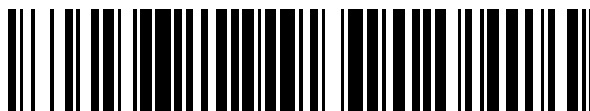


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 399 711**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

G06T 7/00 (2006.01)

G06T 7/20 (2006.01)

G06K 9/00 (2006.01)

C12N 5/073 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.08.2010 E 10748195 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.01.2013 EP 2430454**

54 Título: **Obtención de imágenes y evaluación de embriones, ovocitos y células madre**

30 Prioridad:

22.08.2009 US 236085 P

07.05.2010 US 332651 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

02.04.2013

73 Titular/es:

**THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY
OF THE LELAND STANFORD JUNIOR
UNIVERSITY (100.0%)
1705 El Camino Real
Palo Alto, CA 94306, US**

72 Inventor/es:

**WONG, CONNIE C.;
LOEWKE, KEVIN E.;
BAER, THOMAS M.;
REIJO-PERA, RENEE A. y
BEHR, BARRY**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 399 711 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Obtención de imágenes y evaluación de embriones, ovocitos y células madre

Referencia cruzada a las solicitudes relacionadas

- 5 Esta solicitud reivindica la prioridad de la Solicitud de Patente Provisional de EE.UU. No. 61/332,651, presentada el 7 de Mayo de 2010 y la Solicitud de Patente Provisional de EE.UU. No. 61/236,085, presentada el 22 de Agosto de 2009, las cuales están incorporadas por referencia en su totalidad a la presente solicitud.

Campo de la invención

Esta invención se refiere al campo de los ensayos biológicos y clínicos, y particularmente a las técnicas de imagen y la evaluación de cigotos/embriones, ovocitos y células madre tanto de humanos como de animales.

10 Antecedentes de la invención

- La infertilidad es un problema de salud común que afecta a un 10-15% de las parejas en edad reproductiva. En los Estados Unidos solamente en el año 2006, se llevaron a cabo aproximadamente 140.000 ciclos de fecundación in vitro (FIV) (cdc.gov/arte). Esto tuvo como resultado el cultivo de más de un millón de embriones anualmente con un potencial variable y, con frecuencia mal definido, para la implantación y desarrollo a término. La tasa de nacidos vivos por ciclo, después de la FIV fue sólo del 29%, mientras que un promedio del 30% de los nacidos vivos resultaron de gestaciones múltiples (cdc.gov/arte). Se han documentado bien las consecuencias adversas de las gestaciones múltiples tanto para la madre como para los fetos, tales como aborto involuntario, parto prematuro, y baja tasa de natalidad. Las posibles causas del fracaso de la FIV son diversas; sin embargo, desde la introducción de la FIV en 1978, uno de los retos más importantes ha sido la identificación de los embriones que son los más adecuados para la transferencia y los que sea más probable que den como resultado un embarazo a término.

- La comprensión en la técnica del desarrollo embrionario básico es limitada ya que los estudios sobre la biología del embrión humano continúan siendo un reto y, frecuentemente se excluyen de la financiación para investigación. En consecuencia, la mayor parte del conocimiento actual de desarrollo embrionario se deriva de los estudios de organismos modelo. Sin embargo, mientras que los embriones de diferentes especies pasan por etapas de desarrollo similares, el tiempo varía según la especie. Estas diferencias, y muchas otras, hacen inapropiado extrapolar directamente de una especie a otra (Taft, R.E. (2008) *Theriogenology* 69(1):10-16). Las vías generales de desarrollo humano, así como los determinantes moleculares fundamentales subyacentes, son únicos para el desarrollo embrionario humano. Por ejemplo, en los ratones, la transcripción embrionaria se activa aproximadamente 12 horas después de la fecundación, simultáneamente con la primera división de escisión, mientras que en los humanos la activación de genes embrionarios (EGA) se produce en el día 3, alrededor del estadio de 8 células (Bell, E. C., et al., (2008) *Mol. Hum. Reprod.* 14:691-701; Braude, P., et al., (1988) *Nature* 332:459-461; Hamatani, T. et al., (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101:10326-10331; Dobson, T. et al., (2004) *Human Molecular Genetics* 13(14):1461-1470). Además, los genes que se modulan en el desarrollo humano temprano son únicos (Dobson, T. et al., (2004) *Human Molecular Genetics* 13(14):1461-1470). Por otra parte, en otras especies como el ratón, más del 85% de los embriones cultivados in vitro alcanzan el estadio de blastocisto, uno de los primeros puntos de referencias importantes en el desarrollo de los mamíferos, mientras que los cultivos de embriones humanos tienen una tasa promedio de formación de blastocistos de aproximadamente 30-50%, con una alta incidencia de mosaicismos y fenotipos aberrantes, tales como la fragmentación y detención del desarrollo (Rienzi, L. et al., (2005) *Reprod. Biomed. Online* 10:669-681; Alikani, M., et al., (2005) *Mol. Hum. Reprod.* 11:335-344; Keltz, MD, et al., (2006) *Fertil. Steril.* 86:321-324; French, D. B., et al., (2009) *Fertil. Steril.*). A pesar de estas diferencias, la mayoría de los estudios de desarrollo embrionario preimplantacional se derivan de organismos modelo y son difíciles de relacionarse con el desarrollo de embriones humanos (Zernicka-Goetz, M. (2002) *Development* 129:815-829; Wang, Q., et al. (2004) *Dev Cell.* 6:133-144; Bell, C. E., et al. (2008) *Mol. Hum. Reprod.* 14:691-701; Zernicka-Goetz, M. (2006) *Curr. Opin. Genet. Dev.* 16:406-412; Mtango, N. R., et al. (2008) *Int. Rev. Cell. Mol. Biol.* 268:223-290).

- Tradicionalmente, en las clínicas de FIV, la viabilidad del embrión humano se ha evaluado mediante simples observaciones morfológicas, tales como la presencia de blastómeros mononucleados de tamaño uniforme, y el grado de fragmentación celular (Rijinders PM, Jansen CAM. (1998) *Hum Reprod* 13:2869-73.; Milki AA, et al., (2002) *Fertil Steril* 77:1191-5). Más recientemente, métodos adicionales tales como el cultivo extendido de embriones (hasta el estadio de blastocisto en el día 5) y el análisis del estado cromosómico mediante el diagnóstico genético preimplantacional (DGP) también se han usado para evaluar la calidad de los embriones (Milki A, et al. (2000) *Fertil Steril* 73:126-9; Fragouli E, (2009) *Fertil Steril* 21 de junio [PubE lista para impresión]. El-Toukhy T, et al., (2009) *Hum Reprod* 6:20; Vanneste E, et al., (2009) *Nat Med* 15:577-83). Sin embargo, también existen riesgos potenciales de estos métodos en el hecho de que prolongan el período de cultivo y alteran la integridad del embrión (Manipalviratn S, et al., (2009) *Fertil Steril* 91:305-15; Mastenbroek S, et al., (2007) *N Engl J. Med.* 357:9-17).

Recientemente se ha demostrado que las técnicas de imagen de lapso de tiempo pueden ser una herramienta útil para observar el desarrollo embrionario temprano. Algunos métodos han utilizado las técnicas de imagen de lapso de tiempo para monitorizar el desarrollo embrionario humano después de la inyección intracitoplasmática de

espermatozoides (ICSI) (Nagy et al., (1994) Human Reproduction. 9(9):1743-1748; Payne et al., (1997) Human Reproduction 12:532-541). Se analizó la extrusión del cuerpo polar y la formación pronuclear y se correlacionaron con buena morfología en el día 3. Sin embargo, ningún parámetro se correlacionó con la formación de blastocistos o con los resultados del embarazo. Otros métodos han observado la aparición de la primera escisión como un
5 indicador para predecir la viabilidad de los embriones humanos (Fenwick, et al., (2002) Human Reproduction, 17:407-412; Lundin, et al., (2001) Human Reproduction 16:2652-2657). Sin embargo, estos métodos no reconocen la importancia de la duración de la citocinesis o de los intervalos de tiempo entre las divisiones tempranas.

Otros métodos han utilizado las técnicas de imagen de lapso de tiempo para medir la cadencia y la extensión de las divisiones celulares durante el desarrollo embrionario temprano (WO/2007/144001). Sin embargo, estos
10 métodos solamente divulgan un método básico y general para la obtención de imágenes en lapso de tiempo de embriones de bovinos, que son sustancialmente diferentes de los embriones humanos en términos de potencial de desarrollo, comportamiento morfológico, programas moleculares y epigenéticos, y cadencia y correspondencia de los parámetros circundantes. Por ejemplo, los embriones de bovinos tardan mucho más tiempo en implantarse en comparación con los embriones humanos (30 días y 9 días, respectivamente). (Taft, (2008) Theriogenology 69
15 (1):10-16). Más aún, no se divulgan parámetros específicos de obtención de imágenes o de intervalos de tiempo que pudieran ser predictivos de la viabilidad del embrión humano.

Más recientemente, las técnicas de imagen de lapso de tiempo se han utilizado para observar el desarrollo embrionario humano durante las primeras 24 horas después de la fecundación (Lemmen et al., (2008) Reproductive BioMedicine Online 17(3):385-391). Se encontró que la sincronía de los núcleos después de la
20 primera división se correlacionaba con los resultados del embarazo. Sin embargo, este trabajo concluyó que la primera división temprana no era un parámetro predictivo importante, lo cual contradice estudios previos (Fenwick, et al. (2002) Human Reproduction 17:407-412; Lundin, et al. (2001) Human Reproduction 16:2652. -2657).

Finalmente, ningún estudio ha validado los parámetros de la obtención de imágenes a través de la correlación con los programas moleculares o la composición cromosómica de los embriones. De esta manera, los métodos de
25 evaluación de los embriones humanos están deficientes en varios aspectos y se pueden mejorar mediante los presentes métodos, los cuales implican nuevas aplicaciones de la microscopía de lapso de tiempo, análisis de imagen, y la correlación de los parámetros de obtención de imágenes con los perfiles moleculares y la composición cromosómica. La presente invención se dirige a estos aspectos.

Sumario de la invención

30 Se proporcionan métodos, composiciones y kits para determinar el potencial de desarrollo de uno o más embriones o células pluripotentes en uno o más embriones o células pluripotentes. Estos métodos, composiciones y kits encuentran uso en la identificación in vitro de los embriones y ovocitos que tienen un buen potencial de desarrollo, es decir, la habilidad o capacidad de desarrollarse dando lugar a un blastocisto, los cuales son por lo tanto útiles en los métodos de tratamiento de la infertilidad en los humanos, y similares.

35 En algunos aspectos de la invención, se proporcionan métodos para la determinación del potencial de desarrollo de un embrión o una célula pluripotente. En tales aspectos, se mide uno o más parámetros celulares de un embrión o célula pluripotente para llegar a la medida de un parámetro celular. El parámetro celular se emplea entonces para proporcionar una determinación del potencial de desarrollo del embrión o la célula pluripotente, determinación que se puede usar para guiar el curso de una acción clínica. En algunas realizaciones, el parámetro celular es un
40 evento morfológico que es medible por microscopía de lapso de tiempo. En algunas realizaciones, por ejemplo cuando se realizan ensayos con un embrión, el parámetro o los parámetros celulares son: la duración de un evento de citocinesis, por ejemplo la citocinesis 1; el intervalo de tiempo entre la citocinesis 1 y la citocinesis 2; y el intervalo de tiempo entre la citocinesis 2 y la citocinesis 3. En algunas realizaciones, la duración del ciclo celular 1 se utiliza también como un parámetro celular. En algunas realizaciones, la medida del parámetro celular se emplea
45 mediante la comparación de este con una medida de un parámetro celular comparable proveniente de un embrión de referencia, y se usa el resultado de esta comparación para proporcionar una determinación del potencial de desarrollo del embrión. En algunas realizaciones, el embrión es un embrión humano. En algunas realizaciones, el parámetro celular es el nivel de expresión de un gen que se mide para llegar a una medida de la expresión génica. En algunas realizaciones, la medida de la expresión génica se emplea mediante la comparación de ésta con la
50 medida de la expresión génica de una célula pluripotente o embrión de referencia o una o más células del mismo, donde el resultado de esta comparación se emplea para proporcionar una determinación del potencial de desarrollo de la célula pluripotente o del embrión. En algunas realizaciones, el embrión es un embrión humano.

