

INFLUENCIA DEL SEXO DEL EMBRIÓN EN LAS PRIMERAS ETAPAS DEL DESARROLLO MORFOCINÉTICO

TRABAJO DE FIN DE GRADO - BIOTECNOLOGÍA

AUTOR:
ESTELA MORONO SOBRAL

TUTOR ACADÉMICO:
MARIA TERESA BLAY OLIVÉ

TUTOR DE PRÁCTICAS:
ENRIC GÜELL PENAS



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Tarragona – 2018/19

“Nada en la vida es para ser temido,
es sólo para ser comprendido”

Marie Curie (1867 - 1934)

Este trabajo de fin de grado se ha basado en los resultados obtenidos durante mis prácticas curriculares en el centro de reproducción asistida Institut Conceptum (Reus, Tarragona). Ha sido realizado bajo la guía y supervisión de Enric Güell Penas, director del laboratorio de la empresa.



TABLA DE CONTENIDOS

1	GLOSARIO Y ACRÓNIMOS	1
2	RESUMEN Y PALABRAS CLAVE	2
3	MARCO TEÓRICO	3
3.1	EVOLUCIÓN DE LAS TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN <i>IN VITRO</i>	3
3.2	EVALUACIÓN EMBRIONARIA CONVENCIONAL	4
3.3	EVALUACIÓN EMBRIONARIA TIME-LAPSE.....	5
3.3.1	PARÁMETROS TIME-LAPSE.....	6
3.4	ESTUDIO DEL SEXO EMBRIONARIO	10
4	HIPÓTESIS	12
5	OBJETIVO	12
6	MATERIALES Y MÉTODOS	13
6.1	PACIENTES	13
6.2	TÉCNICA DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA	13
6.3	EVALUACIÓN EMBRIONARIA MEDIANTE TIME-LAPSE	15
6.4	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	16
7	RESULTADOS	18
8	DISCUSIÓN	25
9	CONCLUSIONES	29
10	AUTOEVALUACIÓN	31
11	BIBLIOGRAFÍA	32
12	ANEXOS	35

1 GLOSARIO Y ACRÓNIMOS

- **FSH:** hormona estimuladora del folículo
- **FIV:** Fecundación *in vitro*, existen dos tipos de técnicas: la ICSI y la FIV convencional.
- **ICSI:** Inyección intracitoplasmática de esperma
- **TLS:** Sistema time-lapse. Tecnología que permite visualizar una secuencia de imágenes fijas (recogidas periódicamente) reproducidas a mayor velocidad.
- **Embriogénesis:** Proceso complejo que conduce a la formación de un organismo pluricelular animal a partir del cigoto, iniciado con la fecundación de los gametos para dar lugar al embrión que tras su etapa de desarrollo pasa a denominarse feto.
- **Morfocinética embrionaria:** Aplicación de los tiempos de desarrollo a la morfología del embrión.
- **Variables morfocinéticas:** Eventos celulares dinámicos que ocurren en las primeras etapas del desarrollo embrionario visibles gracias a su monitorización continua.
- **Parámetros time-lapse:** Variables relacionadas con el tiempo de división y el tiempo de suceso de cambios dinámicos en la morfología del embrión.
- **Desarrollo preimplantacional:** Periodo anterior a la implantación del embrión en el útero que promueve la formación del blastocisto. Se caracteriza por el aumento del número de células totipotentes que se diferencian hasta la aparición de tres linajes celulares distintos.

2 RESUMEN Y PALABRAS CLAVE

Estudio retrospectivo con el propósito de determinar si el género del embrión podría influir en la morfocinética del desarrollo embrionario preimplantacional. Se ha planteado que los cromosomas sexuales podrían tener efectos intrínsecos en las variables morfocinéticas de las primeras etapas de la embriogénesis. Participaron en el estudio un total de 33 pacientes que habían pasado por un ciclo de reproducción asistida con fecundación *in vitro* por ICSI en la clínica del Institut Conceptum. Los datos morfocinéticos analizados en el estudio fueron obtenidos con la monitorización por time-lapse de los embriones nacidos vivos (n=49) y de sexo conocido: femenino XX (n=25) y masculino XY (n=24). Los resultados obtenidos en el estudio confirmaron la hipótesis inicial, se observaron diferencias significativas entre ambos sexos en la duración de la fase-M del segundo ciclo celular limitada por la desaparición del núcleo interfásico y la siguiente división celular. La duración de esta fase fue significativamente mayor en embriones femeninos ($2,01 \pm 0,32h$) que en embriones de sexo masculino ($1,81 \pm 0,27$, p-value = 0,030). Finalmente, se ha sugerido que los rangos de duración de las fases del segundo ciclo celular podrían ser de utilidad para desarrollar un modelo predictivo del género embrionario.

Palabras clave: Reproducción asistida, evaluación time-lapse, sexo embrionario, variables morfocinéticas, desarrollo preimplantacional.

3 MARCO TEÓRICO

3.1 EVOLUCIÓN DE LAS TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN *IN VITRO*

El primer nacimiento gracias a una técnica de fecundación *in vitro* (FIV) en un laboratorio tuvo lugar en Gran Bretaña en 1978, fue en ese momento cuando los investigadores Edwards y Steptoe consiguieron que una mujer con oclusión tubárica bilateral (OTB), incapaz de concebir de forma natural, diese a luz a su primer hijo. Este niño fue considerado el primer “bebé probeta” y su nacimiento representó el origen de la rápida expansión de las técnicas de reproducción asistida. A partir de ese momento muchos investigadores después de ellos previeron la aplicación de estas técnicas para otros diagnósticos de infertilidad (Rosenwaks and Pereira, 2017).

La FIV convencional consigue una fecundación similar a la natural tras poner en contacto la muestra seminal con los ovocitos bajo condiciones de cultivo óptimo *in vitro*. Esta técnica ha sido utilizada como tratamiento de infertilidad tanto femenina como masculina reduciendo la distancia de encuentro entre el ovocito y el espermatozoide ayudando así a que se produzca la fecundación.

Desde su aparición las técnicas de reproducción asistida han estado en continuo perfeccionamiento, los avances en el campo de la biología de la reproducción y la innovación en estas técnicas han conseguido mejorar el rendimiento de los tratamientos. Un ejemplo de ello fue lograr la inducción hormonal del crecimiento folicular ovárico. La administración externa de FSH (*Follicle stimulating hormone*) permitió que el ciclo de fecundación *in vitro* no se limitase a un solo ovocito recuperado consiguiendo aumentar el número de embriones resultantes. No obstante, a pesar de los avances, la FIV convencional seguía sujeta a una alta probabilidad de fracaso cuando la causa de la esterilidad masculina era la oligozoospermia, es decir, una baja concentración de esperma. Limitación que pudo ser superada en 1992 con el desarrollo de una nueva técnica, la fecundación *in vitro* por inyección intracitoplasmática de esperma (ICSI). Esta técnica revolucionó el tratamiento de la infertilidad masculina permitiendo la

fecundación del ovocito con la inyección de un único espermatozoide en su interior y bajo las condiciones de cultivo óptimas se consiguió incrementar la ratio de fertilización (Rosenwaks and Pereira, 2017). Sin embargo, a pesar del progreso tecnológico en estas técnicas, el procedimiento permanece asociado a bajas tasas de implantación del embrión en el útero, por lo que con el objetivo de incrementarlas se suele transferir más de un embrión por ciclo de FIV conllevando también a altas tasas de embarazo múltiple (Raquel *et al.*, 2019).

Aunque muchos factores como el desarrollo del endometrio contribuyen a una implantación exitosa, se ha visto que optimizando la calidad de los embriones transferidos se consigue mejorar los resultados del tratamiento. Por consiguiente minimizar la ratio de embarazos múltiples e incrementar la probabilidad de éxito de implantación, de embarazo y de nacidos vivos gracias a los ciclos de fecundación *in vitro* (Alegre *et al.*, 2019).

3.2 EVALUACIÓN EMBRIONARIA CONVENCIONAL

Desde la aparición de las técnicas de fecundación *in vitro*, la evaluación morfológica ha sido la herramienta básica para valorar la calidad embrionaria permitiendo así seleccionar el mejor embrión para transferir al útero materno. El método de evaluación convencional consiste en un análisis microscópico rutinario del embrión, durante el cual se valora la evolución de su desarrollo en diferentes puntos de tiempo en los días de cultivo 2 y 3 (D+2, D+3) (Motato *et al.*, 2016). Este análisis se basa en evaluaciones estáticas de la morfología del embrión en los intervalos de tiempo en los que han debido ocurrir los eventos celulares de las etapas tempranas de la embriogénesis.

