbema, J. D., te Velde, E. R., & Karbaat, J. (1991). Delaying childbearing: effect of age on fecundity and outcome of pregnancy. *British Medical Journal*, 302(6789), 1361-1365.
444. Vander Borgh, M., & Wyns, C. (2018). Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clinical biochemistry*, 62, 2-10.
445. Vassena, R., Boué, S., González-Roca, E., Aran, B., Auer, H., Veiga, A., & Belmonte, J. C. I. (2011). Waves of early transcriptional activation and pluripotency program initiation during human preimplantation development. *Development*, 138(17), 3699-3709.
446. Vaz-Drago, R., Custódio, N., & Carmo-Fonseca, M. (2017). Deep intronic mutations and human disease. *Human genetics*, 136, 1093-1111.
447. Veeck, L. L. (1988). Oocyte assessment and biological performance. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 541(1), 259-274.
448. Vérguez, J. C. (2020). *La sanidad en España: Situación actual y perspectivas de futuro* (1st ed.). Dykinson, S.L.
449. Vinot, S., Le, T., Ohno, S., Pawson, T., Maro, B., & Louvet-Vallée, S. (2005). Asymmetric distribution of PAR proteins in the mouse embryo begins at the 8-cell stage during compaction. *Developmental biology*, 282(2), 307-319.
450. Vondrakova, J., Frolikova, M., Ded, L., Cerny, J., Postlerova, P., Palenikova, V., ... & Komrskova, K. (2022). MAIA, Fc receptor-like 3, supersedes JUNO as IZUMO1 receptor during human fertilization. *Science Advances*, 8(36), eabn0047.
451. Voss, A. K., Thomas, T., & Gruss, P. (2000). Mice lacking HSP90beta fail to develop a placental labyrinth. *Development*, 127(1), 1-11.
452. Vuoristo, S., Bhagat, S., Hyden-Granskog, C., Yoshihara, M., Gawriyski, L., Jouhilahti, E. M., ... & Kere, J. (2022). DUX4 is a multifunctional factor priming human embryonic genome activation. *Science*, 25(4), 104137.
453. Walker, M. H., & Tobler, K. J. (2020). Female infertility.
454. Wamaitha, S. E., & Niakan, K. K. (2018). Human pre-gastrulation development. *Current topics in developmental biology*, 128, 295-338.

455. Wanderling, S., Simen, B. B., Ostrovsky, O., Ahmed, N. T., Vogen, S. M., Gidalevitz, T., & Argon, Y. (2007). GRP94 is essential for mesoderm induction and muscle development because it regulates insulin-like growth factor secretion. *Molecular biology of the cell*, 18(10), 3764-3775.
456. Wang, A., Kort, J., & Westphal, L. (2019). Miscarriage history association with euploid embryo transfer outcomes. *Reproductive biomedicine online*, 39(4), 617-623.
457. Wang, C., Schroeder, K. B., & Rosenberg, N. A. (2012). A maximum-likelihood method to correct for allelic dropout in microsatellite data with no replicate genotypes. *Genetics*, 192(2), 651-669.
458. Wang, H., & Dey, S. K. (2006). Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nature Reviews Genetics*, 7(3), 185-199.
459. Wang, R., Van Eekelen, R., Mochtar, M. H., Mol, F., & Van Wely, M. (2020, January). Treatment strategies for unexplained infertility. In *Seminars in reproductive medicine* (Vol. 38, No. 01, pp. 048-054). Thieme Medical Publishers, Inc..
460. Wang, Y., Zhu, Y., Sun, Y., Di, W., Qiu, M., Kuang, Y., & Shen, H. (2018). Ideal embryo transfer position and endometrial thickness in IVF embryo transfer treatment. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 143(3), 282-288.
461. Wassarman, P. M., & Litscher, E. S. (2008). Mammalian fertilization is dependent on multiple membrane fusion events. *Cell Fusion: Overviews and Methods*, 99-113.
462. Watson, A. J., & Barcroft, L. C. (2001). Regulation of blastocyst formation. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, 6, 708.
463. Werlin, L., Rodi, I., DeCherney, A., Marello, E., Hill, D., & Munné, S. (2003). Preimplantation genetic diagnosis as both a therapeutic and diagnostic tool in assisted reproductive technology. *Fertility and Sterility*, 80(2), 467-468.
464. Winters, B. R., & Walsh, T. J. (2014). The epidemiology of male infertility. *Urologic Clinics*, 41(1), 195-204.
465. Witchi, E. (1948). Migration of the germ cells of human embryos from the yolk sac to the primitive gonadal folds. *Contrib Embryol Carnegie Inst*, 32, 67-80.