En algunos aspectos de la invención, se proporcionan métodos para clasificar embriones o células pluripotentes de acuerdo con su potencial de desarrollo con respecto a los otros embriones o células pluripotentes del grupo. En
55 tales realizaciones, se mide uno o más parámetros celulares de los embriones o las células pluripotentes del grupo para llegar a una medida del parámetro celular para cada uno de los embriones o células pluripotentes. Las medidas de los parámetros celulares se emplean entonces para determinar el potencial de desarrollo de cada uno de los embriones o células pluripotentes del grupo con respecto a cada uno de los otros, determinación que se puede usar para guiar el curso de una acción clínica. En algunas realizaciones, el parámetro celular es un evento
60 morfológico que es medible por microscopía de lapso de tiempo. En algunas realizaciones, por ejemplo cuando se

clasifican embriones, el parámetros o parámetros celulares son la duración de un evento de citocinesis, por ejemplo la citocinesis 1; el intervalo de tiempo entre la citocinesis 1 y la citocinesis 2; y el intervalo de tiempo entre la citocinesis 2 y la citocinesis 3. En ciertas realizaciones, también se mide la duración del ciclo celular 1. En algunas realizaciones, el parámetro celular es el nivel de expresión de uno o más genes. En algunas realizaciones, la medida o medidas de parámetros celulares se emplean mediante la comparación de las medidas de los parámetros celulares de cada uno de los embriones o células pluripotentes del grupo entre sí para determinar el potencial de desarrollo de los embriones o células pluripotentes de unos con respecto a otros. En algunas realizaciones, la medida o medidas de parámetros celulares se emplean mediante la comparación de cada medida del parámetro celular con una medida del parámetro celular de un embrión o célula pluripotente de referencia para determinar el potencial de desarrollo de cada embrión o célula pluripotente, y comparando esos potenciales de desarrollo para determinar el potencial de desarrollo de los embriones o células pluripotentes de unos con respecto a otros.

En algunos aspectos de la invención, se proporcionan métodos para proveer embriones con buen potencial de desarrollo para su transferencia a una hembra para reproducción asistida (FIV). En tales aspectos, se cultiva uno o más embriones en condiciones suficientes para el desarrollo embrionario. Se mide entonces uno o más parámetros celulares en el embrión o en más de un embrión para llegar a una medida del parámetro celular. La medida del parámetro celular se emplea entonces para proporcionar una determinación del potencial de desarrollo de embrión o embriones. El embrión o embriones que demuestren buen potencial de desarrollo se transfieren entonces a una hembra.

Meng L et al, Fertility and Sterility, Vol 91, No 3, 1 marzo 2009, página S7, observan embriones utilizando cinemicrografía de lapso de tiempo.

Adachi et al, J Mamm Ova Research 22, 64 – 70 (2005) divulga el uso de cinematografía de lapso de tiempo para observar procesos fisiológicos en el estadio temprano de los embriones humanos.

Breve descripción de las figuras

La invención se entenderá mejor a partir de la siguiente descripción detallada cuando se lea conjuntamente con los dibujos acompañantes. Se destaca que, de acuerdo con la práctica común, los diversos rasgos de los dibujos no están a escala. Por el contrario, las dimensiones de los diversos rasgos se amplían o reducen arbitrariamente para mayor claridad. Incluidas en los dibujos están las siguientes figuras.

La **Figura 1** es un diagrama de flujo que muestra los procesos usados para evaluar embriones.

La **Figura 2** es una serie de fotografías que muestran la escisión y la división celular durante un período de 6 días. Las imágenes llevan las leyendas del día 1 hasta el día 6. La barra de la escala representa 50 μm .

La **Figura 3** es un gráfico de barras que muestra los porcentajes del desarrollo exitoso dando lugar a blastocistos partiendo de embriones de 1 célula (cigotos). En el transcurso de 4 experimentos independientes, se observó un total de 100 embriones hasta el día 5 a 6 mediante microscopía de lapso de tiempo. Se muestra el porcentaje de células que alcanza cada estadio indicado (blastocisto, 8 células, de 4 a 7 células, de 2 a 3 células y 1 célula).

La **Figura 4** es una serie de cuatro embriones diferentes que se siguieron durante los tiempos indicados.

La **Figura 5** es un diagrama que muestra los lapsos de tiempo entre estadios usados para las presentes evaluaciones, incluyendo la duración de la primera citocinesis, el tiempo entre la primera y la segunda división (medido como el intervalo de tiempo entre la resolución de la citocinesis 1 y el comienzo de la citocinesis 2), y el tiempo entre la 2ª y la 3ª mitosis (medido como el intervalo de tiempo entre la iniciación de la citocinesis 2 y la iniciación de la citocinesis 3).

La **Figura 6** es un gráfico de puntos en 3-D que muestra la medida de tres eventos, incluyendo la duración de la primera citocinesis, el intervalo de tiempo entre la primera y la segunda divisiones celulares (medido como el intervalo de tiempo entre la resolución de la citocinesis 1 y el comienzo de la citocinesis 2) y el intervalo de tiempo entre la segunda y la tercera divisiones celulares (medido como el intervalo de tiempo entre la resolución de la citocinesis 2 y el comienzo de la citocinesis 3), para un grupo grande de embriones. Se muestra que los embriones que alcanzan el estadio de blastocisto (marcados con círculos) aparecen agrupados juntos en el gráfico de 3-D, mientras que los embriones que se detienen (marcados con X) antes de alcanzar el estado de blastocisto están completamente dispersos.

La **Figura 7** es un gráfico que muestra una curva de característica operativa del receptor (ROC) para predecir la formación de blastocistos usando los 3 parámetros morfológicos dinámicos.

La **Figura 8** es un gráfico de radar que muestra los niveles de expresión génica de 52 genes a partir de 6 embriones detenidos de 1 a 2 células, y 5 embriones normales de 1 a 2 células. La diferencia en los niveles de expresión entre los embriones normales y anormales fue estadísticamente significativa para aquellos genes que se destacan en color amarillo y se marcaron con un asterisco, según se determinó mediante la prueba de Mann-

Whitney.

La **Figura 9** es un gráfico de barras que muestra los niveles de expresión de diferentes genes en un embrión detenido de 2 células y embriones normales de 2 células. En la parte superior se muestra un número selecto de imágenes de lapso de tiempo del embrión detenido de 2 células.

- 5 La **Figura 10** es un gráfico de barras que muestra una comparación de los mismos genes que se presentan en la Fig. 9, en un embrión detenido de 4 células y embriones normales de 4 células. En la parte superior se muestra un número selecto de imágenes de lapso de tiempo del embrión detenido de 4 células.

- 10 La **Figura 11** es una serie de gráficos de barras que muestran patrones de expresión génica (ESSP) que tiene 4 patrones distintos. Se indican los tiempos de transferencia temprana antes de la activación génica embrionaria (día 2) y la expresión típica en el día 3.

- 15 La **Figura 12** muestra la expresión génica de genes de blastómeros individuales en diferentes estadios. (A) Expresión génica de dos genes, CTNNB1 y CDX2 provenientes de blastómeros individuales, trazados en diferentes estadios celulares, y que muestra los cambios en estos niveles de expresión génica en diferentes estadios, por ejemplo, de 2 células, de 3 células, mórula y blastocisto. (B) Huellas dactilares de la expresión génica en barras que representan los genes expresados en el programa materno en comparación con los genes expresados en el programa cigótico.

La **Figura 13** es un dibujo de un modelo para el uso del análisis de imágenes de lapso de tiempo y el análisis molecular correlacionado para evaluar la viabilidad del embrión.

- 20 La **Figura 14** es una serie de fotografías que muestran tres estadios de desarrollo durante la maduración de ovocitos in vitro.

La **Figura 15** es una serie de fotografías que muestran el proceso de desarrollo embrionario después de la maduración de ovocitos in vitro.

La **Figura 16** es un diagrama de flujo que muestra los procesos usados para evaluar ovocitos.

- 25 La **Figura 17** es un diagrama de flujo que muestra los procesos usados para evaluar células madre y células madre pluripotentes.

La **Figura 18** es una serie de fotografías que muestran el proceso de células madre pluripotentes inducidas diferenciándose en rosetas de neuronas.

La **Figura 19** es una tabla de las categorías en las cuales pueden clasificarse los genes en los que se ensayó su nivel de expresión, incluyendo el número de genes por categoría.

- 30 La **Figura 20** es una tabla de los Cuatro Patrones Específicos de Estadio Embrionario (ESSPs) que fueron identificados durante el análisis de la expresión génica de 141 embriones individuales con desarrollo normal y de blastómeros individuales, y la clasificación de los genes en cada una de estas categorías.

- 35 La **Figura 21** muestra el análisis de imagen automatizado que demuestra la capacidad de los parámetros de imagen para predecir la formación del blastocisto. (A) Muestra los resultados del algoritmo de seguimiento de un solo embrión. (B) Muestra un conjunto de 14 embriones que se analizaron. (C) Muestra la comparación del análisis de imagen manual con respecto al análisis automatizado con respecto a la duración de la citocinesis. (D) Muestra la comparación del análisis de imagen manual respecto al tiempo entre la primera y la segunda mitosis. (E) Muestra la comparación de una buena morfología de blastocisto con una mala morfología de blastocisto.

- 40 La **Figura 22** es un dibujo esquemático de un microscopio de campo oscuro de acuerdo con la presente invención; la inserción de la izquierda muestra una configuración de parche de campo oscuro de láser mecanizado.

La **Figura 23** es una fotografía de una matriz de tres microscopios como se ilustra en la Figura 22, montados sobre un soporte para la instalación en una incubadora y para las conexiones con un ordenador. La Fig. 23A muestra los microscopios, y la Fig.23B muestra los microscopios dentro de una incubadora.

- 45 La **Figura 24** es una captura de pantalla del software de captura de imágenes usado en el presente trabajo, que muestra embriones a los que se les toman imágenes por 3 canales.

Las **Figuras 25 A a D** son una serie de cuatro fotografías que muestran imágenes seleccionadas de lapso de tiempo provenientes del experimento 2, estación 2. Las Figs. 25A y 25B son imágenes captadas antes del cambio de los medios, y las Figs. 25C y 25D son las imágenes captadas después del cambio de los medios.

- 50 Las **Figuras 26 A a D** son una serie de cuatro fotografías que muestran imágenes seleccionadas de lapso de tiempo provenientes del experimento 1, estación 2. Las Figs. 26A y 26B son imágenes captadas antes del cambio de los medios, y las Figs. 26C y 26D son imágenes captadas después del cambio de los medios.

Las **Figuras 27 A y B** son dibujos de una placa de Petri personalizada con micropocillos. La Fig. 27A muestra un dibujo de la placa con las dimensiones, y la Fig. 27B muestra una vista en 3D de los micropocillos.

Las **Figuras 28 A y B** son gráficos que muestran actividad celular con y sin el registro previo de la imagen. Las Figs. 28A y 28B en conjunto muestran que el registro limpia los resultados y elimina los picos debido al desplazamiento o rotación del embrión.