La evaluación convencional sigue las determinaciones establecidas en el convenio europeo de Estambul (Balaban *et al.*, 2011), donde se define el nivel de desarrollo que debe tener el embrión en intervalos definidos de tiempo. La presencia o ausencia de ciertas características en el embrión permite asignarle una puntuación que lo clasificará según su calidad en cuatro grupos: A, B, C y D. La guía ASEBIR es el documento que a nivel nacional recoge los criterios del consenso

europeo para la evaluación embrionaria (**Anexo 1**) (Hurtado de Mendoza and Ten, 2015). Sin embargo, pese a ser el método de evaluación más extendido y estandarizado se trata de un método subjetivo y asociado a una considerable variabilidad inter e intra observador. Además, puede llegar a ser dañino para el embrión, ya que para evaluar su morfología éste debe enfrentarse a condiciones subóptimas fuera del incubador. Por ello, se considera que este método de evaluación convencional puede estar asociado a un descenso del éxito de la FIV/ICSI (Motato *et al.*, 2016).

3.3 EVALUACIÓN EMBRIONARIA TIME-LAPSE

En los últimos años se ha desarrollado una nueva tecnología que permite la monitorización continua del embrión durante su periodo de cultivo sin la necesidad de interrumpir su incubación. Se trata de un sistema automático time-lapse que captura imágenes digitales del embrión en intervalos definidos de tiempo que después se reproducen a mayor velocidad. Esta tecnología se encuentra acoplada directamente al incubador manteniendo las condiciones de cultivo estables y sin interrupciones. La aplicación de este sistema para el cultivo embrionario se ha extendido rápidamente en los laboratorios de FIV, ya que se considera una herramienta segura que permite la evaluación no-invasiva de los embriones (Raquel *et al.*, 2019).

La tecnología time-lapse genera información exhaustiva sobre la morfología y la cinética del desarrollo embrionario facilitando la observación de eventos dinámicos imposibles de percibir con el análisis estático convencional. Además, su vinculación a un software informático permite rastrear los tiempos en los que suceden los eventos celulares de las primeras etapas y medir la duración de estos. Estos acontecimientos celulares visibles durante el desarrollo embrionario fueron definidos como variables "morfocinéticas" (Meseguer *et al.*, 2011).

En los últimos años numerosos estudios han propuesto directrices sobre la nomenclatura de estas variables morfocinéticas y cómo y cuándo deben anotarse de manera uniforme. Aunque ninguno de estos ha sido establecido como estándar

internacional, sí existen artículos de referencia que establecen las pautas de nomenclatura y anotación de estas variables en forma de parámetros time-lapse. (Meseguer *et al.*, 2011); (Ciray *et al.*, 2014). En ellos el tiempo ha sido representado como “t”. La aparición de una variable descrita se representa como “a” (appearance) y su desvanecimiento como “f” (fading). El número de la célula se representa como “n”.

A continuación, se exponen los parámetros time-lapse para la monitorización de las principales variables morfocinéticas del desarrollo embrionario.

3.3.1 PARÁMETROS TIME-LAPSE

Tiempo de inicio (t₀)

Momento de inicio del proyecto time-lapse, corresponde al punto en el que se registra la microinyección del esperma en el ovocito durante la ICSI. Este parámetro time-lapse no se relaciona con una variable morfocinética, pero su anotación en el software es importante, ya que las siguientes variables se miden en horas después de la ICSI.

t_{PB2}

Tiempo en el que se produce la extrusión del segundo corpúsculo polar.

Antes de la fecundación el ovocito se encontraba arrestado en metafase II, cuando ésta se produce el ciclo de meiosis II se completa y la célula se divide generándose en el proceso el segundo corpúsculo polar. El momento de extrusión se registra cuando el corpúsculo polar se encuentra separado completamente del oolema del óvulo.

t_{PNa}

Tiempo de aparición de los pronúcleos, momento en el que se confirma el estatus de fertilización.

Unas horas después de la inseminación, el espermatozoide y el óvulo activos forman el pronúcleo masculino y el pronúcleo femenino, ambos haploides (n). Los pronúcleos migran uno hacia el otro hasta aproximarse en el centro, donde se fusionan para formar el cigoto diploide (2n).

tPNf

Tiempo de desvanecimiento de los pronúcleos.

Cuando se inicia la fase mitótica del primer ciclo celular los pronúcleos comienzan a perder su envoltura nuclear, por ello se ven con menor intensidad.

t2

Tiempo en el que se produce la primera división celular.

Tras la mitosis el cigoto se divide en dos blastómeros, el parámetro se anota cuando las células resultantes de la división están separadas completamente.

Esta división marca el inicio de un nuevo ciclo celular (Cc2) que en las células totipotentes iniciales del embrión (blastómeras) solo comprende dos fases: la fase-S de replicación del DNA y síntesis de proteínas y la fase-M de división celular (mitosis y citocinesis).

tNaCc2 y tNfCc2

Tiempo de aparición de los núcleos interfásicos de ambas blastómeras (tNaCc2), indica el momento en que la envoltura nuclear se vuelve a reestructurar.

El tiempo de la desaparición (tNfCc2) es el momento en que la célula pierde la envoltura nuclear para iniciar la fase-M del segundo ciclo celular.

t3 y t4

Tiempo de división de las dos células anteriores. El parámetro t3 se anota cuando se divide una de las blastómeras y se observan tres células. La siguiente división se indica como t4 y es el punto en que se observan cuatro blastómeras.

Estas divisiones marcan el inicio del tercer ciclo celular (Cc3).

tNaCc3 y tNfCc3

De la misma forma que en el ciclo anterior estos parámetros marcan la aparición del núcleo interfásico (tNaCc3) por la reestructuración de la envoltura nuclear y su desvanecimiento (tNfCc3) durante el tercer ciclo celular.

t5, t6, t7 y t8

Tiempo de división de los cuatro blastómeros anteriores. Los parámetros se anotan como t5 cuando se observan cinco células en el blastómero, las siguientes divisiones se marcan como t6, t7 y t8 en ese orden.

tSC

Tiempo en el que se evidencia el inicio de la compactación, tras consecutivas divisiones las células del blastómero establecen uniones estrechas intercelulares.

tMp/f

Tiempo de final de compactación o de formación de la mórula. En ocasiones la compactación puede ser incompleta y la mórula excluye una o varias células, esto se indica con el parámetro tMp. Si la compactación es completa se marca como tMf.

tSB y tB

Tiempo de inicio de la formación del blastocisto, momento en el que se comienza a observar la cavidad interna llamada blastocele.

El punto de tiempo en el que el blastocisto se completa se indica el parámetro tB, evento que ocurre justo antes del comienzo de la expansión.

tE

Inicio de la expansión del blastocisto, la zona pelúcida comienza a estrecharse para que el blastocisto aumente de tamaño.

Los parámetros time-lapse relacionan el tiempo con las variables morfocinéticas, es decir, marcan los tiempos de división y de cambios dinámicos en la morfología del embrión. En **figura 1**, se muestran las principales variables morfocinéticas que ocurren durante la etapa de desarrollo preimplantacional del embrión.

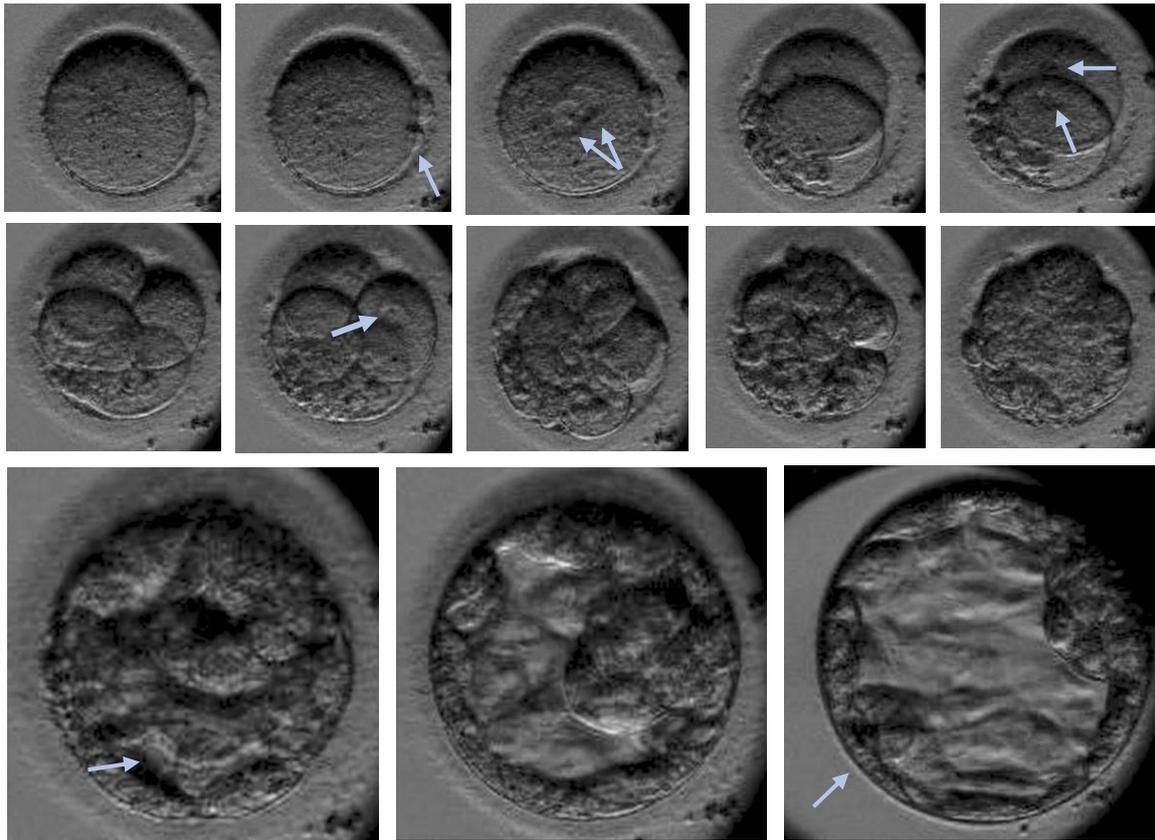


Figura 1. Principales variables morfocinéticas del desarrollo embrionario preimplantacional.