466. Wong, C., Loewke, K., Bossert, N. et al. Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage. *Nat Biotechnol* 28, 1115–1121 (2010). <https://doi.org/10.1038/nbt.1686>
467. Wong, R. W., Blobel, G., & Coutavas, E. (2006). Rae1 interaction with NuMA is required for bipolar spindle formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(52), 19783-19787.
468. WHO, World Health Organization. (2023). Infertility prevalence estimates: 1990–2021.
469. Wu, M., Yin, Y., Zhao, M., Hu, L., & Chen, Q. (2013). The low expression of leukemia inhibitory factor in endometrium: possible relevant to unexplained infertility with multiple implantation failures. *Cytokine*, 62(2), 334-339.
470. Xiang, L., Yin, Y., Zheng, Y., Ma, Y., Li, Y., Zhao, Z., ... & Li, T. (2020). A developmental landscape of 3D-cultured human pre-gastrulation embryos. *Nature*, 577(7791), 537-542.
471. Xin, Q., Kong, S., Yan, J., Qiu, J., He, B., Zhou, C., ... & Wang, H. (2018). Polycomb subunit BMI1 determines uterine progesterone responsiveness essential for normal embryo implantation. *The Journal of Clinical Investigation*, 128(1), 175-189.
472. Xu, Y., Zhang, T., Zhou, Q., Hu, M., Qi, Y., Xue, Y., ... & Shi, W. (2021). A single-cell transcriptome atlas of human early embryogenesis. *BioRxiv*, 2021-11.
473. Xue, J., Wu, Q., Westfield, L. A., Tuley, E. A., Lu, D., Zhang, Q., ... & Sadler, J. E. (1998). Incomplete embryonic lethality and fatal neonatal hemorrhage caused by prothrombin deficiency in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(13), 7603-7607.
474. Xue, X., Sun, Y., Resto-Irizarry, A. M., Yuan, Y., Aw Yong, K. M., Zheng, Y., ... & Fu, J. (2018). Mechanics-guided embryonic patterning of neuroectoderm tissue from human pluripotent stem cells. *Nature materials*, 17(7), 633-641.
475. Yamashita, M., Honda, A., Ogura, A., Kashiwabara, S. I., Fukami, K., & Baba, T. (2008). Reduced fertility of mouse epididymal sperm lacking Prss21/Tesp5 is rescued by sperm exposure to uterine microenvironment. *Genes to Cells*, 13(10), 1001-1013.

476. Yan, L., Yang, M., Guo, H., Yang, L., Wu, J., Li, R., ... & Tang, F. (2013). Single-cell RNA-Seq profiling of human preimplantation embryos and embryonic stem cells. *Nature structural & molecular biology*, 20(9), 1131-1139.
477. Yanagimachi, R. (1978). Sperm-egg association in mammals. *Current topics in developmental biology*, 12, 83-105.
478. Yanagimachi, R. (1994). Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote*, 2(4), 371-372.
479. Yang, C. H., Szeliga, J., Jordan, J., Faske, S., Sever-Chroneos, Z., Dorsett, B., ... & Chroneos, Z. C. (2005). Identification of the surfactant protein A receptor 210 as the unconventional myosin 18A. *Journal of Biological Chemistry*, 280(41), 34447-34457.
480. Yang, H., DeWan, A. T., Desai, M. M., & Vermund, S. H. (2022). Preimplantation genetic testing for aneuploidy: challenges in clinical practice. *Human Genomics*, 16(1), 69.
481. Yang, H., Liu, Y., Niu, W., Yang, Z., Wang, Y., Jin, H., & Li, G. (2022). Correlation study of male semen parameters and embryo aneuploidy in preimplantation genetic testing for aneuploidy. *Frontiers in Endocrinology*, 13.
482. Yang, R., Goedel, A., Kang, Y., Si, C., Chu, C., Zheng, Y., ... & Chien, K. (2020). Essential amnion signals for primate primitive streak formation resolved by scRNA map. *bioRxiv*, 2020-05.
483. Ye, M., Berry-Wynne, K. M., Asai-Coakwell, M., Sundaresan, P., Footz, T., French, C. R., ... & Lehmann, O. J. (2010). Mutation of the bone morphogenetic protein GDF3 causes ocular and skeletal anomalies. *Human molecular genetics*, 19(2), 287-298.
484. Yu, L., Wei, Y., Duan, J., Schmitz, D. A., Sakurai, M., Wang, L., ... & Wu, J. (2021). Blastocyst-like structures generated from human pluripotent stem cells. *Nature*, 591(7851), 620-626.
485. Yurttas, P., Vitale, A. M., Fitzhenry, R. J., Cohen-Gould, L., Wu, W., Gossen, J. A., & Coonrod, S. A. (2008). Role for PADI6 and the cytoplasmic lattices in ribosomal storage in oocytes and translational control in the early mouse embryo.