Las **Figuras 29 A y B** son gráficos (izquierda) y fotografías de células (derecha) que muestran la actividad celular de embriones normales y anormales. En conjunto, la Fig. 29A y la Fig. 29B muestran que, en el día 3, los embriones tienen una morfología similar, pero los trazados de su actividad celular son drásticamente diferentes y sólo uno de ellos se desarrolla dando lugar a un blastocisto.

La **Figura 30** es un gráfico que muestra la diferencia en las intensidades de píxeles entre pares sucesivos de imágenes durante el desarrollo embrionario. Esto puede utilizarse por sí solo para evaluar la viabilidad del embrión, o como una forma de mejorar otros algoritmos, tales como un filtro de partículas, mediante la determinación de la cantidad de partículas (modelos embrionarios predichos) que deberían usarse.

Las **Figuras 31 A-G** son una serie de siete fotografías que muestran los resultados del seguimiento en 2D en varios estadios celulares. Las células progresan tal como se indica con los números de marcos asociados con cada par de imágenes: Marco 15 (Fig. 31A), 45 (B), 48 (C), 189 (D), 190 (E), 196 (F) membranas, y las líneas blancas punteadas son membranas ocluidas. Los marcos de las imágenes se capturaron cada 5 minutos, y sólo se muestran unos pocos.

Las **Figuras 32 A y B** son una serie de fotografías y dibujos que muestran dos casos exitosos de seguimiento celular en 3D. Las ilustraciones bajo cada foto de un embrión muestran la vista de arriba a abajo del modelo en 3D, con excepción del marco 314 y el marco 228, los cuales muestran vistas laterales de los modelos en el marco 314 y el marco 228, respectivamente. Los marcos de las imágenes fueron capturados cada 5 minutos.

La **Figura 33** es una representación esquemática de los resultados del filtro de partículas de una división de 1 célula a 2 células. Los puntos de datos son la ubicación en 3D de los centros de las células. Se muestran los puntos para los modelos de 1 célula, los modelos de 2 células, los modelos de 3 células, y los modelos de 4 células. La fila superior muestra las partículas después de la predicción, y la fila inferior muestra las partículas después del remuestreo.

Descripción detallada de la invención

Antes de que se describan los presentes métodos y composiciones, se debe entender que esta invención no está limitada a un método o composición particular de los descritos, ya que, por supuesto, puede variar. También debe entenderse que la terminología usada en la presente memoria tiene el propósito de describir realizaciones particulares solamente, y no pretende ser limitante, puesto que el alcance de la presente invención será limitado solamente por las reivindicaciones adjuntas.

Donde se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor comprendido entre los límites superior e inferior de tal intervalo está también específicamente descrito, hasta la décima parte de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto claramente lo dicte de otro modo. Cada intervalo más pequeño entre cualquier valor declarado o valor comprendido en un intervalo declarado y cualquier otro valor declarado o comprendido en ese intervalo declarado está incluido dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden ser incluidos o excluidos independientemente del intervalo, y cada intervalo en el que uno cualquiera, ninguno o ambos límites están incluidos en los intervalos más pequeños también están incluidos dentro de la invención, sujeto a que cualquier límite esté específicamente excluido del intervalo declarado. En donde el intervalo declarado incluye uno o ambos límites, los intervalos que excluyen cualquiera o ambos de estos límites incluidos también están incluidos en la invención.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que entendería normalmente un experto común en la técnica a la cual pertenece esta invención. Aunque se pueden usar cualesquiera métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria para poner en práctica o realizar ensayos sobre la presente invención, algunos materiales y métodos potenciales preferidos se describen ahora. Todas las publicaciones mencionadas en la presente memoria están incorporadas en la presente memoria por referencia para describir y divulgar los métodos y/o materiales en conjunto con los cuales se citan las publicaciones. Se entiende que la presente divulgación tiene prevalencia sobre cualquier divulgación de una publicación incorporada en la medida en que exista una contradicción.

Se debe hacer notar que, tal como se usa en la presente memoria y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno" y "el" incluyen referentes plurales a menos que el contexto lo dicte claramente de otro modo. De este modo, por ejemplo, la referencia a "una célula" incluye una pluralidad de tales células y la referencia a "el péptido" incluye la referencia a uno o más péptidos y equivalentes de los mismos, por ejemplo, polipéptidos, conocidos por los expertos en la técnica, y así sucesivamente.

Las publicaciones discutidas en la presente memoria se proporcionan únicamente para su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada en la presente memoria debe interpretarse como una admisión de que la presente invención no tiene derecho a anteceder tal publicación en virtud de la invención previa. Además, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes de las fechas de publicación reales que puede ser necesario confirmar de forma independiente.

Definiciones

Se proporcionan métodos para determinar el potencial de desarrollo de uno o más embriones o células pluripotentes y/o la presencia de anomalías cromosómicas en uno o más embriones o células pluripotentes. Estos métodos encuentran uso en la identificación in vitro de los embriones y ovocitos que son más útiles en el tratamiento de la infertilidad en los humanos. Estos y otros objetos, ventajas y rasgos de la invención serán evidentes para aquellas personas expertas en la materia tras la lectura de los detalles de los métodos y composiciones que se describen más detalladamente a continuación.

Los términos “potencial de desarrollo” y “competencia para el desarrollo” se usan en la presente memoria para referirse a la habilidad o capacidad de un embrión o célula pluripotente sanos para crecer o desarrollarse.

El término “embrión” se usa en la presente memoria para referirse tanto al cigoto que se forma cuando dos células gaméticas haploides, por ejemplo, un ovocito secundario no fertilizado y un espermatozoide, se unen para formar una célula totipotente diploide, por ejemplo, un óvulo fertilizado, como para el embrión que resulta de las divisiones celulares inmediatamente posteriores, es decir la escisión embrionaria, a través de la mórula, es decir, el estadio de 16 células y el estadio de blastocisto (con trofoectodermo diferenciado y masa celular interna).

El término “célula pluripotente” se usa en la presente memoria para referirse a cualquier célula que tiene la capacidad de diferenciarse en múltiples tipos de células en un organismo. Los ejemplos de células pluripotentes incluyen células madre, los ovocitos, y los embriones de 1 célula (es decir, los cigotos).

El término “célula madre” se usa en la presente memoria para referirse a una célula o una población de células que: (a) tiene la capacidad de auto-renovación, y (b) tiene el potencial para dar lugar a diversos tipos de células diferenciadas. Frecuentemente, una célula madre tiene el potencial para dar lugar a múltiples linajes de células. Tal como se usa en la presente memoria, una célula madre puede ser una célula madre totipotente, por ejemplo un ovocito fecundado, el cual da lugar a todos los tejidos embrionarios y extraembrionarios de un organismo; una célula madre pluripotente, por ejemplo una célula madre embrionaria (ES), una célula madre germinal (EG), o una célula madre pluripotente inducida (iPS), las cuales dan lugar a todos los tejidos embrionarios de un organismo, es decir, a linajes del endodermo, mesodermo y ectodermo; una célula madre multipotente, por ejemplo una célula madre mesenquimal, que da lugar a al menos dos de los tejidos embrionarios de un organismo, es decir, al menos dos de los linajes del endodermo, mesodermo y ectodermo, o puede ser una célula madre específica de tejido, la cual da lugar a múltiples tipos de células diferenciadas de un tejido particular. Las células madre específicas de tejido incluyen células embrionarias específicas de tejido, las cuales dan lugar a las células de un tejido particular, y células madre somáticas, las cuales residen en los tejidos adultos y pueden dar lugar a las células de ese tejido, por ejemplo las células madre neuronales, que dan lugar a todas las células del sistema nervioso central, las células satélites, que dan lugar al músculo esquelético, y las células madre hematopoyéticas, que dan lugar a todas las células del sistema hematopoyético.

El término “ovocito” se usa en la presente memoria para referirse a una célula germinal femenina no fertilizada, o gameto. Los ovocitos de la presente solicitud pueden ser ovocitos primarios, en cuyo caso se posicionan para pasar por o están pasando por la meiosis I, u ovocitos secundarios, en cuyo caso se posicionan para pasar por o estar pasando por la meiosis II.

Por estadio de “vesícula germinal”, se entiende el estadio de maduración de un ovocito primario que se correlaciona con la profase I del ciclo celular de la meiosis I, es decir, antes de la primera división del material nuclear. A los ovocitos en este estadio también se les llama “ovocitos de vesícula germinal”, por el núcleo característicamente grande, llamado vesícula germinal. En un ovocito humano normal cultivado in vitro, la vesícula germinal se produce aproximadamente entre las 6-24 horas después del inicio de la maduración.

Por estadio de “metafase I” se entiende el estadio de maduración de un ovocito primario que se correlaciona con la metafase I del ciclo celular de la meiosis I. En comparación con los ovocitos de vesícula germinal, los ovocitos de la metafase I no tienen un núcleo grande, claramente definido. En un ovocito humano normal cultivado in vitro, la metafase I se produce aproximadamente entre las 12-36 horas después del inicio de la maduración.

Por estadio de “metafase II” se entiende la etapa de maduración de un ovocito secundario que se correlaciona con la metafase II del ciclo celular de la meiosis II. La metafase II se distingue por la extrusión del primer cuerpo polar. En un ovocito humano normal cultivado in vitro, la metafase II se produce aproximadamente entre las 24-48 horas después del inicio de la maduración.

Por “ciclo celular mitótico”, se entiende los eventos en una célula que dan lugar a la duplicación de los cromosomas de una célula y la división de esos cromosomas y la materia citoplasmática de una célula en dos células hijas. El

ciclo celular mitótico se divide en dos fases: interfase y mitosis. En la interfase, la célula crece y replica su ADN. En la mitosis, la célula inicia y completa la división celular, primero dividiendo su material nuclear, y luego dividiendo su material citoplasmático y su material nuclear dividido (citocinesis) entre dos células separadas.

5 Por un “primer ciclo celular mitótico” o “ciclo celular 1” se entiende el intervalo de tiempo desde la fecundación hasta la compleción del primer evento de citocinesis, es decir, la división del ovocito fecundado en dos células hijas. En los casos en que los ovocitos se fecundan in vitro, el intervalo de tiempo entre la inyección de la gonadotropina coriónica humana (HCG) (que se administra generalmente antes de la recuperación de los ovocitos) hasta la compleción del primer evento de citocinesis, se puede usar como intervalo de tiempo sustitutivo.

10 Por un “segundo ciclo celular mitótico” o “ciclo celular 2” se entiende el evento del segundo ciclo celular que se observa en un embrión, el intervalo de tiempo entre la producción por mitosis de células hijas a partir de un ovocito fecundado y la producción de un primer conjunto de células nietas a partir de una de esas células hijas (la “célula hija líder”, o célula hija A) por mitosis. Al finalizar el ciclo celular 2, el embrión consiste en 3 células. En otras palabras, el ciclo celular 2 puede identificarse visualmente como el tiempo entre el embrión que contiene 2 células y el embrión que contiene 3 células.

15 Por un “tercer ciclo celular mitótico” o “ciclo celular 3” se entiende el evento del tercer ciclo celular que se observa en un embrión, típicamente el intervalo de tiempo desde la producción por mitosis de células hijas de un ovocito fecundado y la producción de un segundo conjunto de células nietas a partir de la segunda célula hija (la “célula hija rezagada” o célula hija B) por mitosis. Al finalizar el ciclo celular 3, el embrión consiste en 4 células. En otras palabras, el ciclo celular 3 puede identificarse visualmente como el tiempo entre el embrión que contiene 3 células y el embrión que contiene 4 células.