A) Ovocito tras la ICSI; B) Aparición del segundo corpúsculo polar (tPB2); C) Aparición de los pronúcleos (tPNa); D) Primera división celular (t2); E) Aparición de los núcleos interfásicos del segundo ciclo celular (tNaCc2); F) División celular en tres (t3) y cuatro células (t4); G) Aparición de los núcleos interfásicos del tercer ciclo celular (tNaCc3); H) División de t5 y t6; I) tiempo de división de 8 células (t8); J) Inicio de compactación (tM); K) Inicio de formación de la blástula (tSB); L) Blástula completa (tB); M) Inicio de la expansión (tE).

Durante las últimas décadas la implantación de la tecnología time-lapse en la mayoría de los laboratorios ha posibilitado la obtención de una gran cantidad de datos recolectados sobre las variables morfocinéticas. El análisis de estos datos ha llevado a los investigadores a pensar en la existencia de una estrecha relación entre la genética del embrión y los tiempos en los que suceden los eventos celulares (Zaninovic *et al.*, 2017). Por ello, las investigaciones más recientes están muy enfocadas en el análisis de estas variables morfocinéticas, optimizando la construcción de algoritmos que puedan impulsar la detección de embriones con aneuploidías con el fin de aumentar la ratio de implantación (IR) y disminuir la probabilidad de aborto (Raquel *et al.*, 2019).

3.4 ESTUDIO DEL SEXO EMBRIONARIO

La identificación del sexo suele estar limitada a la etapa fetal por medio de ecografías. No obstante, cuando se realizan tratamientos de fecundación asistida es posible conocerlo mucho antes. Hasta el momento la única forma de conocer el sexo embrionario es por medio de un PGS (*Pre-implantation Genetic Screening*) con biopsia celular del embrión. Esta técnica suele realizarse para detectar posibles anomalías genéticas, pero también arroja información sobre el sexo. Sin embargo, al tratarse de una técnica invasiva para el embrión y de alto coste generalmente no se realiza con este fin.

Las primeras investigaciones direccionadas al estudio del sexo preimplantacional sin biopsia celular fueron realizadas en mamíferos no humanos como es el caso del ganado bovino. Estos estudios basaron su análisis en la evaluación estática convencional de la morfología del embrión con el objetivo principal de determinar si existían diferencias en el desarrollo embrionario entre ambos géneros. Sus resultados mostraron que, durante el desarrollo de estos mamíferos, los embriones hembras progresaban más lentos que los embriones de género masculino. Las similitudes entre el desarrollo embrionario bovino y el humano en los tiempos de activación del genoma y en la duración del desarrollo preimplantacional han contribuido a dirigir investigaciones similares en embriones humanos (Oliveira *et al.*, 2016). Los primeros estudios sobre el sexo embrionario en humanos se basaron también en la evaluación convencional de su morfología. Sin embargo, a diferencia de los estudios bovinos sus resultados mostraron patrones morfocinéticos similares en el desarrollo embrionario entre ambos sexos. No obstante, la aparición del time-lapse ha permitido llevar a cabo estudios de mayor complejidad que monitorizan todo el desarrollo embrionario.

Con la aplicación de la tecnología time-lapse las investigaciones más actuales han querido determinar si existe relación entre la genética del sexo del embrión y su desarrollo morfocinético. No obstante, hasta el momento se han obtenido resultados muy dispares. Mientras algunos de los estudios concluyen que no existen diferencias significativas en las variables morfocinéticas entre sexos

(Serdarogullari *et al.*, 2014), otros sí han mostrado que el desarrollo de los embriones masculinos es significativamente más rápido. Sin embargo, existe mucha controversia en los resultados sobre cuál es la variable que podría verse afectada por el sexo. Algunas investigaciones determinan que podría tratarse de diferencias en los tiempos de división previos a la implantación (Bodri *et al.*, 2016), en el tiempo de formación de la mórula (Bronet *et al.*, 2015) o en el tiempo de división del segundo ciclo celular, t_3 (Huang *et al.*, 2019).

No obstante, en la mayoría de los estudios sobre el sexo embrionario citados anteriormente no se hace referencia a la desaparición del núcleo interfásico, un fenómeno morfocinético que se repite en el momento previo a cada división celular. El presente estudio quiere analizar las variables morfocinéticas del desarrollo embrionario que puedan presentar variaciones entre ambos sexos haciendo hincapié en la variable morfocinética de desaparición nuclear en los diferentes ciclos celulares. Esta se define por los parámetros t_{PNf} , t_{NfCc2} y t_{NfCc3} y marca el límite entre la fase-S y la fase-M del ciclo celular de las primeras etapas del desarrollo.

4 HIPÓTESIS

Este trabajo se plantea como hipótesis si el género del embrión definido por las combinaciones de sus cromosomas sexuales XX (femenino) o XY (masculino) influirá de forma diferente en las variables morfocinéticas de su etapa preimplantacional.

Estas variaciones morfocinéticas entre ambos sexos podrían ser atribuidas a eventos que ocurren en los cromosomas sexuales durante las fases de replicación del DNA o de división celular. Por consiguiente, se propone que introduciendo en el estudio variables morfocinéticas como la desaparición nuclear se podrá obtener mayor información sobre el dimorfismo sexual en las primeras etapas del embrión.

Hasta el momento la única forma de conocer el sexo embrionario es con un PGS (*Pre-implantation Genetic Screening*) con biopsia celular del embrión. Se sugiere que identificar una o más variables morfocinéticas afectadas por el sexo podría ser de utilidad para predecir el género del embrión antes de su transferencia de forma no invasiva.

5 OBJETIVO

El propósito de este estudio será determinar si las variables morfocinéticas del desarrollo temprano preimplantacional pueden verse afectadas por el sexo del embrión.

De esta manera, nuestros objetivos específicos son:

1. Comparar entre embriones de sexo femenino y masculino los parámetros time-lapse de las variables morfocinéticas del desarrollo.
2. Elaborar un modelo de predicción del sexo embrionario a partir de las variables morfocinéticas con patrón diferencial entre embriones de distinto sexo.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 PACIENTES

El presente estudio se ha basado en un total de 33 pacientes de la clínica Institut Conceptum de Reus que habían iniciado un ciclo de tratamiento de reproducción asistida entre los años 2014 y 2018. Este estudio retrospectivo ha utilizado los datos morfocinéticos de los embriones nacidos vivos (n= 49) a partir de los ciclos de reproducción asistida realizados en la clínica a estas pacientes. El sexo de los embriones, masculino (n=24) y femenino (n=25), pudo conocerse después de su nacimiento.

El criterio de exclusión utilizado para los embriones fue que hubiesen nacido vivos, de esta forma pudieron ser descartadas posibles complicaciones graves en la genética embrionaria que alteren su evaluación morfocinética. Además, en el estudio solo fueron consultados los datos morfocinéticos de los embriones eSET (single transfer embryos) y en los casos de transferencia múltiple de dos embriones solo si los nacidos habían sido del mismo sexo, esto ha servido para asegurarse que los embriones evaluados corresponden al nacido de sexo conocido.

Todas las pacientes habían pasado por un ciclo similar de fecundación *in vitro* por ICSI y no fue realizada ninguna intervención adicional.

6.2 TÉCNICA DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA

ESTIMULACIÓN OVÁRICA Y OVUM-PICK UP

Antes de comenzar el ciclo de fecundación *in vitro* todas las pacientes fueron sometidas a un periodo de estimulación ovárica inicial. Brevemente, para ello las mujeres empezaron con una dosis subcutánea de FSH en concentraciones de 150 a 225 UI (máx.) y 0,25 mg de GnRH antagonista (Ganirelix) diariamente empezando el día 5 o 6 después de la administración de la FSH. El ciclo de la paciente fue monitorizado desde el inicio del tratamiento hormonal, fue administrada hCG (Ovitrelle) cuando al menos dos de los folículos habían

alcanzado un diámetro de >17 mm para provocar la ovulación. La punción ovárica fue realizada 36 horas después.

La punción folicular ovárica fue efectuada por el ginecólogo de la clínica. Esta técnica consistió en la aspiración del líquido folicular ovárico donde se encuentran los ovocitos. Más tarde la recuperación de estos fue realizada por el biólogo siguiendo el protocolo Ovum pick-up, los ovocitos fueron lavados en medio de manipulación de gametos (G-MOPS, Vitrolife) y cultivados en medio de cultivo de gametos (G-IVF, Vitrolife) a 5% CO₂ y 37°C. Dos horas después de la obtención, los ovocitos fueron desnudados eliminando el cúmulo de células que los envuelve gracias a su breve exposición (30-45s) a un medio con enzima hialuronidasa y al pipeteo mecánico. Posteriormente, fueron seleccionados los ovocitos maduros que se encuentran en metafase II comprobando la presencia del corpúsculo polar primario.