486. Zegers-Hochschild, F., Adamson, G. D., De Mouzon, J., Ishihara, O., Mansour, R., Nygren, K., ... & Van der Poel, S. (2009). The international committee for monitoring assisted reproductive technology (ICMART) and the world health organization (WHO) revised glossary on ART terminology, 2009. *Human reproduction*, 24(11), 2683-2687.
487. Zegers-Hochschild, F., Adamson, G. D., Dyer, S., Racowsky, C., De Mouzon, J., Sokol, R., ... & Van Der Poel, S. (2017). The international glossary on infertility and fertility care, 2017. *Human reproduction*, 32(9), 1786-1801.
488. Zehravi, M., Maqbool, M., & Ara, I. (2021). Polycystic ovary syndrome and reproductive health of women: a curious association. *International journal of adolescent medicine and health*, 33(6), 333-337.
489. Zeng, Y., & Chen, T. (2019). DNA methylation reprogramming during mammalian development. *Genes*, 10(4), 257.
490. Zernicka-Goetz, M., Morris, S. A., & Bruce, A. W. (2009). Making a firm decision: multifaceted regulation of cell fate in the early mouse embryo. *Nature Reviews Genetics*, 10(7), 467-477.
491. Zhang, D., Zhu, L., Liu, Z., Ren, X., Yang, X., Li, D., ... & Zhang, X. (2021). A novel mutation in ZP3 causes empty follicle syndrome and abnormal zona pellucida formation. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 38, 251-259.
492. Zhang, Y., Zolov, S. N., Chow, C. Y., Slutsky, S. G., Richardson, S. C., Piper, R. C., ... & Weisman, L. S. (2007). Loss of Vac14, a regulator of the signaling lipid phosphatidylinositol 3, 5-bisphosphate, results in neurodegeneration in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(44), 17518-17523.
493. Zhong, Y., Xu, F., Wu, J., Schubert, J., & Li, M. M. (2021). Application of next generation sequencing in laboratory medicine. *Annals of Laboratory Medicine*, 41(1), 25-43.
494. Zhou, J., Wang, M., Yang, Q., Li, D., Li, Z., Hu, J., ... & Zhu, L. (2022). Can successful pregnancy be achieved and predicted from patients with identified ZP mutations? A literature review. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 20(1), 166.
495. Zhu, M., & Zernicka-Goetz, M. (2020). Principles of self-organization of the mammalian embryo. *Cell*, 183(6), 1467-1478.

496. Zhu, M., Shahbazi, M., Martin, A., Zhang, C., Sozen, B., Borsos, M., ... & Zernicka Goetz, M. (2021). Human embryo polarization requires PLC signaling to mediate trophectoderm specification. *Elife*, 10, e65068.
497. Zhu, P., Guo, H., Ren, Y., Hou, Y., Dong, J., Li, R., ... & Tang, F. (2018). Single-cell DNA methylome sequencing of human preimplantation embryos. *Nature genetics*, 50(1), 12-19.
498. Zinaman, M. J., Clegg, E. D., Brown, C. C., O'Connor, J., & Selevan, S. G. (1996). Estimates of human fertility and pregnancy loss. *Fertility and sterility*, 65(3), 503-509.
499. Zondervan, K.T., Becker, C.M., Missmer, S.A. (2020). Endometriosis. *The New England Journal of Medicine*. 26;382(13):1244-1256.
500. Zou, Y., Li, S., Ming, L., Yang, Y., Ye, P., & Zou, J. (2022). The Correlation between Chronic Endometritis and Tubal-Factor Infertility. *Journal of Clinical Medicine*, 12(1), 285.