20 Por “evento de primera escisión”, se entiende la primera división, es decir, la división del ovocito en dos células hijas, es decir, el ciclo celular 1. Al finalizar el primer evento de escisión, el embrión consiste en 2 células.

25 Por “evento de segunda escisión”, se entiende el segundo conjunto de divisiones, es decir, la división de la célula hija líder en dos células nietas y la división de la célula hija rezagada en dos células nietas. En otras palabras, el evento de segunda escisión consiste tanto en el ciclo celular 2 como en el ciclo celular 3. Una vez completada la segunda escisión, el embrión se compone de 4 células.

Por “evento de tercera escisión”, se entiende el tercer conjunto de divisiones, es decir, las divisiones de todas las células nietas. Al finalizar el evento de tercera escisión, el embrión consiste típicamente en 8 células.

30 Por “citocinesis” o “división celular” se entiende aquella fase de la mitosis en la que una célula experimenta una división celular. En otras palabras, es el estadio de la mitosis en la cual el material nuclear dividido de una célula y su material citoplasmático se dividen para producir dos células hijas. El período de la citocinesis se identifica como el período, o la ventana de tiempo entre el momento en que se observa por primera vez una constricción de la membrana celular (un “surco de escisión”) y la resolución de ese evento de constricción, es decir, la generación de dos células hijas. La iniciación del surco de escisión puede identificarse visualmente como el punto en el cual la curvatura de la membrana celular cambia de convexa (redondeada hacia afuera) a cóncava (curvada hacia adentro con una depresión o hendidura). Esto se ilustra en la Fig. 4 panel superior mediante flechas blancas que apuntan a los surcos de escisión 2. El inicio de la elongación celular también puede utilizarse para marcar el comienzo de la citocinesis, en cuyo caso se define el período la citocinesis como el período de tiempo entre el inicio de la elongación celular y la resolución de la división celular.

40 Por “primera citocinesis” o “citocinesis 1” se entiende el evento de la primera división celular después de la fecundación, es decir, la división de un ovocito fecundado para producir dos células hijas. La primera citocinesis normalmente ocurre aproximadamente un día después de la fecundación.

45 Por “segunda citocinesis” o “citocinesis 2”, se entiende el evento de la segunda división celular que se observa en un embrión, es decir, la división de una célula hija del ovocito fecundado (la “célula hija líder”, o hija A) en un primer conjunto de dos nietas.

Por “tercera citocinesis” o “citocinesis 3”, se entiende el evento de la tercera división celular que se observa en un embrión, es decir, la división de la otra hija del ovocito fecundado (“célula hija rezagada”, o hija B) en un segundo conjunto de dos nietas.

50 El término “marcador fiduciario” o “marcador fiducial”, es un objeto que se utiliza en el campo de la visión de un sistema de imágenes el cual aparece en la imagen producida, para su uso como un punto de referencia o una medida. Puede ser algo colocado en o sobre el objeto al que se le toma la imagen, o una marca o un conjunto de marcas en la retícula de un instrumento óptico.

El término “micropocillo” se refiere a un recipiente que tiene un tamaño de la escala celular, preferiblemente para poder alojar una sola célula eucariota.

55 Células pluripotentes y embriones de interés

En los métodos de la invención, se evalúa el potencial de desarrollo de uno o más embriones midiendo uno o más parámetros celulares del(de los) embrión(es) y empleando estas mediciones para determinar el potencial de desarrollo del(de los) embrión(es). La información así derivada se puede usar para guiar las decisiones clínicas, por ejemplo si se transfiere o no un embrión fecundado in vitro, si se transplanta o no una célula o células cultivadas.

Los ejemplos de embriones que pueden evaluarse por los métodos de la invención incluyen embriones de 1 célula (a los que también se hace referencia como cigotos), embriones de 2 células, embriones de 3 células, embriones de 4 células, embriones de 5 células, embriones de 6 células, embriones de 8 células, etc., típicamente hasta e incluyendo embriones de 16 células, cualquiera de los cuales se puede haber obtenido de cualquier manera conveniente, por ejemplo a partir de un ovocito que ha madurado in vivo o a partir de un ovocito que ha madurado in vitro.

Los embriones y células pluripotentes se pueden obtener a partir de cualquier organismo, por ejemplo cualquier especie de mamíferos, por ejemplo, humanos, primates, equinos, bovinos, porcinos, caninos, felinos, etc. Preferiblemente se derivan de un ser humano. Pueden congelarse previamente, por ejemplo embriones crioconservados en el estadio de una célula y luego descongelados, u ovocitos y células madre congelados y descongelados. Alternativamente, pueden estar recién preparados, por ejemplo, los embriones que se preparan en el momento a partir de ovocitos por técnicas de fecundación in vitro; ovocitos recién recogidos y/o recién madurados por medio de técnicas de maduración in vitro o que se obtienen a partir de células madre pluripotentes diferenciadas in vitro dando células germinales y maduras para dar ovocitos; células madre recién preparadas a partir de la disociación y el cultivo de tejidos por métodos conocidos en la técnica; y similares. Pueden cultivarse en cualesquiera condiciones convenientes conocidas en la técnica para promover la supervivencia, el crecimiento, y/o el desarrollo de la muestra a evaluar, por ejemplo para los embriones, en condiciones tales como las usadas en la técnica de fecundación in vitro; véase, por ejemplo, la patente Estadounidense No. 6,610,543, la patente Estadounidense No. 6,130,086, la patente Estadounidense No. 5,837,543, cuyas descripciones se incorporan en la presente memoria mediante referencia; para los ovocitos, en condiciones tales como las usadas en la técnica para promover la maduración de ovocitos; véase, por ejemplo, la patente Estadounidense No. 5,882,928 y la patente Estadounidense No. 6,281,013, cuyas descripciones se incorporan en la presente memoria mediante referencia; para las células madre en condiciones tales como las usadas en la técnica para promover la proliferación, véase, por ejemplo la patente Estadounidense No. 6,777,233, la patente Estadounidense No. 7,037,892, la patente Estadounidense No. 7,029,913, la patente Estadounidense No. 5,843,780, y la patente Estadounidense No. 6,200,806, la solicitud de patente Estadounidense No. 2009/0047263; la solicitud de patente Estadounidense No. 2009/0068742, cuyas descripciones se incorporan en la presente memoria mediante referencia. Frecuentemente, los embriones se cultivan en un medio disponible comercialmente tal como KnockOut DMEM, DMEM-F12 o el Medio de Dulbecco Modificado por Iscove que se ha complementado con suero o un sustituto de suero, aminoácidos, y factores de crecimiento adaptados a las necesidades particulares del embrión que se está evaluando.

Análisis de las imágenes de lapso de tiempo

En algunas realizaciones, los embriones se evalúan midiendo parámetros celulares mediante técnicas de imagen de lapso de tiempo. Los embriones pueden cultivarse en placas de cultivo estándares. Alternativamente, los embriones pueden cultivarse en placas de cultivo personalizadas, por ejemplo placas de cultivo personalizadas con micropocillos de calidad óptica como se describe en la presente memoria. En tales placas de cultivo personalizadas, cada micropocillo contiene un único embrión y la superficie inferior de cada micropocillo tiene un acabado de calidad óptica de tal manera que se pueden obtener imágenes de todo el grupo de embriones dentro de una sola placa simultáneamente, mediante un único microscopio en miniatura con la resolución suficiente para seguir los procesos de mitosis celular. Todo el grupo de micropocillos comparte la misma gota de medios en la placa de cultivo, y también pueden incluir una pared exterior colocada alrededor de los micropocillos para la estabilización de gota de medio, así como marcadores fiduciarios situados cerca de los micropocillos. La hidrofobicidad de la superficie se puede ajustar mediante ataque químico de la superficie con plasma u otro tratamiento para prevenir la formación de burbujas en los micropocillos cuando se llenan con medio. Independientemente de que se use una placa de cultivo estándar o una placa de cultivo personalizada, durante el cultivo, se puede cultivar en el mismo medio de cultivo uno o más embriones en desarrollo, por ejemplo pueden cultivarse por placa entre 1 y 30 embriones.

Se toman las imágenes a lo largo del tiempo, y luego se analizan para llegar a las mediciones de un parámetro o de más de un parámetro celular. Las imágenes de lapso de tiempo se pueden realizar con cualquier microscopio controlado por ordenador que esté equipado para el almacenamiento y análisis de imágenes digitales, por ejemplo, microscopios invertidos equipado con fases calentadas y cámaras de incubación, o matrices de microscopios en miniatura construidas de forma personalizada que caben dentro de una incubadora convencional. La matriz de microscopios en miniatura permite el cultivo concurrente de múltiples placas de muestras en la misma incubadora, y es escalable para adaptarse a múltiples canales sin limitaciones en cuanto al intervalo de tiempo mínimo entre la captura de imágenes sucesivas. Usando microscopios múltiples se elimina la necesidad de mover la muestra, lo que mejora la precisión y la fiabilidad del sistema en general. Los microscopios individuales en la incubadora pueden aislarse parcial o totalmente, proporcionando a cada placa de cultivo su propio ambiente controlado. Esto

permite que las placas se transfieran hacia y desde las estaciones de obtención de imágenes sin perturbar el ambiente de las otras muestras.

El sistema de obtención de imágenes para imágenes de lapso de tiempo puede emplear iluminación de campo claro, iluminación de campo oscuro, contraste de fases, contraste de modulación de Hoffman, contraste de interferencia diferencial, o fluorescencia. En algunas realizaciones, la iluminación de campo oscuro se puede usar para proporcionar un contraste de imagen incrementado para la extracción posterior de rasgos y el análisis de las imágenes. Además, se pueden usar fuentes de luz roja o cercana a la infrarroja para reducir la fototoxicidad y mejorar la relación de contraste entre las membranas celulares y la porción interior de las células.

Las imágenes que se adquieren se pueden almacenar ya sea sobre una base continua, como en video en vivo, o sobre una base intermitente, como en la fotografía de lapso de tiempo, donde a un sujeto se le toman imágenes en repetidas ocasiones en una foto fija. Preferiblemente, el intervalo de tiempo entre las imágenes debe ser de entre 1 a 30 minutos con el fin de capturar eventos morfológicos significativos según se describe a continuación. En una realización alternativa, el intervalo de tiempo entre imágenes podría variar dependiendo de la cantidad de actividad celular. Por ejemplo, durante los períodos activos las imágenes podrían tomarse con una frecuencia de cada pocos segundos o cada minuto, mientras que durante los períodos inactivos las imágenes podrían tomarse cada 10 o 15 minutos o más. Se podría utilizar el análisis de la imagen en tiempo real sobre las imágenes capturadas para detectar cuándo y cómo variar los intervalos de tiempo. En nuestros métodos, se estima que la cantidad total de luz que reciben las muestras es equivalente a aproximadamente 24 minutos de exposición continua a luz de bajo nivel durante 5 días de obtención de imágenes. La intensidad de la luz para un sistema de imágenes de lapso de tiempo es significativamente menor que la intensidad de la luz que se usa típicamente en un microscopio de reproducción asistida debido a la baja potencia de los LEDs (por ejemplo, usando un LED de 1W en comparación con una bombilla halógena típica de 100W) y la alta sensibilidad del sensor de la cámara. De esta manera, la cantidad total de energía luminosa que recibe un embrión usando el sistema de imágenes de lapso de tiempo es comparable o inferior a la cantidad de energía que recibe durante el manejo de rutina en una clínica de FIV. Además, el tiempo de exposición puede acortarse significativamente para reducir la cantidad total de exposición a la luz del embrión. En 2 días de obtención de imágenes, con imágenes capturadas cada 5 minutos a 0,5 segundos de exposición a la luz por imagen, la cantidad total de exposición a luz de bajo nivel es menor que 5 minutos.