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA SEMINAL

El semen utilizado para realizar la fecundación por ICSI fue obtenido en fresco o por medio del banco de semen *Fertibank*. La preparación del semen para la técnica fue realizada siguiendo el método de gradientes de densidad. Primeramente, se prepararon concentraciones coloidales al 45% y 90% que se mezclaron a partes iguales en concentraciones 1:1:2 con la muestra seminal. La solución coloidal con la muestra seminal fue centrifugada durante 20 minutos a 1600 rpm. Más tarde fue retirado el sobrenadante y se añadió 2 ml de medio IVF, la solución fue centrifugada nuevamente a 2000 rpm durante 8 minutos. Finalmente, el volumen fue reducido a 0,5 ml y resuspendido.

Una gota de la muestra seminal fue colocada en una placa de ICSI diluida en medio PVP que reduce la movilidad espermática. En la misma placa en gotas de medio de gametos tamponado-MOPS fueron situados los ovocitos previamente desnudados.

TÉCNICA ICSI Y CULTIVO EMBRIONARIO

La técnica de fecundación *in vitro* por ICSI fue realizada a x400 aumentos usando un microscopio invertido Nikon Diaphot-200 con contraste de fases. Un espermatozoide fue seleccionado e inyectado en el interior del ooplasma del ovocito con la ayuda de la pipeta de microinyección y la pipeta holding, ambas controladas por micromanipuladores acoplados al microscopio.

Inmediatamente después de la ICSI, los ovocitos fueron puestos en incubadores convencionales Labotec c-200 con el sistema time-lapse (TLS) *Primo Vision*. Estos incubadores embrionarios mantienen las condiciones de cultivo a 37°C en una atmósfera al 6% de CO₂. Cada embrión fue cultivado hasta su transferencia en placas de cultivo time-lapse (Vitrolife), compuestas por 9 o 16 pocillos cilíndricos que contienen en total 80 - 150 µl de medio G-TL o medio secuencial G1-Plus.

TRANSFERENCIA DE EMBRIONES

En los ciclos de reproducción asistida fueron transferidos uno o dos de los embriones de mejor calidad de acuerdo con la evaluación ASEBIR (**Anexo 1**), con el objetivo de aumentar la probabilidad de embarazo. La transferencia se realizó siguiendo el calendario establecido de acuerdo al periodo de ovulación de la mujer. El momento de transferencia fue indicado cuando los niveles séricos de progesterona fueron adecuados y las ecografías confirmaron que el grosor del endometrio era idóneo para la implantación.

Los embriones fueron transferidos después de 3 o 4 días de cultivo, o en estadio de blastocisto (D+5).

6.3 EVALUACIÓN EMBRIONARIA MEDIANTE TIME-LAPSE

El cultivo de los embriones fue monitorizado de forma continua en los incubadores convencionales Labotec c-200 con el sistema time-lapse acoplado. Las imágenes de cada embrión utilizadas en el análisis retrospectivo fueron adquiridas cada 5 minutos en once planos focales diferentes usando el sistema

Primo Vision (Vitrolife). Todos los eventos del desarrollo embrionario fueron anotados usando un software de análisis de imagen en el cual el tiempo en el que se producen estos eventos corresponde a horas después de la microinyección de ICSI. El tiempo preciso de inicio de microinyección (t_0) fue anotado empezando el proyecto de captura de imágenes time-lapse al inicio de la ICSI.

Todos los marcadores morfocinéticos fueron anotados posteriormente a la transferencia de los embriones para la realización de este estudio. Cada variable fue considerada siguiendo las pautas de nomenclatura y anotación establecidas en los artículos de referencia previamente nombrados (Meseguer *et al.*, 2011); (Ciray *et al.*, 2014) (**Anexo 2**).

6.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis de los datos morfocinéticos fue realizado utilizando el Software R *statistic* y *XLSTAT*. Los resultados fueron considerados estadísticamente significativos con una $P < .05$. Los grupos de análisis fueron divididos en dos variables categóricas en términos del sexo embrionario en XX (femenino) y XY (masculino). Se evaluaron los tiempos medios en que suceden los eventos celulares y la duración media en ambos sexos, para cada valor fue considerada su desviación estándar. Fue realizada la comparación entre los valores medios de las variables para establecer las diferencias significativas entre sexos. Los datos morfocinéticos con distribución normal fueron comparados entre sexos con el análisis estadístico t-Student con la fórmula del software R "*t.test*". Los datos morfocinéticos no paramétricos fueron comparados entre ambos sexos con el análisis estadístico de distribución de poblaciones Mann-Whitney U-test y la fórmula "*Wilcox.test*".

Se representó en *XLSTAT* la correlación de la distribución de cada sexo con la duración de cada fase celular (fase-S y fase-M) del segundo ciclo celular. Los resultados fueron expresados como gráfico de dispersión.

Después para cada variable morfocinética fueron definidos los cuartiles de tiempo en los que se distribuyen los embriones. El porcentaje de embriones de cada sexo por cuartil fue determinado para definir su rango óptimo de distribución. En estos rangos la proporción de embriones de género femenino (XX) y masculino (XY) es significativamente diferente. A partir de los rangos fue definida una variable binaria (0, 1) que determina el sexo embrionario. De esta forma si un valor se encuentra dentro de los rangos definidos se determina un sexo (0 = XY) y si el valor está fuera de esos rangos se determina el sexo opuesto (1= XX). Fue calculado el odds ratio para comprobar la influencia de las variables independientes sobre el sexo.

El análisis por regresión logística multivariable fue utilizado para calcular la probabilidad de acierto en la determinación del sexo. El modelo predictivo fue representado en forma de árbol de decisiones utilizando Software de análisis estadístico R (**Anexo 3**). Finalmente, para comprobar la eficacia predictiva del modelo a partir de las variables utilizadas fue representada la curva característica operativa de receptor (ROC) y fue calculada el área bajo la curva (AUC).

7 RESULTADOS

ANÁLISIS DE LAS VARIABLES MORFOCINÉTICAS

En la **tabla 1** se muestran los tiempos medios y las desviaciones estándar de las variables morfocinéticas de ambos sexos en horas después de la inyección intracitoplasmática del espermatozoide. Los parámetros tardíos del desarrollo preimplantacional (tSC, tMf/c, tSB, tB y tE) no fueron incluidos en el estudio, ya que los datos morfocinéticos de gran parte de los embriones eran incompletos en esos puntos debido a su transferencia en D+3. Se calcularon los tiempos medios de división celular y sus desviaciones estándar hasta la división del blastómero en ocho células. Fue incluido el análisis de la duración del segundo y tercer ciclo celular y las sincronías entre la primera y la última división de cada ciclo. En los resultados de la comparación entre sexos no se observaron diferencias significativas. Sin embargo, se observó una tendencia significativa en la duración del segundo ciclo celular mayor en embriones femeninos.

Tabla 1. Variables morfocinéticas definidas en horas dependiendo del género

Variable	XY (horas)	XX (horas)	
Morfocinética	Media ± SD	Media ± SD	<i>p-value</i>
t2	24,61 ± 2,93	24,88 ± 2,56	NS
t3	35,27 ± 3,61	36,09 ± 3,56	NS
Cc2	10,66 ± 1,07	11,21 ± 1,40	0,1
t4	35,98 ± 3,48	36,85 ± 4,02	NS
s2	0,71 ± 0,57	0,76 ± 1,07	NS
t5	48,73 ± 5,34	48,67 ± 4,96	NS
Cc3	13,45 ± 1,92	13,33 ± 3,82	NS
t6	50,12 ± 5,70	50,40 ± 5,45	NS
t7	53,02 ± 7,01	51,86 ± 5,40	NS
t8	55,60 ± 8,62	54,38 ± 7,17	NS
s3	7,11 ± 6,70	6,10 ± 4,43	NS
t8-t2	31,08 ± 7,21	30,22 ± 6,07	NS

Los valores han sido presentados como media ± SD.

NS, no se han encontrado diferencias significativas.

Valores con diferencias significativas * P<.05 (95% IC) / Tendencia significativa • P<0.1. (90% IC)

En el estudio también fueron incluidas las variables morfocinéticas de aparición y desaparición del núcleo interfásico y la duración de la fase-S y fase-M del segundo y tercer ciclo celular. Los valores medios de tiempo de ocurrencia de estas variables y sus desviaciones estándar se presentan en la **tabla 2**.

En la comparación entre sexos se observaron diferencias significativas ($P < .05$) en la duración de la fase-M del segundo ciclo celular. Ésta se relaciona con la tendencia significativa del segundo ciclo celular que se observa en la **tabla 1**. En los demás datos morfocinéticos comparados no se observaron diferencias significativas entre sexos.

Tabla 2. Variables morfocinéticas definidas en horas dependiendo del género

Variable	XY (horas)	XX (horas)	<i>p-value</i>
	Media \pm SD	Media \pm SD	
Morfocinética			
tPNa	7,67 \pm 1,94	7,17 \pm 2,13	NS
tPNf	21,53 \pm 2,92	21,95 \pm 2,47	NS
tNaCc2	26,49 \pm 3,13	26,46 \pm 2,99	NS
tNfCc2	33,46 \pm 3,65	34,09 \pm 3,47	NS
Fase-S (Cc2)	8,85 \pm 1,06	9,21 \pm 1,30	NS
Fase-M (Cc2) *	1,81 \pm 0,27	2,01 \pm 0,32	0,030 *
tNaCc3	37,15 \pm 3,79	37,71 \pm 3,98	NS
tNfCc3	47,13 \pm 5,22	47,32 \pm 4,71	NS
Fase-S (Cc3)	11,86 \pm 1,8	12,26 \pm 2,60	NS
Fase-M (Cc3)	1,60 \pm 0,31	1,66 \pm 0,39	NS

Los valores son presentados como media \pm SD.

NS, sin diferencias significativas. Valores con diferencias significativas * $P < .05$ (95% IC).

Fase-S Cc2: intervalo t2-tNfCc2 del segundo ciclo celular; Fase-M Cc2: Intervalo tNfCc2 - t3 del segundo ciclo celular; Fase-S Cc3: intervalo t3-tNfCc3 del segundo ciclo celular; Fase-M Cc3: Intervalo tNfCc3 - t5 del segundo ciclo celular

ANÁLISIS ESPECÍFICO DE LAS FASES DEL SEGUNDO CICLO CELULAR

Fue analizada la tendencia significativa del segundo ciclo celular. En la **figura 2** se representa en un gráfico de barras la comparación entre sexos de la duración de ambas fases del segundo ciclo y su desviación estándar. Se observa que la fase de división mitótica del segundo ciclo celular es significativamente más larga en embriones de género femenino (XX) frente a embriones de sexo masculino (XY). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre sexos en la duración de la fase-S.

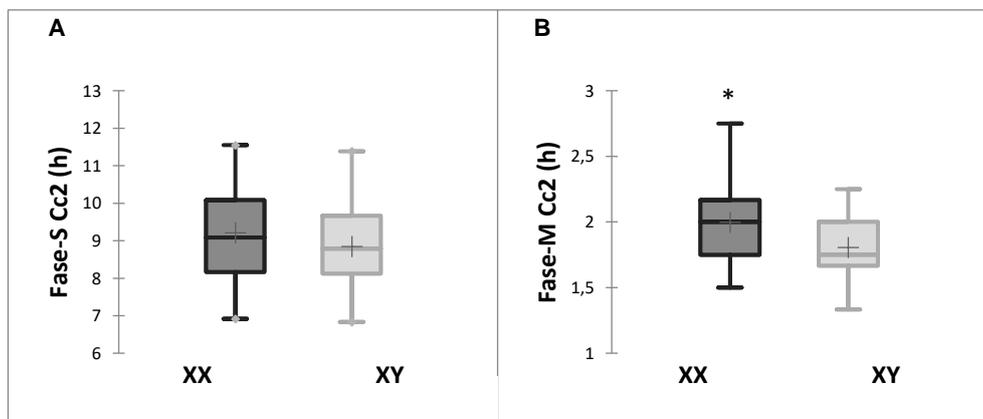


Figura 2. Diagrama de cajas. La imagen muestra la media, la desviación estándar y el rango de duración del segundo ciclo celular en embriones de sexo XX y XY. A) Fase-S del segundo ciclo celular. B) Fase- M del segundo ciclo celular. Diferencias significativas * P<.05.

La correlación de distribución de embriones XX y XY según la duración de la fase-S y la fase-M del segundo ciclo celular fue representada en la **figura 3**.

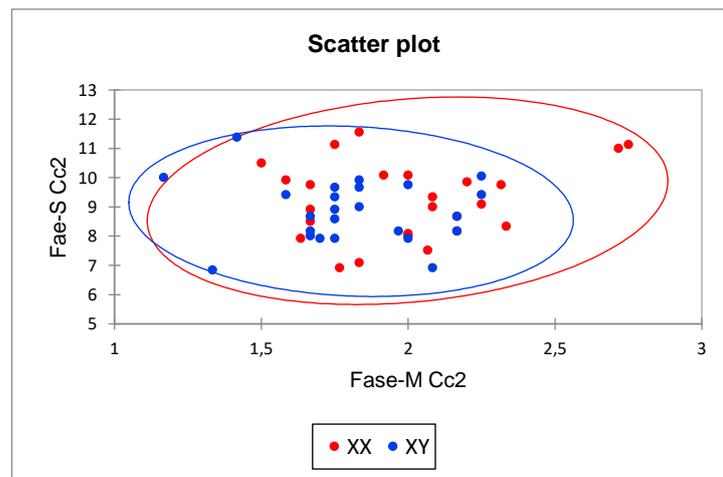


Figura 3. Diagrama de dispersión. Correlación de distribución de los embriones de sexo XX y XY respecto a la duración de las fase-S y fase-M del segundo ciclo celular. Los datos han sido expresados en horas después de la fecundación por ICSI.

Se puede observar que la distribución de los embriones de sexo femenino está ligeramente desplazada hacia la derecha del eje x (**fig. 3**), debido a la duración significativamente mayor de la fase-M del ciclo en los embriones de género femenino (XX).

DEFINICIÓN DEL MODELO PREDICTIVO

Para la creación del modelo predictivo el estudio se centró en las fases del segundo ciclo celular, con tendencia significativa. En primer lugar, fueron analizados los cuartiles de distribución de los embriones según la duración de las fases de este ciclo celular. Para cada fase fueron definidos los cuartiles óptimos de distribución por sexo, a partir de estos se establecieron rangos con proporciones significativamente diferentes de ambos sexos (**figura 4**).

RANGOS FASE-S Y FASE-M CC2	
Root 49	→ 25 XX y 24 XY
Fase-S	$tNfCc2_t2 \geq 10.06667$ 8/49 16% → (1 XY, 7 XX) *
	$tNfCc2_t2 < 10.06667$ 41/49 84%
Fase-M	$t3_tNfCc2 \geq 1.983333$ 18/41 37% → (11 XX, 7 XY) *
	$t3_tNfCc2 < 1.983333$ 23/41 47% → (16 XX, 7 XY) *

Figura 4. Definición de los rangos de duración la fase-S y fase-M del segundo ciclo celular con proporción significativamente diferente de ambos sexos (*).

Los rangos óptimos de distribución fueron más tarde utilizados para definir la variable binaria usada en el modelo predictivo (XX, XY).

El modelo de regresión logística sirvió para establecer la importancia de cada fase del segundo ciclo celular en la determinación del sexo evaluando las variables dentro y fuera de los rangos definidos. Fue calculada la probabilidad de acierto del modelo predictivo usando la fase-M y la fase-S del segundo ciclo celular por separado y de forma conjunta. Los mejores resultados fueron obtenidos usando

ambas fases para el modelo de regresión logística binaria. El porcentaje total de acierto con las dos fases fue de 67,3% (95% CI 58,6% - 76,1%).

La **tabla 3** describe con más detalle cuales fueron los resultados obtenidos al usar las dos fases del segundo ciclo celular en el modelo logístico binario. Se obtuvo un porcentaje de acierto del 68% en la determinación del sexo femenino (XX) con 17 embriones bien clasificados y 8 falsos positivos. Mientras que el porcentaje de embriones masculinos (XY) bien clasificados fue menor de 66,67%, con 16 embriones correctos y 8 falsos positivos.

Tabla 3. Tabla de clasificación para la muestra de aprendizaje respecto al sexo

Sexo	XX	XY	Total	% correcto
XX	17	8	25	68,00%
XY	8	16	24	66,67%
Total	25	24	49	67,35%

Porcentajes de acierto en la determinación del sexo, comparación de embriones bien clasificado frente a falsos positivos para ese sexo.

Fue determinado el Odds ratio del modelo de regresión logística binaria con tal de evaluar la interacción de ambas variables sobre el sexo, su significatividad fue calculada con el test ANOVA.

Los resultados mostraron que la fase-M es el parámetro más correlacionado OR 0,103 (95% CI 0,011-0,957) con una significancia de 0.046 $P < .05$ (**tabla 4**). Aunque la interacción de la fase-S con el sexo es baja OR 0,779 (95% CI 0,461 - 1,316) la intercepción de ambas fases sí fue correlacionada significativamente (0.052, **tabla 4**), por lo que la hipótesis no fue considerada nula.

Tabla 4. Análisis de los parámetros del modelo de determinación de sexo:

Parámetros	Pr > Chi ²	Odds ratio	Odds ratio límites (95% CI)
Intercepción	0,052*		
Fase-S Cc2	0,350	0,779	0,461 – 1,316
Fase-M Cc2	0,046*	0,103	0,011 - 0,957

El grupo de referencia fue el femenino (XX). * $P < .05$

Los resultados de la regresión logística indicaron que los mejores resultados se obtienen usando ambas fases del ciclo en el modelo 67,3% (95% CI 58,6% - 76,1%). De esta manera el árbol de decisiones fue definido con los rangos óptimos de distribución por sexo usando la fase-S y fase-M del segundo ciclo celular.