Después de la toma de imágenes, las imágenes se extraen y se analizan en ellas diferentes parámetros celulares, por ejemplo, tamaño de la célula, espesor de la zona pelúcida, grado de fragmentación, simetría de las células hijas resultantes de una división celular, intervalos de tiempo entre las pocas primeras mitosis, y duración de la citocinesis.

Los parámetros celulares que se pueden medir por obtención de imágenes de lapso de tiempo son normalmente eventos morfológicos. Por ejemplo, en la evaluación de embriones, la obtención de imágenes de lapso de tiempo se puede usar para medir la duración de un evento de citocinesis, por ejemplo la citocinesis 1, citocinesis 2, citocinesis 3, o citocinesis 4, donde la duración de un evento de citocinesis se define como el intervalo de tiempo entre la primera observación de un surco de escisión (la iniciación de la citocinesis) y la resolución del surco de escisión en dos células hijas (es decir, la producción de dos células hijas). Otro parámetro de interés es la duración de un evento de ciclo celular, por ejemplo el ciclo celular 1, ciclo celular 2, ciclo celular 3, o ciclo celular 4, donde la duración de un evento de ciclo celular se define como el intervalo de tiempo entre la producción de una célula (para el ciclo celular 1, la fecundación de un óvulo; para posteriores ciclos celulares, en la resolución de la citocinesis) y la producción de dos células hijas a partir de esa célula. Otros parámetros celulares de interés que pueden ser medidos por obtención de imágenes de lapso de tiempo incluyen intervalos de tiempo que están definidos por estos eventos celulares, por ejemplo, (a) el intervalo de tiempo entre citocinesis 1 y citocinesis 2, que se puede definir como uno cualquiera de entre el intervalo entre el inicio de la citocinesis 1 y el inicio de la citocinesis 2, el intervalo entre la resolución de la citocinesis 1 y la resolución de la citocinesis 2, el intervalo entre el inicio de la citocinesis 1 y la resolución de la citocinesis 2; o el intervalo entre la resolución de la citocinesis 1 y el inicio de la citocinesis 2; o (b) el intervalo de tiempo entre la citocinesis 2 y la citocinesis 3, que se puede definir como uno cualquiera de entre el intervalo entre el inicio de la citocinesis 2 y el inicio de la citocinesis 3, o el intervalo entre la resolución de la citocinesis 2 y la resolución de la citocinesis 3, o el intervalo entre el inicio de la citocinesis 2 y la resolución de la citocinesis 3, o el intervalo entre la resolución de la citocinesis 2 y el inicio de la citocinesis 3.

A los efectos de la fecundación in vitro, se considera ventajoso que el embrión se transfiera al útero tempranamente en el desarrollo, por ejemplo hacia el día 2 o el día 3, es decir, hasta el estadio de 8 células, para reducir la pérdida de embriones debido a las desventajas de las condiciones de cultivo relacionadas con el ambiente in vitro, y para reducir los efectos adversos potenciales asociados con los errores epigenéticos que puedan ocurrir durante el cultivo (Katari et al., (2009) Hum Mol Genet. 18(20) :3769-78; Sepúlveda et al. (2009) Fertil Steril. 91(5) :1765-70). Por consiguiente, es preferible que la medida de los parámetros celulares tenga lugar dentro del período de 2 días desde la fecundación, aunque también están contemplados por los presentes métodos periodos más prolongados de análisis, por ejemplo aproximadamente 36 horas, aproximadamente 54 horas, aproximadamente 72 horas, aproximadamente 84 horas, aproximadamente 96 horas, o más.

Los ejemplos de los parámetros celulares que se pueden evaluar en un ovocito en maduración mediante obtención de imágenes de lapso de tiempo incluyen, sin limitación, cambios en la morfología de la membrana del ovocito, por

ejemplo, la velocidad y extensión de la separación desde la zona pelúcida, cambios en la morfología del núcleo del ovocito, por ejemplo el inicio, la compleción, y la velocidad de ruptura de la vesícula germinal (GVBD), la velocidad y la dirección del movimiento de los gránulos en el citoplasma y el núcleo, la citocinesis del ovocito y el primer cuerpo polar y el movimiento de y/o la duración de la extrusión del primer cuerpo polar. Otros parámetros incluyen la duración de la citocinesis del ovocito secundario maduro y el segundo cuerpo polar.

Los parámetros pueden medirse manualmente, o pueden medirse de forma automatizada, por ejemplo mediante un software de análisis de imágenes. Cuando se emplea el software de análisis de imágenes, se pueden usar algoritmos de análisis de imagen que emplean una técnica de estimación del modelo probabilístico basado en el método secuencial de Monte Carlo, por ejemplo, mediante la generación de distribuciones de los modelos hipotéticos de embriones/células pluripotentes, simulando imágenes basadas en un modelo de óptica simple, y comparando estas simulaciones con los datos de las imágenes observadas. Cuando se emplean tales estimaciones del modelo probabilístico, las células pueden modelarse como cualquier forma apropiada, por ejemplo como colecciones de elipses en el espacio de 2D, colecciones de elipsoides en el espacio de 3D, y similares. Para hacer frente a las oclusiones y las ambigüedades de profundidad, se pueden aplicar al método restricciones geométricas que se correspondan con el comportamiento físico esperado. Para mejorar la robustez, las imágenes se pueden capturar en uno o más planos focales.

Análisis de la expresión génica

Tal como se divulga en la presente memoria, se pueden evaluar embriones midiendo la expresión génica. En tales realizaciones, el parámetro celular es el nivel de expresión de un gen o un perfil de expresión génica. La determinación de la expresión de uno o más genes, es decir, la obtención de un perfil de expresión o la evaluación de la expresión, puede hacerse midiendo los transcritos de ácido nucleico, por ejemplo los ARNm, del gen o genes de interés, por ejemplo un perfil de expresión de ácido nucleico; o midiendo los niveles de uno o más proteínas/polipéptidos diferentes que son productos de la expresión de uno o más genes de interés, por ejemplo un perfil de expresión proteómico. En otras palabras, los términos “perfil de expresión” y “evaluación de la expresión” se utilizan ampliamente para incluir un perfil de expresión génica a nivel del ARN o a nivel de las proteínas.

En algunas realizaciones, la expresión génica puede evaluarse mediante la obtención de un perfil de expresión de ácidos nucleicos, donde se determina la cantidad o nivel de uno o más ácidos nucleicos en la muestra, por ejemplo, el ácido nucleico transcrito de uno o más genes de interés. En estas realizaciones, la muestra con la que se ensaya para generar el perfil de expresión es una muestra de ácido nucleico. La muestra de ácido nucleico comprende una pluralidad o población de ácidos nucleicos distintos que incluye la información de la expresión de los genes de interés del embrión o la célula que se está evaluando. El ácido nucleico puede incluir ácidos nucleicos de ARN o ADN, por ejemplo, ARNm, ARNc, ADNc, etc., siempre y cuando la muestra retenga la información de la expresión de la célula huésped o del tejido a partir del cual se obtiene. La muestra puede prepararse en un número de diferentes formas, como se conoce en la técnica, por ejemplo, mediante el aislamiento del ARNm de una célula, donde el ARNm aislado se utiliza como tal, se amplifica, se emplea para preparar ADNc, ARNc, etc., como es conocido en la técnica de la expresión diferencial. La muestra pueden prepararse a partir de una sola célula, por ejemplo una célula pluripotente de un cultivo de células pluripotentes de interés, o de una sola célula (blastómero) de un embrión de interés, o de varias células, por ejemplo, una fracción de un cultivo de células pluripotentes, o 2, 3, ó 4, o más blastómeros de un embrión de interés, usando protocolos estándares.

El perfil de expresión puede generarse a partir de la muestra de ácido nucleico inicial usando cualquier protocolo conveniente. Si bien se conocen una variedad de maneras diferentes de generación de perfiles de expresión, tales como las empleadas en el campo del análisis diferencial de la expresión génica, un tipo representativo y conveniente de protocolo para la generación de perfiles de expresión son los protocolos de generación de perfiles de expresión génica basados en matrices. Tales aplicaciones son ensayos de hibridación en los cuales se emplea un ácido nucleico que despliega ácidos nucleicos “sonda” para cada uno de los genes que se ensayaron/perfilaron en el perfil a generar. En estos ensayos, se prepara en primer lugar una muestra de los ácidos nucleicos diana a partir de la muestra de ácido nucleico inicial que se está ensayando, donde la preparación puede incluir el marcaje de los ácidos nucleicos diana con un marcador, por ejemplo, un miembro del sistema productor de señales. Luego de la preparación de la muestra del ácido nucleico diana, la muestra se pone en contacto con la matriz en condiciones de hibridación, mediante lo cual se forman complejos entre los ácidos nucleicos diana que son complementarios a las secuencias de las sondas unidas a la superficie de la matriz. La presencia de complejos hibridados se detecta entonces, o cualitativamente o cuantitativamente.

La tecnología de hibridación específica que puede ser puesta en práctica para generar los perfiles de expresión empleados en los presentes métodos incluye la tecnología descrita en las Patentes Estadounidenses 5,143,854; 5,288,644; 5,324,633; 5,432,049; 5,470,710; 5,492,806; 5,503,980; 5,510,270; 5,525,464; 5,547,839; 5,580,732; 5,661,028; 5,800,992; las descripciones de las cuales se incorporan en la presente memoria por referencia; así como también los documentos WO 95/21265; WO 96/31622; WO 97/10365; WO 97/27317; EP 373 203; y EP 785 280. En estos métodos, una matriz de ácidos nucleicos “sonda” que incluye una sonda para cada uno de los genes determinativos del fenotipo cuya expresión se ensaya, se pone en contacto con los ácidos nucleicos diana según lo descrito anteriormente. El contacto se lleva a cabo en condiciones de hibridación, por ejemplo, condiciones de hibridación estrictas, y el ácido nucleico no unido se elimina posteriormente. El término “condiciones de ensayo

estrictas" tal como se usa en la presente memoria, se refiere a las condiciones que son compatibles con la producción de pares de unión de ácidos nucleicos, por ejemplo, los ácidos nucleicos que están unidos a una superficie y los que están en la fase de la solución, con la complementariedad suficiente para proporcionar el nivel deseado de especificidad en el ensayo, mientras que son menos compatibles con la formación de pares de unión entre los miembros de unión de complementariedad insuficiente para proporcionar la especificidad deseada. Las condiciones de ensayo estrictas son la suma o la combinación (totalidad) tanto de las condiciones de hibridación como de las condiciones de lavado.

El patrón resultante del ácido nucleico hibridado proporciona información referente a la expresión de cada uno de los genes que han sido estudiados, donde la información de expresión es en términos de si el gen se expresa o no y, típicamente, a qué nivel, donde los datos de la expresión, es decir, el perfil de expresión (por ejemplo, en la forma de un transcriptosoma), pueden ser tanto cualitativos como cuantitativos.

Alternativamente, se pueden emplear métodos no basados en matrices para cuantificar el nivel de uno o más ácidos nucleicos en una muestra, incluyendo aquellos que se basan en protocolos de amplificación, por ejemplo, los ensayos basados en la reacción en cadena de polimerasa (PCR), que incluyen PCR cuantitativa, PCR de transcripción inversa (RT-PCR), PCR en tiempo real, y similares.