El modelo predictivo fue representado en la **figura 5** utilizando el software R como algoritmo de determinación del sexo. Cuando el valor de la fase-S (Cc2) cae dentro del rango (≥ 10 h) los embriones son categorizados como XX (7/ 8), de lo contrario si el valor de la fase-S (Cc2) está fuera de (≥ 10 h) el embrión se analiza en un nuevo rango. En el siguiente análisis si la duración de la fase-M del embrión está dentro del rango (≥ 2 h) éste es categorizado como XX (11/18), pero si cae fuera como XY (16/23).

De esta forma los embriones con valores fuera de ambos rangos se consideran de género masculino, y si los valores del embrión están entre ambos rangos de sexo femenino.

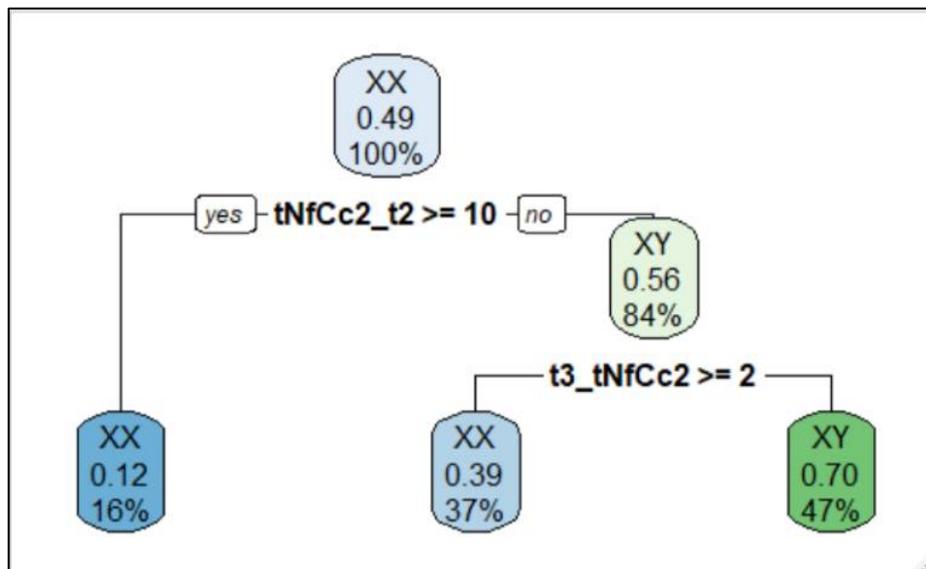


Figura 5. Árbol de decisiones para la determinación del sexo embrionario en base a los rangos de duración de la fase-S y la fase-M del segundo ciclo celular.

La curva ROC representa la sensibilidad del sistema de clasificación binaria frente a uno menos su especificidad. El análisis con la curva característica operativa del

receptor (ROC) fue representado en la **figura 6** para comprobar el valor predictivo para el sexo a partir de su intersección con las variables de nuestro modelo (fase-S y fase-M del segundo ciclo celular).

El valor del área bajo la curva (AUC) calculado fue de 0,668.

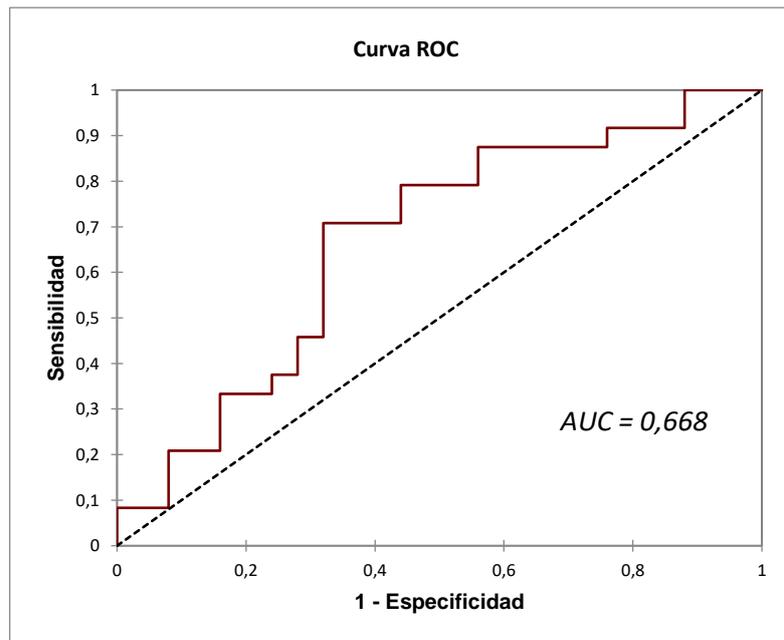


Figura 6. Análisis de la curva ROC para determinar las propiedades predictivas de los resultados con la regresión logística binaria de las fase-S y fase-M Cc2

8 DISCUSIÓN

El propósito del presente estudio ha sido determinar si el género del embrión podría influir en alguna de las variables morfocinéticas del desarrollo embrionario, ya que se ha planteado que los cromosomas sexuales podrían tener efectos intrínsecos en su etapa temprana preimplantacional. Los resultados obtenidos confirmaron esta hipótesis inicial, ya que se observaron diferencias significativas entre ambos sexos en la duración de la fase-M limitada por la desaparición del núcleo interfásico del segundo ciclo celular y la siguiente división celular (**fig. 2, B**).

El género embrionario está determinado por el patrón de cromosomas sexuales de la célula (XX o XY) que en etapas más avanzadas del desarrollo es responsable del dimorfismo sexual femenino o masculino. La suposición dominante hasta el momento era que todas las diferencias de sexo derivan de la especificación gonadal (gonadogénesis) y la acción posterior de las hormonas (Engel, 2018). Sin embargo, los resultados obtenidos han demostrado que la genética sexual además de influir en las etapas más tardías de la embriogénesis también afecta a sus primeras etapas preimplantacionales.

Algunas investigaciones similares basadas en la tecnología time-lapse han concluido que la velocidad del desarrollo en embriones de género masculino es mayor que en embriones de género femenino. En nuestro estudio no fueron incluidas las etapas de mórula a blastocisto previas a la implantación, donde varios estudios habían encontrado las diferencias (Bronet *et al.*, 2015). De esta manera, no pudo ser referenciada la velocidad de desarrollo durante esas etapas en ambos sexos. El estudio se centró en el análisis de las primeras divisiones celulares (**tabla 1**) y la duración de sus ciclos, pero en estas no se observaron diferencias significativas. Pese a esto, al considerar las variables morfocinéticas de desaparición nuclear interfásica se observó una duración significativamente mayor de la fase-M del segundo ciclo celular en embriones de género femenino ($p < 0.030$; **tabla 2**). Estos resultados concuerdan con otros estudios que han concluido que los embriones de sexo masculino completan la tercera división más

rápido, por lo que en éstos el segundo ciclo celular debe ser más corto (Huang *et al.*, 2019).

El motivo del leve retraso en el desarrollo femenino respecto al masculino no se conoce con exactitud, estudios sobre el sexo embrionario postulan que este retraso podría deberse a factores transcripcionales y epigenéticos codificados en los cromosomas sexuales durante la embriogénesis (Engel, 2018).

Se sabe que durante el desarrollo embrionario el patrón de expresión génica cambia sustancialmente debido a la reprogramación epigenética, por lo que ésta podría influir en los tiempos de duración de sus ciclos celulares. Tras la fecundación las células germinales se convierten en un cigoto que se va desarrollando como células totipotentes indiferenciadas y finalmente estas células comienzan a diferenciarse en las etapas previas a la implantación. La cromatina durante este proceso es una estructura dinámica y variable compuesta por DNA asociado a histonas (H2A, H2B, H3 y H4). La metilación del DNA y la modificación de estas histonas son las dos alteraciones epigenéticas principales. (Turinetto and Giachino, 2015)

Los resultados obtenidos en nuestro estudio evidencian que las diferencias entre géneros se encuentran en el transcurso de la fase-M del segundo ciclo celular (**fig. 2, B**). Diferencias que podrían estar relacionadas con modificaciones epigenéticas que ocurren durante la etapa preimplantacional únicamente en embriones femeninos. Esta conjetura nos ha llevado a vincular nuestra hipótesis inicial con la inactivación del cromosoma X, un fenómeno epigenético masivo estrechamente ligado al desarrollo embrionario, que involucra el silenciamiento transcripcional de uno de los cromosomas (X_i) en las células de las hembras en mamíferos. La inactivación funciona como un sistema de compensación que iguala la expresión de los genes del cromosoma X en embriones masculinos (XY) y femeninos (X_aX_i) (Acosta *et al.*, 2013). Fenómenos que comienza en las etapas tempranas por lo que podría afectar al ciclo celular.