En algunas realizaciones, la expresión de genes puede evaluarse mediante la obtención de un perfil de expresión proteómica, donde se determina la cantidad o nivel de una o más proteínas/polipéptidos en la muestra, por ejemplo, la proteína/polipéptido codificado por el gen de interés. En estas realizaciones, la muestra que se ensaya para generar el perfil de expresión empleado en los métodos es una muestra de proteica. Cuando el perfil de expresión es el perfil de expresión proteómica, es decir, un perfil de uno o más niveles de proteína en una muestra, se pueden emplear cualquier protocolo conveniente para evaluar los niveles de proteína en el cual se determina el nivel de una o más proteínas en la muestra ensayada.

Si bien se conocen la técnica una variedad de maneras diferentes de ensayos para los niveles de proteína, un tipo representativo y conveniente de protocolo para el ensayo de los niveles de proteína es el ELISA. En los ensayos de ELISA y basados en ELISA, uno o más anticuerpos específicos para las proteínas de interés se pueden inmovilizar sobre una superficie sólida seleccionada, preferiblemente una superficie que exhibe una afinidad por la proteína, tal como los pocillos de una placa de microtitulación de poliestireno. Después de lavar para eliminar el material adsorbido incompletamente, los pocillos de la placa del ensayo se recubren con una proteína "bloqueadora" no específica que se sabe que es antigénicamente neutra con respecto a la muestra del ensayo, tales como la albúmina de suero bovino (BSA), la caseína o las soluciones de leche en polvo. Esto permite el bloqueo de los sitios de adsorción no específica en la superficie inmovilizante, reduciendo así el fondo causada por la unión no específica del antígeno en la superficie. Después de lavar para eliminar la proteína bloqueadora no unida, la superficie inmovilizante se pone en contacto con la muestra a ensayar en condiciones que conduzcan a la formación de inmunocomplejos (antígeno/anticuerpo). Tales condiciones incluyen la dilución de la muestra con diluyentes tales como BSA o gamma globulina bovina (BGG) en solución salina tamponada de fosfato (PBS)/Tween o PBS/Triton X-100, los cuales también tienden a ayudar en la reducción del fondo no específico, y dejar la muestra incubando durante aproximadamente 2-4 horas a temperaturas en el orden de aproximadamente 25° -27°C (aunque se pueden usar otras temperaturas). Después de la incubación, la superficie en contacto con el antisuero se lava para eliminar el material que no haya formado el inmunocomplejo. Un procedimiento de lavado ejemplar incluye un lavado con una solución tal como PBS/Tween, PBS/Triton X-100, o tampón borato. La existencia y la cantidad de formación del inmunocomplejo pueden entonces determinarse sometiendo el inmunocomplejo unido a un segundo anticuerpo que tiene especificidad para la diana que difiere de la del primer anticuerpo y detectando la unión del segundo anticuerpo. En ciertas realizaciones, el segundo anticuerpo tendrá una enzima asociada, por ejemplo ureasa, peroxidasa o fosfatasa alcalina, la cual generará un precipitado de color luego de la incubación con un sustrato cromogénico apropiado. Por ejemplo, se pueden emplear una anti-IgG humana conjugada con ureasa o con peroxidasa, por un período de tiempo y bajo condiciones que favorezcan el desarrollo de la formación del inmunocomplejo (por ejemplo, la incubación durante 2 horas a temperatura ambiente en una solución que PBS tal como PBS/Tween). Después de la incubación con el segundo anticuerpo y el lavado para eliminar el material no unido, la cantidad del marcador se cuantifica, por ejemplo, mediante la incubación con un sustrato cromogénico tal como urea y púrpura de bromocresol en el caso de un marcador de ureasa o el ácido 2,2'-azino-di-(3-etil-benzotiazolina)-6-sulfónico (ABTS) y H₂O₂, en el caso de un marcador de peroxidasa. La cuantificación se logra entonces midiendo el grado de generación de color, por ejemplo, usando un espectrofotómetro de espectro visible.

El formato precedente puede alterarse uniendo primero la muestra a la placa de ensayo. Entonces, el anticuerpo primario se incuba con la placa de ensayo, seguido por la detección de anticuerpo primario unido usando un segundo anticuerpo marcado con especificidad para el anticuerpo primario.

El sustrato sólido sobre el cual se inmovilizan el anticuerpo o los anticuerpos puede ser de una amplia variedad de materiales y de una amplia variedad de formas, por ejemplo, placa de microtitulación, microesfera, varilla de nivel, partícula de resina, etc. El sustrato puede elegirse para maximizar las relaciones de la señal con respecto al ruido, para minimizar la unión de fondo, así como para facilitar la separación y el coste. Los lavados se puede efectuar en la manera más apropiada para el sustrato que se está usando, por ejemplo, mediante la retirada de una esfera o

varilla de nivel de un depósito, vaciando o diluyendo un depósito tal como un pocillo de placa de microtitulación, o lavando una esfera, partícula, columna cromatográfica o filtro con una solución de lavado o solvente.

Alternativamente, se pueden emplear métodos no basados en ELISA para medir los niveles de una o más proteínas en una muestra. Ejemplos representativos incluyen, pero no se limitan a espectrometría de masa, matrices proteómicas, tecnología de microesferas xMAPTM, citometría de flujo, transferencias tipo Western e inmunohistoquímica.

Los datos resultantes proporcionan información referente a la expresión de cada uno de los genes que han sido estudiados, donde la información de expresión es en términos de si el gen se expresa o no y, típicamente, a qué nivel, y donde los datos de la expresión pueden ser tanto cualitativos como cuantitativos.

- 10 En la generación del perfil de expresión, en algunas realizaciones una muestra se ensaya para generar un perfil de expresión que incluye los datos de expresión de al menos un gen/proteína, a veces una pluralidad de genes y proteínas, donde por pluralidad se entiende al menos dos genes/proteínas diferentes y, frecuentemente al menos aproximadamente 3, típicamente al menos aproximadamente 10 y más generalmente al menos aproximadamente 15 genes diferentes/proteínas o más, tales como 50 o más, o 100 o más, etc.
- 15 En el sentido más amplio, la evaluación de la expresión puede ser cualitativa o cuantitativa. Como tal, en el caso en que la detección es cualitativa, los métodos proporcionan una lectura o valoración, por ejemplo, la evaluación, de si el analito diana, por ejemplo, el ácido nucleico o producto de expresión, está presente o no en la muestra que está siendo ensayada. En aún otras realizaciones, los métodos proporcionan una detección cuantitativa de si el analito diana está presente en la muestra que se ensaya, es decir, una evaluación o valoración de la cantidad real o abundancia relativa del analito diana, por ejemplo, el ácido nucleico o la proteína en la muestra que se ensaya. En tales realizaciones, la detección cuantitativa puede ser absoluta o, si el método es un método de detección de dos o más analitos diferentes, por ejemplo, ácidos nucleicos o proteína dianas, en una muestra, relativa. Como tal, el término "cuantificar" cuando se utiliza en el contexto de cuantificar un analito diana, por ejemplo, ácido(s) nucleico(s) o proteína(s), en una muestra se puede referir a la cuantificación absoluta o relativa. La cuantificación absoluta puede lograrse mediante la inclusión de concentraciones conocidas de uno o más analitos de control y referenciando, es decir, normalizando, el nivel detectado del analito diana con los analitos de control conocidos (por ejemplo, mediante la generación de una curva patrón). Alternativamente, la cuantificación relativa se puede lograr mediante la comparación de los niveles o cantidades detectados entre dos o más analitos diana diferentes para proporcionar una cuantificación relativa de cada uno de los dos o más analitos diferentes, por ejemplo, de uno con respecto al otro.
- 20
- 25
- 30

Los ejemplos de genes cuyos niveles de expresión son predictivos del potencial de desarrollo del cigoto incluyen Cofilin (NM_005507), DIAPH1 (NM_001079812, NM_005219), ECT2 (NM_018098), MYLC2/MYL5 (NM_002477), DGCR8 (NM_022720), Dicer/DICER1 (NM_030621, NM_177438), TARBP2 (NM_004178, NM_134323, NM_134324), CPEB1 (NM_001079533, NM_001079534, NM_001079535, NM_030594), Symplekin/SYMPK (NM_004819), YBX2 (NM_015982), ZAR1 (NM_175619), CTNNB1 (NM_001098209, NM_001098210, NM_001098210, NM_001904), DNMT3B (NM_006892, NM_175848, NM_175849, NM_175850), TERT (NM_198253, NM_198255), YY1 (NM_003403), IFGR2/IFNGR2 (NM_005534), BTF3 (NM_001037637, NM_001207), y NELF (NM_001130969, NM_001130970, NM_001130971, NM_015537). Otros genes cuyos niveles de expresión pueden servir como parámetros celulares predictivos del potencial de desarrollo del embrión se proporcionan en la Fig. 8. Para llegar a una medida del nivel de expresión génica, el nivel de expresión frecuentemente se evalúa y luego se normaliza con respecto a un control estándar, por ejemplo el nivel de expresión de un gen en la muestra que se conoce que es constante a través del desarrollo, por ejemplo GAPDH o RPLPO, o de un gen cuya expresión en ese punto de tiempo es conocida.

- 45 Los niveles de expresión génica se pueden determinar a partir de una sola célula, por ejemplo un blastómero proveniente de un embrión de interés, o un ovocito aislado, o una célula aislada de un cultivo de células madre, etc., o se pueden determinar a partir de un embrión, por ejemplo de 2, 3, ó 4, o más blastómeros de un embrión de interés, hasta e incluyendo todo el embrión de interés, o de múltiples células de un cultivo de células madre, hasta e incluyendo todo el cultivo de células madre, etc.

- 50 En otros aspectos, la presente invención comprende un protocolo para llevar a cabo el genotipado y el análisis de la expresión génica de forma concurrente en una sola célula. Para los embriones, esto se puede usar para mejorar el diagnóstico genético preimplantacional (DGP), un procedimiento donde se extrae una sola célula de un embrión y su ADN se ensaya para detectar los defectos cariotípicos o la presencia de genes de enfermedades específicas. Nuestro método permite el análisis concurrente de la expresión génica y de los genes. El método comprende los siguientes pasos: (1) recoger una única célula en un pequeño volumen de medio o tampón, (2) ejecutar un paso de transcripción inversa y amplificación mediante reacción en cadena de polimerasa (PCR) usando una mezcla de cebadores de genotipado y análisis de expresión génica, (3) recoger una alícuota del ADNc amplificado después de menos de 18 ciclos de PCR para preservar la linealidad de la amplificación, (4) usar la alícuota de ADNc para realizar el análisis de expresión génica con técnicas estándares tales como PCR cuantitativa en tiempo real, (5) usar la muestra restante para realizar una segunda ronda de PCR para amplificar aún más la información genética para los propósitos del genotipado, y (6) realizar el genotipado usando técnicas estándares tales como
- 60

electroforesis en gel.

Determinación del potencial de desarrollo a partir del análisis de la expresión génica y/o de imagen

Una vez que se han obtenido las medidas de los parámetros celulares, las medidas se emplean para determinar el potencial de desarrollo del embrión. Como se mencionó anteriormente, los términos “potencial de desarrollo” y “competencia para el desarrollo” se refieren a la habilidad o capacidad de una célula pluripotente o tejido para crecer o desarrollarse. Por ejemplo, en el caso de un ovocito o embrión, el potencial de desarrollo puede ser la habilidad o capacidad del ovocito o embrión para crecer o desarrollarse dando lugar a un blastocisto sano. Como otro ejemplo, en el caso de una célula madre, el potencial de desarrollo es la habilidad o capacidad para crecer o convertirse en una o más células de interés, por ejemplo en una neurona, un músculo, una célula B o T, y similares. En algunas realizaciones, el potencial de desarrollo de un ovocito o embrión es la habilidad o la capacidad de ese ovocito o embrión para desarrollarse dando lugar a un blastocisto saludable, para implantarse con éxito en un útero, para atravesar la gestación, y/o para nacer vivo.

Por “buen potencial de desarrollo” se entiende que el embrión es estadísticamente probable que se desarrolle como se desea, es decir, tiene un 55%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o más de probabilidad, de desarrollarse como se desea. En otras palabras, 55 de cada 100, 60 de cada 100, 70 de cada 100, 80 de cada 100, 90 de cada 100, 95 de cada 100, o 100 de cada 100 embriones o que demuestran medidas de parámetros celulares utilizados para llegar a la determinación del buen potencial de desarrollo, de hecho, continúan hasta desarrollarse como se desea. Contrariamente, por “potencial de desarrollo deficiente” se entiende que el embrión no es estadísticamente probable que se desarrolle como se desea, es decir, tiene un 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5% o menos probabilidad, por ejemplo, 0% de probabilidad, de desarrollarse como se desea. En otras palabras, solamente 50 de cada 100, 40 de cada 100, 30 de cada 100, 20 de cada 100, 10 de cada 100, ó 5 de cada 100 de los embriones o menos que demuestran medidas de parámetros celulares utilizados para llegar a la determinación del potencial de desarrollo deficiente, continúan de hecho hasta desarrollarse como se desea. Tal como se usa en la presente memoria, los embriones “normales” o “sanos demuestran buen potencial de desarrollo, mientras que los embriones “anormales” muestran un potencial de desarrollo deficiente.

En algunas realizaciones, la medida del parámetro celular se usa directamente para determinar el potencial de desarrollo del embrión. En otras palabras, el valor absoluto de la medida por sí mismo es suficiente para determinar el potencial de desarrollo. Ejemplos de esto en realizaciones que usan técnicas de imagen de lapso de tiempo para medir los parámetros celulares incluyen, sin limitación, los siguientes, cualquiera de los cuales solo o en combinación son indicativos de buen potencial de desarrollo en un embrión humano: (a) una citocinesis 1 que dura aproximadamente 0-30 minutos, por ejemplo, aproximadamente 6-20 minutos, en promedio aproximadamente 12-14 minutos; (b) un ciclo celular 1 que dura aproximadamente 20-27 horas, por ejemplo, aproximadamente 25-27 horas; (c) un intervalo de tiempo entre la resolución de la citocinesis 1 y el comienzo de la citocinesis 2 que es aproximadamente 8-15 horas, por ejemplo, aproximadamente 9-13 horas, con un valor promedio de aproximadamente 11 +/- 2,1 horas; (d) un intervalo de tiempo, es decir, sincronía, entre el inicio de la citocinesis 2 y el inicio de la citocinesis 3 que es aproximadamente 0-5 horas, por ejemplo aproximadamente 0-3 horas, con un tiempo promedio de aproximadamente 1 +/- 1,6 horas. Los ejemplos de medidas directas, cualquiera de las cuales, solas o en combinación, son indicativas de potencial de desarrollo deficiente en un embrión humano, incluyen sin limitación: (a) una citocinesis 1 que dura más de aproximadamente 30 minutos, por ejemplo, aproximadamente 32, 35, 40, 45, 50, 55, ó 60 minutos o más; (b) un ciclo celular 1 que dura más de aproximadamente 27 horas, por ejemplo 28, 29, o 30 o más horas; (c) un intervalo de tiempo entre la resolución de la citocinesis 1 y el comienzo de la citocinesis 2 que dura más de 15 horas, por ejemplo, aproximadamente 16, 17, 18, 19, ó 20 o más horas, o menos de 8 horas, por ejemplo aproximadamente 7, 5, 4, ó 3 o menos horas; (d) un intervalo de tiempo entre el inicio de la citocinesis 2 y el inicio de la citocinesis 3 que es 6, 7, 8, 9, ó 10 o más horas.

En algunas realizaciones, la medida del parámetro celular se emplea mediante su comparación con una medida del parámetro celular de un embrión/célula pluripotente de referencia o control, y usando el resultado de esta comparación para proporcionar una determinación del potencial de desarrollo del embrión. Los términos “referencia” y “control” tal como se usan en la presente memoria significan un embrión o célula estandarizada que se usa para interpretar las medidas de parámetros celulares de un embrión determinados, y asignarle una determinación del potencial de desarrollo. La referencia o control puede ser un embrión que se conoce que tiene un fenotipo deseado, por ejemplo, un buen potencial de desarrollo, y por lo tanto puede ser una referencia positiva o embrión control. Alternativamente, el embrión de referencia/control puede ser un embrión que se conoce que no tiene el fenotipo deseado, y por lo tanto ser un embrión de referencia/control negativo.

En ciertas realizaciones, la(s) medida(s) obtenidas de un parámetro celular se compara(n) con una(s) medida(s) de un parámetro celular comparable proveniente de un solo embrión de referencia/control para obtener información sobre el fenotipo del embrión que se está ensayando. En aún otras realizaciones, la(s) medida(s) obtenidas de un parámetro celular obtenido se compara(n) con la(s) medida(s) de un parámetro celular comparable a partir de dos o más embriones diferentes de referencia/control, para obtener más información en profundidad sobre el fenotipo del embrión que se ensaya. Por ejemplo, las medidas del parámetro celular obtenidas del(de los) embrión(es) que se están ensayando, se pueden comparar con un embrión tanto positivo como negativo para obtener información confirmada con respecto a si el embrión tiene el fenotipo de interés.

Como ejemplo, la citocinesis 1 en un embrión humano normal, es decir, con buen potencial de desarrollo, es aproximadamente de 0-30 minutos, más habitualmente de aproximadamente 6-20 minutos, en promedio de aproximadamente 12-14 minutos, es decir, aproximadamente 1, 2, 3, 4, ó 5 minutos, más habitualmente de aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, ó 20 minutos, en algunos casos 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o hasta de aproximadamente 30 minutos. Un periodo de tiempo más largo para completar la citocinesis 1 en el embrión que se está evaluando en comparación con el observado en un embrión normal de referencia es indicativo de potencial de desarrollo deficiente. Como un segundo ejemplo, el ciclo celular 1 en un embrión normal, es decir, desde el momento de la fecundación a la compleción de la citocinesis 1, es típicamente completado en aproximadamente 20-27 horas, más habitualmente en aproximadamente 25-27 horas, es decir, aproximadamente 15, 16, 17, 18, ó 19 horas, más habitualmente aproximadamente 20, 21, 22, 23, ó 24 horas, y más habitualmente aproximadamente 25, 26 ó 27 horas. Un ciclo celular 1 que es más largo en el embrión que se está evaluando en comparación con el observado en un embrión normal de referencia es indicativo de potencial de desarrollo deficiente. Como un tercer ejemplo, la resolución de la citocinesis 1 y el comienzo de la citocinesis 2 en embriones humanos normales es de aproximadamente 8-15 horas, más a menudo de aproximadamente 9-13 horas, con un valor promedio de aproximadamente 11 +/- 2,1 horas; es decir, 6, 7, u 8 horas, más habitualmente de aproximadamente 9, 10, 11, 12, 13, 14 o hasta aproximadamente 15 horas. Un ciclo celular 2 más largo o más corto en el embrión que se está evaluando en comparación con el observado en un embrión normal de referencia es indicativo de potencial de desarrollo deficiente. Como un cuarto ejemplo, el intervalo de tiempo entre el inicio de la citocinesis 2 y el inicio de citocinesis 3, es decir, la sincronía de la segunda y tercera mitosis, en embriones humanos normales es habitualmente de aproximadamente 0-5 horas, más habitualmente de aproximadamente 0, 1, 2 ó 3 horas, con un tiempo promedio de aproximadamente 1 +/- 1,6 horas; un intervalo más largo entre la compleción de la citocinesis 2 y la citocinesis 3 en el embrión que se está evaluando en comparación con el observado en un embrión normal de referencia es indicativo de potencial de desarrollo deficiente. Finalmente, como un ejemplo de cómo pueden aplicarse los niveles de expresión de genes como parámetros para evaluar el potencial de desarrollo, niveles de expresión inferiores de Cofilin, DIAPH1, ECT2, MYLC2, DGCR8, Dicer, TARBP2, CPEB1, Symplekin, YBX2, ZAR1, CTNNB1, DNMT3B, TERT, YY1, IFGR2, BTF3 y/o NELF, es decir, una expresión inferior en 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces, ó 100 veces, en embriones de 2 células que están siendo evaluados en comparación con la observada en un embrión normal de referencia de 2 células es indicativa de potencial de desarrollo deficiente, mientras que la expresión que es igual a o mayor que la observada en un embrión normal de referencia de 2 células es indicativa de buen potencial de desarrollo. Otros ejemplos se pueden derivar de datos empíricos, por ejemplo, observando uno o más embriones de referencia junto al embrión a evaluar. Puede emplearse cualquier embrión de referencia, por ejemplo, una muestra normal de referencia con buen potencial de desarrollo, o una muestra anormal de referencia con potencial de desarrollo deficiente. En algunos casos, se puede emplear más de una muestra de referencia, por ejemplo, se puede usar tanto una muestra normal de referencia como una muestra anormal de referencia.

En algunas realizaciones, puede ser deseable usar medidas de parámetros celulares que se obtienen mediante microscopía de lapso de tiempo, pero no mediante ambos microscopía de lapso de tiempo y perfiles de expresión. En otras realizaciones, puede ser deseable usar medidas de parámetros celulares que se obtienen mediante microscopía de lapso de tiempo, así como medidas de parámetros celulares obtenidas mediante los perfiles de expresión.

Como se discutió anteriormente, se pueden medir y emplear uno o más parámetros para determinar el potencial de desarrollo de un embrión. En algunas realizaciones, una medida de un solo parámetro puede ser suficiente para llegar a una determinación del potencial de desarrollo. En algunas realizaciones, puede ser deseable emplear medidas de más de un parámetro, por ejemplo, 2 parámetros celulares, 3 parámetros celulares, ó 4 o más parámetros celulares.

En ciertas realizaciones, el ensayo de múltiples parámetros puede ser deseable ya que el ensayo de múltiples parámetros puede proporcionar una mayor sensibilidad y especificidad. Por sensibilidad se entiende la proporción de positivos reales que se han identificado correctamente como tales. Esto puede ser representado matemáticamente como:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{(Número de positivos verdaderos)}}{\text{(Número de positivos verdaderos + Número de negativos falsos)}}$$

De este modo, en un método en el cual los "positivos" son los embriones que tienen buen potencial de desarrollo, es decir, que se desarrollarán dando lugar a blastocistos, y "negativos" son los embriones que tienen potencial de desarrollo deficiente, es decir, que no se desarrollarán dando lugar a blastocistos, una sensibilidad de 100% significa que la prueba reconoce como tales todos los embriones que se desarrollarán dando lugar a blastocistos. En algunas realizaciones, la sensibilidad del ensayo puede ser aproximadamente 70%, 80%, 90%, 95%, 98% o más, por ejemplo 100%. Por especificidad se entiende la proporción de negativos que son correctamente identificados como tales. Esto puede ser representado matemáticamente como

$$\text{Especificidad} = \frac{(\text{Número de positivos verdaderos})}{(\text{Número de negativos verdaderos} + \text{Número de positivos falsos})}$$

De este modo, en un método en el cual los positivos son los embriones que tienen buen potencial de desarrollo, es decir, que se desarrollarán dando lugar a blastocistos, y negativos son los embriones que tienen potencial de desarrollo deficiente, es decir, que no se desarrollarán dando lugar a blastocistos, una especificidad de 100% significa que la prueba reconoce como tales todos los embriones que no se desarrollarán dando lugar a blastocistos, es decir, se detendrán previamente al estadio de blastocisto. En algunas realizaciones, la especificidad del ensayo puede ser aproximadamente 70%, 80%, 90%, 95%, 98% o más, por ejemplo 100%.