En las últimas décadas la inactivación del cromosoma X ha sido extensamente estudiada. El proceso se inicia en las primeras etapas del desarrollo embrionario con la sobreexpresión de transcritos de *Xist*. El RNA *Xist* recubre el futuro cromosoma X inactivo induciendo una cascada de eventos como la modificación de histonas que silencian el cromosoma de manera permanente (Marcela *et al.*, 2015). Diversos estudios se han centrado en las histonas modificadas que participan en la inactivación epigenética en mamíferos. En varios modelos animales se ha identificado entre otras una variante de histona H2A fosforilada que también interfiere en la segregación de los cromosomas durante la mitosis. El análisis de sus niveles durante el ciclo celular embrionario ha mostrado que su señal es más intensa durante la mitosis en el periodo de dos a cuatro células (Cc2). Se ha visto que su unión a la cromatina podría generar interferencias en la formación del cinetocoro de los cromosomas provocando retrasos en la metafase (Turinetto and Giachino, 2015). Pese a que este proceso ha sido muy estudiado en otros modelos animales en humanos sigue teniendo muchas incógnitas.

Nuestro estudio propone que la modificación de alguna variante de histona tras la sobreexpresión temprana de RNA *Xist* podría provocar interferencias en la mitosis de forma similar a como lo hace la fosforilación de la variante H2AX. Esto se traduciría en una mayor duración de la fase-M en los embriones de género femenino (XX). Hasta el momento desconocemos si estos son los motivos del retraso en la mitosis en los embriones femeninos por lo que debemos destacar que se trata de una hipótesis vinculada a los resultados obtenidos en este estudio.

Finalmente, los resultados han mostrado que solamente la fase-M del segundo ciclo tiene una influencia significativa sobre el sexo. Sin embargo, su evaluación conjunta con la fase-S del mismo ciclo podría ser útil para la determinación del género embrionario (**tabla 4**). Nuestro sistema de categorización presentado como árbol de decisiones (**figura 5**) es un primer modelo para el estudio del sexo en aquellos embriones en los que se ha descrito por time-lapse la información morfocinética de su desarrollo.

Además, el modelo presentado supone ciertas ventajas respecto a algunos desarrollados previamente en otros estudios (Bronet *et al.*, 2015), se centra en las primeras etapas del desarrollo embrionario, de forma que para aplicar el algoritmo no es necesario el cultivo prolongado del embrión hasta el estadio de blastocisto. Sin embargo, debemos recalcar que con el modelo presentado no se puede predecir el sexo con exactitud, como describe la AUC obtenida (0,668, **fig. 6**), pero utilizando el algoritmo generado se podrían aumentar las posibilidades de determinarlo de forma correcta.

9 CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio han demostrado que la genética sexual además de influir en las etapas más tardías de la embriogénesis tras el desarrollo gonadal afecta también a las primeras etapas de desarrollo. De acuerdo con otros estudios del sexo embrionario los resultados han sugerido una tendencia a la duración mayor del segundo ciclo celular en embriones de género femenino.

El análisis específico de los datos morfocinéticos del segundo ciclo celular ha arrojado claridad sobre esta diferencia entre sexos, indicando que la alteración ocurre durante la fase-M de éste. Hasta el momento los motivos del aumento en la duración de esta fase se desconocen, podría deberse a factores transcripcionales y epigenéticos relacionados con la inactivación del cromosoma X, como la fosforilación de histonas que a su vez interfieran en la segregación de cromosomas. Sin embargo, se trata solamente de una hipótesis ya que la falta de herramientas técnicas nos impide contrastarla.

Este estudio sugiere que los rangos de duración de ambas fases del segundo ciclo celular podrían ser de utilidad para generar un modelo predictivo del género embrionario que podría ser usado en un futuro por embriólogos. El modelo generado se centra en las primeras etapas por lo que resultaría favorable, ya que no es necesario el cultivo prolongado del embrión. Sin embargo, hasta el momento no está permitida la elección del género antes de la transferencia de embriones, por lo que el desarrollo del modelo predictivo serviría únicamente para otorgar información a los progenitores durante el embarazo. No obstante, en un futuro podría ser un método no invasivo alternativo al PGS para seleccionar embriones cuando existe riesgo de heredar enfermedades ligadas al sexo.

Finalmente, se debe mencionar que las limitaciones del estudio han estado relacionadas con la baja cantidad de embriones monitorizados por time-lapse en la clínica. Esto se debe a que el estudio se ha realizado únicamente con los datos de embriones nacidos de ciclos de FIV realizados en Institut Conceptum tras la implantación del sistema de análisis time-lapse en 2014. Por lo tanto, se necesitan

estudios prospectivos que puedan validar los resultados obtenidos en éste y decidir si los criterios establecidos para el modelo predictivo son aplicables universalmente.

10 AUTOEVALUACIÓN

El tema de este trabajo de fin de carrera fue planteado durante mi periodo de prácticas curriculares en la empresa Institut Conceptum. El estudio del sexo embrionario me atrajo desde el primer momento, creando un interés especial en la realización de este trabajo. Durante el primer periodo llevé a cabo la recopilación de datos morfocinéticos y, posteriormente, tras las prácticas, realicé su interpretación bajo la guía y supervisión de mi tutor de la empresa. Mis expectativas sobre los resultados del trabajo en un principio fueron demasiado esperanzadoras, pero al igual que en cualquier otra investigación científica es difícil obtener los resultados que al principio esperas.

Durante el tiempo que he trabajado en el TFG, he afrontado algunas limitaciones. La poca cantidad de embriones monitorizados durante el tiempo de cultivo ha sido la principal para el estudio, pese a esto hemos intentado desarrollarlo lo mejor posible, para que en un futuro cuando los datos se amplíen pueda aplicarse la misma metodología para su análisis.

Otra de las limitaciones a las que me he enfrentado y que supuso para mí un mayor esfuerzo fue la inexperiencia. Hasta el momento no había trabajado con el software R de programación estadística, por lo que el inicio en la programación fue duro. Pero finalmente puedo decir que ha sido de gran ayuda y que posiblemente en un futuro sea una herramienta de utilidad a la que saque gran provecho.

A través de este trabajo he podido llevar a cabo mi propia investigación científica. Con ello he ampliado mis conocimientos sobre el desarrollo de un estudio empezando por formular la hipótesis y objetivos del trabajo. Además, me ha servido para asentar los conocimientos adquiridos en la carrera sobre estadística y análisis de datos con XLSTAT.

En resumen, realizar el TFG me ha ayudado a ganar experiencia en el campo de la investigación científica esencial para mi formación como biotecnóloga.

11 BIBLIOGRAFÍA

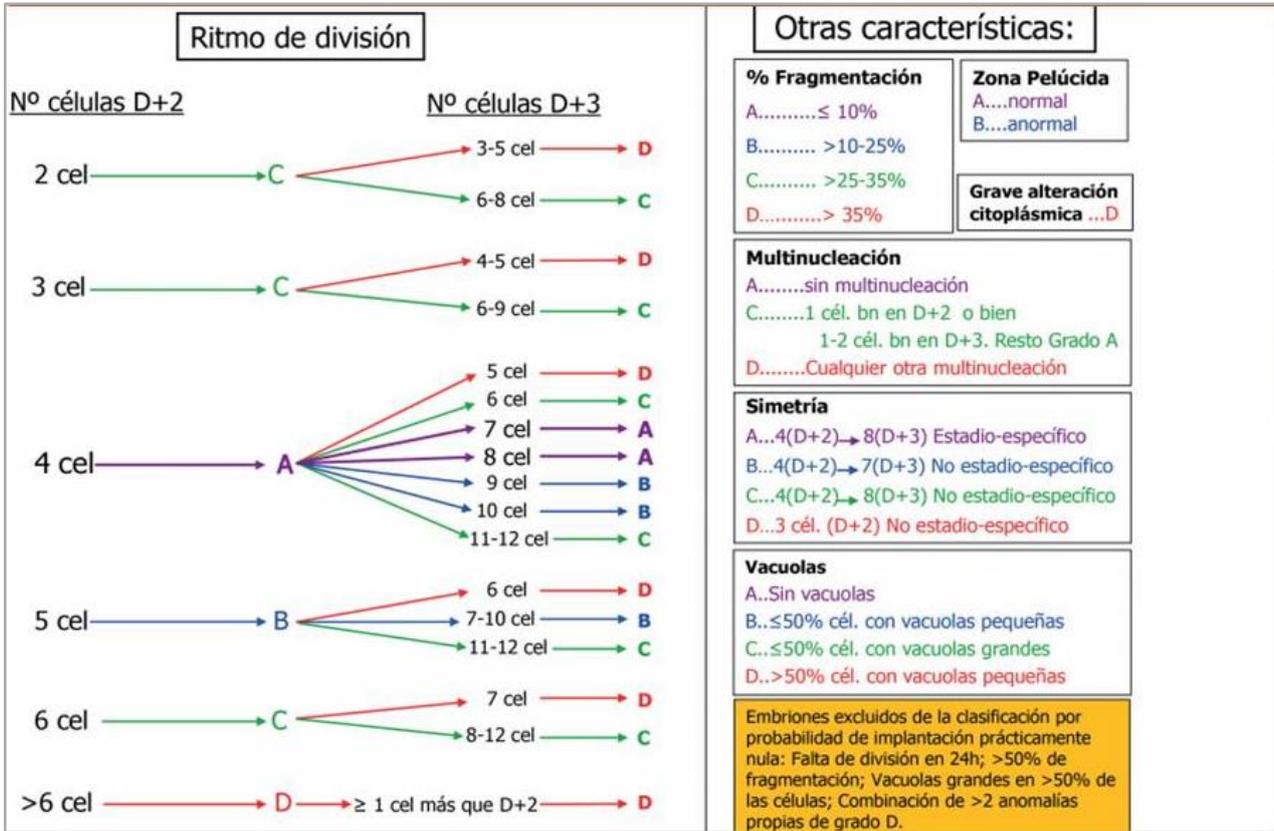
- Acosta, M. *et al.* (2013) 'X chromosome inactivation in mammalian embryonic development*', *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 8(2), pp. 1900–9607. Available at: <http://www.scielo.org.co/pdf/cmvez/v8n2/v8n2a11.pdf>.
- Alegre, L. *et al.* (2019) 'Novel noninvasive embryo selection algorithm combining time-lapse morphokinetics and oxidative status of the spent embryo culture medium', *Fertility and Sterility*.
- Balaban, B. *et al.* (2011) 'Istanbul consensus workshop on embryo assessment: Proceedings of an expert meeting', *Reproductive BioMedicine Online*, 22(6), pp. 632–646.
- Bodri, D. *et al.* (2016) 'Time-lapse variables and embryo gender: a retrospective analysis of 81 live births obtained following minimal stimulation and single embryo transfer', *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 33(5), pp. 589–596.
- Bronet, F. *et al.* (2015) 'Is there a relationship between time-lapse parameters and embryo sex?', *Fertility and Sterility*. Elsevier Inc., 103(2), pp. 396-401.e2.
- Ciray, H. N. *et al.* (2014) 'Proposed guidelines on the nomenclature and annotation of dynamic human embryo monitoring by a time-lapse user group', *Human Reproduction*, 29(12), pp. 2650–2660.
- Engel, N. (2018) 'Sex Differences in Early Embryogenesis: Inter-Chromosomal Regulation Sets the Stage for Sex-Biased Gene Networks: The dialogue between the sex chromosomes and autosomes imposes sexual identity soon after fertilization', *BioEssays*, 40(9), pp. 1–9.
- Huang, B. *et al.* (2019) 'Is differences in embryo morphokinetic development significantly associated with human embryo sex?+', *Biology of reproduction*, 100(3), pp. 618–623.

- Hurtado de Mendoza, M. V. and Ten, J. (2015) *Criterios ASEBIR de Valoración Morfológica de Oocitos, Embriones Tempranos y Blastocistos Humanos | Asebir, ASEBIR*. Available at: <https://asebir.com/cuadernos-asebir/criterios-asebir-de-valoracion-morfologica-de-oocitos-embriones-tempranos-y-blastocistos-humanos>.
- Marcela, L. *et al.* (2015) 'Mantenimiento De La Inactivación Del Cromosoma X : Exploración Con Rna-Interferente Contra El Gen De Susceptibilidad a Cáncer De Mama (Brca1) X Chromosome Inactivation Maintenance : Exploration With in- Terfering Rna Against the Breast Cancer Susceptibi', (March), pp. 12-23.
- Meseguer, M. *et al.* (2011) 'The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation', *Human Reproduction*, 26(10), pp. 2658-2671.
- Motato, Y. *et al.* (2016) 'Morphokinetic analysis and embryonic prediction for blastocyst formation through an integrated time-lapse system', *Fertility and Sterility*, 105(2), pp. 376-384.e9.
- Oliveira, C. S. *et al.* (2016) 'Cell death is involved in sexual dimorphism during preimplantation development', *Mechanisms of Development*. Elsevier Ireland Ltd, 139, pp. 42-50.
- Raquel, A. *et al.* (2019) 'Time-Lapse Imaging : The State of the Art .'
- Rosenwaks, Z. and Pereira, N. (2017) 'The pioneering of intracytoplasmic sperm injection: historical perspectives', *Society for Reproduction and Fertility*.
- Serdarogullari, M. *et al.* (2014) 'Comparison of gender-specific human embryo development characteristics by time-lapse technology', *Reproductive BioMedicine Online*. Reproductive Healthcare Ltd., 29(2), pp. 193-199.
- Turinetto, V. and Giachino, C. (2015) 'Survey and summary multiple facets of histone variant H2AX: A DNA double-strand-break marker with several biological functions', *Nucleic Acids Research*, 43(5), pp. 2489-2498.

Zaninovic, N. *et al.* (2017) 'Assessment of embryo morphology and developmental dynamics by time-lapse microscopy: is there a relation to implantation and ploidy?', *Fertility and Sterility*. Elsevier Inc., 108(5), pp. 722–729.

12 ANEXOS

ANEXO 1. GUÍA ASEBIR DE CLASIFICACIÓN DEL EMBRIÓN SEGÚN SU MORFOLOGÍA



Grado	Día	Nº de células ("→" paso de D+2 a D+3)	% Fragmentos	Simetría celular	Multinucleación	Otros
A	D+2	4	≤10%	estadio-específico	NO	NORMAL
	D+3	7, 8				
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				
C	D+2	2, 3, 6	>25-35%	2, 4, 8 células NO estadio-específico	1 cél. bn D+2, o bien 1-2 cél. bn D+3 y el resto como Grado A ⁽¹⁾	≤50% células con vacuolas grandes
	D+3	6, 11, 12 2, 3 → 6-9 6 → 8-10				
D	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 pequeñas, o bien Grave alteración citoplasm. ⁽²⁾
	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 ⁽¹⁾
--

ANEXO 2. TABLA RESUMEN PARÁMETROS TIME-LAPSE

TIEMPO	DEFINICIONES DE LOS EVENTOS CELULARES
t0	Tiempo medio de micro/inyección (ICSI)
tPB2	Tiempo de separación completa del segundo corpúsculo polar del oolema
tPNa	Aparición de los pronúcleos
tPNf	Tiempo de desaparición de los pronúcleos
tZ	Primer fotograma tras la desaparición de los pronúcleos
t2	Tiempo de la primera división celular, o mitosis. Primera observación de dos células.
tNaCC2	Tiempo de aparición de los núcleos en el segundo ciclo celular.
tNfCc2	Tiempo de desaparición de los núcleos en el segundo ciclo celular
Cc2	Segundo ciclo celular. Intervalo de tiempo de t2 – t3
s2	Sincronía del segundo ciclo celular. Intervalo de tiempo de t3 – t4
Fase-S Cc2	Fase de replicación del DNA del segundo ciclo. Intervalo t2 – tNfCc2
Fase-M Cc2	Fase de división celular del segundo ciclo. Intervalo tNfCc2 – t3
t3	Tiempo de observación de tres células, equivale al segundo ciclo celular.
t4	Tiempo de observación de cuatro células, equivale al segundo ciclo celular.
tNaCC3	Tiempo de aparición de los núcleos en el tercer ciclo celular.
tNfCc3	Tiempo de desaparición de los núcleos en el tercer ciclo celular
Cc3	Tercer ciclo celular. Intervalo de tiempo de t3 – t5
Fase-S Cc2	Fase de replicación del DNA del tercer ciclo. Intervalo t3 – tNfCc3
Fase-M Cc2	Fase de división celular del tercer. Intervalo tNfCc3 – t5
s3	Sincronía del tercer ciclo celular. Intervalo de tiempo t5 – t8
t5	Tiempo de observación de cinco células, tercer ciclo celular.
t6 a t8	Tiempo de observación de seis, siete y ocho células
tSC	Tiempo de compactación celular
tMf/p	Tiempo de final de compactación. tMf si la compactación es completa. tMp si han quedado células fuera
tSB	Inicio de la blástula, momento en el que se comienza a observar la cavidad interna.
tB	Tiempo de observación del blastocisto completo
tE	Inicio de la expansión, la zona pelúcida comienza a ser fina.

ANEXO 3. RECURSOS R SOFTWARE: SCRIPT ÁRBOL DE DECISIONES

```
library(readxl)
ExcelResultados <- read_excel("C:/Users/estel/Desktop/ESTELA/ExcelResultados.xlsx")
View(ExcelResultados)

summary(ExcelResultados)
data[data$Sexo == 0,]$Sexe <- "XX"
data[data$Sexo == 1,]$Sexe <- "XY"

as.factor(ExcelResultados$Sexo)
datos.modelo <- subset(ExcelResultados, select = c(Sexo, tNfCc2_t2, t3_tNfCc2))

head(datos.modelo)

summary(datos.modelo$tNfCc2_t2)
summary(datos.modelo$t3_tNfCc2)

###Fórmula para crear el árbol de decisiones rpart(Sexo ~., data = ExcelResultados)
library(rpart)
library(rpart.plot)
rpart(Sexe ~., data = datos.modelo)
modelo.arbol<-rpart(Sexe ~., data = datos.modelo)

### Fórmula para ver el árbol
rpart.plot(modelo.arbol)
```