Como se demuestra en los ejemplos de las secciones siguientes y en la figura 7, el uso de tres parámetros proporciona una sensibilidad del 94% y una especificidad del 93% con un punto de corte de 3 veces las desviaciones estándares de la distribución del blastocisto. En otras palabras, los métodos de la invención son capaces de identificar correctamente el número de embriones que se van a desarrollar en blastocistos el 94% de las veces (sensibilidad), y el número de embriones que se van a detener antes del estadio de blastocisto el 93% de las veces (especificidad). Además, los valores medios especificados y/o los puntos de corte se pueden modificar dependiendo del conjunto de datos usados para calcular estos valores así como las aplicaciones específicas.

En algunas realizaciones, la evaluación de un embrión incluye la generación de un informe escrito que incluye la evaluación del experto del embrión objeto, por ejemplo, una "evaluación del potencial de desarrollo", una "evaluación de anomalías cromosómicas", etc. Por lo tanto, un método en cuestión puede incluir además un paso de generación o salida de un informe que proporciona los resultados de tal evaluación, informe que puede proporcionarse en forma de un medio electrónico (por ejemplo, una visualización electrónica en un monitor de ordenador), o en forma de un medio tangible (por ejemplo, un informe impreso sobre papel u otro medio tangible).

Un "informe", tal como se describe en la presente memoria, es un documento electrónico o tangible que incluye elementos del informe que proporcionan información de interés relativa a una evaluación a la que se ha llegado mediante métodos de la invención. Un informe de un sujeto puede generarse total o parcialmente de forma electrónica. Un informe de un sujeto incluye al menos una evaluación del potencial de desarrollo del embrión en cuestión, una evaluación de la probabilidad de la existencia de anomalías cromosómicas, etc. Un informe de un sujeto puede incluir además una o más de entre: 1) información sobre la instalación de prueba, 2) información sobre el proveedor del servicio, 3) datos del objeto; 4) datos de la muestra, 5) una sección del informe con la evaluación detallada, proporcionando la información relativa a cómo se llegó a la evaluación, por ejemplo, a) las medidas de los parámetros celulares tomadas, b) los valores de referencia empleados, si los hubiere, y 6) otras características.

El informe puede incluir información sobre la instalación de prueba, información que es relevante para el hospital, clínica o laboratorio en el que se llevó a cabo la toma de la muestra y/o la generación de datos. La toma de la muestra puede incluir cómo se generó la muestra, por ejemplo, cómo se recogió de un sujeto, y/o cómo esta se cultivó, etc. La generación de datos puede incluir cómo se adquirieron las imágenes o cómo se analizaron los perfiles de expresión génica. Esta información puede incluir uno o más detalles en relación con, por ejemplo, el nombre y la ubicación de la instalación de pruebas, la identidad del técnico de laboratorio que llevó a cabo el ensayo y/o que introdujo los datos de entrada, la fecha y hora en que se llevó a cabo el ensayo o se analizó, la ubicación donde la muestra y/o los datos de los resultados se almacenan, el número de lote de los reactivos (por ejemplo, kit, etc.) usados en el ensayo, y similares. Los campos del informe con esta información generalmente se pueden rellenar usando información proporcionada por el usuario.

El informe puede incluir información sobre el proveedor del servicio, que puede estar ubicado fuera del centro de salud en el que se encuentra el usuario, o dentro de la instalación de salud. Los ejemplos de tal información pueden incluir el nombre y la ubicación del proveedor de servicios, el nombre del revisor, y cuando sea necesario o se desee, el nombre de la persona que llevó a cabo la preparación de las muestras y/o la generación de datos. Los campos del informe con esta información generalmente se pueden rellenar usando datos proporcionados por el usuario, los cuales pueden seleccionarse entre las selecciones preintroducidas (por ejemplo, usando un menú desplegable). Otra información sobre el proveedor de servicios en el informe puede incluir información del contacto para la información técnica sobre el resultado y/o sobre el informe interpretativo.

El informe puede incluir una sección de datos del sujeto, incluyendo la historia clínica de los sujetos de los cuales se han recogido los ovocitos o las células pluripotentes, la edad del paciente, las características del ciclo de fecundación in vitro (por ejemplo, la tasa de fecundación, el nivel de la hormona estimulante del folículo (FSH) el día 3), y, cuando ovocitos se recogen, los parámetros de cohorte del cigoto/embrión (por ejemplo, número total de embriones). Estos datos del sujeto se pueden integrar para mejorar la evaluación del embrión y/o ayudar a determinar el número óptimo de embriones a transferir. El informe también puede incluir datos administrativos del sujeto (es decir, datos que no son esenciales para la evaluación del potencial de desarrollo), tales como la información para identificar al sujeto (por ejemplo, nombre, fecha de nacimiento del sujeto (DOB), género, dirección

postal y/o dirección de residencia, número de historia clínica (MRN), número de habitación y/o cama en un centro de salud), información del seguro, y similares), el nombre del médico del sujeto o de otro profesional de salud que ordenó la evaluación del potencial de desarrollo y, si es diferente del médico solicitante, el nombre de un médico de la plantilla que es responsable del cuidado del paciente (por ejemplo, el médico de atención primaria).

- 5 El informe puede incluir una sección de datos de la muestra, que puede proporcionar información sobre la muestra biológica analizada en la evaluación, tal como el tipo de muestra (embrión), cómo se manipuló la muestra (por ejemplo, temperatura de almacenamiento, protocolos de preparación) y la fecha y hora de la recogida. Los campos del informe con esta información generalmente se pueden rellenar usando datos proporcionados por el usuario, los cuales pueden seleccionarse entre las selecciones preintroducidas (por ejemplo, usando un menú desplegable).
- 10 El informe puede incluir una sección de informe de evaluación, que puede incluir la información relativa a cómo se llegó a las evaluaciones/determinaciones tal como se describe en la presente memoria. El informe interpretativo puede incluir, por ejemplo, imágenes de lapso de tiempo del embrión que se está evaluando, y/o resultados de expresión génica. La porción de evaluación del informe, opcionalmente, también puede incluir una sección de recomendación(es). Por ejemplo, cuando los resultados indican un buen potencial de desarrollo de un embrión, la recomendación puede incluir una recomendación de que se trasplante un número limitado de embriones en el útero durante el tratamiento de fertilidad como se recomienda en la técnica.
- 15

También se apreciará fácilmente que los informes pueden incluir elementos adicionales o elementos modificados. Por ejemplo, cuando sea electrónico, el informe puede contener hipervínculos que apunten a bases de datos internas o externas que proporcionen información más detallada sobre determinados elementos del informe. Por ejemplo, el elemento de datos del paciente del informe puede incluir un hipervínculo a un registro electrónico del paciente, o un sitio para acceder a tal registro del paciente, registro de paciente que se mantiene en una base de datos confidencial. Esta última realización puede ser de interés en un sistema intrahospitalario o en el contexto de una clínica. Cuando está en formato electrónico, el informe se registra en un medio físico adecuado, tal como un medio legible por ordenador, por ejemplo, en una unidad de memoria del ordenador, unidad lectora zip, CD, DVD, etc.

- 20
- 25 Se apreciará fácilmente que el informe puede incluir todos o algunos de los elementos anteriores, con la condición de que el informe generalmente incluye al menos los elementos suficientes para proporcionar el análisis solicitado por el usuario (por ejemplo, una evaluación del potencial de desarrollo).

Utilidad

- 30 Como se discutió anteriormente, los métodos de la invención se pueden usar para evaluar embriones para determinar su potencial de desarrollo. Esta determinación del potencial de desarrollo se puede usar para guiar las decisiones y/o acciones clínicas. Por ejemplo, con el objetivo de incrementar las tasas de embarazo, los médicos suelen transferir múltiples embriones a los pacientes, lo que potencialmente da como resultado embarazos múltiples que ponen en riesgo la salud de la madre y de los fetos. Usando los resultados obtenidos a partir de los métodos de la invención, se determina antes del trasplante el potencial de desarrollo de los embriones que se transfieren para desarrollarse en fetos, lo que permite al profesional médico decidir cuántos embriones se van a transferir, de manera que se maximice la probabilidad de éxito de un embarazo a término al tiempo que se minimiza el riesgo.
- 35

- 40 Las evaluaciones realizadas siguiendo métodos de la invención también pueden encontrar uso en la clasificación de embriones de un grupo de embriones o células pluripotentes según su potencial de desarrollo. Por ejemplo, en algunos casos, múltiples embriones pueden ser capaces de desarrollarse dando lugar a blastocistos, es decir, tendrán un buen potencial de desarrollo. Sin embargo, algunos embriones tendrán más probabilidades de alcanzar el estadio de blastocistos o convertirse en un blastocisto de mayor calidad que los otros, es decir, tendrán mejor potencial de desarrollo que otros embriones. En tales casos, se pueden usar métodos de la invención para clasificar los embriones del grupo. En tales métodos, se miden uno o más parámetros celulares para cada embrión para llegar a la medida de un parámetro celular para cada embrión. La medida o medidas de parámetro celular de cada uno de los embriones se emplean entonces para determinar el potencial de desarrollo de los embriones de unos con respecto a otros. En algunas realizaciones, las medidas de parámetros celulares procedentes de cada uno de los embriones se emplean mediante la comparación de las medidas de parámetro celular con una medida de parámetro celular de un embrión de referencia para determinar los potenciales de desarrollo de cada embrión/célula pluripotente, y entonces comparando los potenciales de desarrollo determinados para cada embrión para determinar el potencial de desarrollo de los embriones de unos con respecto a otros. De esta manera, un profesional que se encuentra evaluando, por ejemplo, múltiples cigotos/embriones, puede elegir solamente los embriones de mejor calidad, es decir, los que tienen el mejor potencial de desarrollo, para transferirlos a fin de maximizar las probabilidades de éxito de un embarazo a término al tiempo que se minimiza el riesgo.
- 45
- 50
- 55

Las evaluaciones realizadas siguiendo los métodos de la invención también pueden encontrar uso en la determinación del potencial de desarrollo de ovocitos que son madurados in vitro y de las células madre que se cultivan in vitro. La información sobre el potencial de desarrollo de los ovocitos obtenidos por los métodos de la invención puede guiar la selección de los ovocitos para la fecundación por parte del profesional, lo que resulta en

una mayor probabilidad de éxito en la obtención de blastocistos a partir de estos ovocitos. Asimismo, la información sobre el potencial de desarrollo de las células madre pueden informar al profesional para la selección de las células madre que se van a usar en los procedimientos para, por ejemplo, reconstituir o reemplazar un tejido in vivo en un sujeto con necesidad de ello.

5 Reactivos, dispositivos y kits

También se divulgan en la presente memoria reactivos, dispositivos y kits de los mismos para la práctica de uno o más de los métodos anteriormente descritos. Los reactivos, dispositivos y kits objetos de los mismos pueden variar grandemente. Los reactivos y dispositivos de interés incluyen los mencionados anteriormente con respecto a los métodos de medición de cualquiera de los parámetros celulares antes mencionados, en los cuales dichos reactivos pueden incluir placas de cultivo, medios de cultivo, microscopios, software de imágenes, software de análisis de imágenes, cebadores de ácidos nucleicos, matrices de sondas de ácido nucleico, anticuerpos, reactivos de sistemas que producen señales, etc., dependiendo del protocolo de medición particular que se vaya a ejecutar. Por ejemplo, los reactivos pueden incluir cebadores de PCR que son específicos para uno o más de los genes Cofilin, DIAPH1, ECT2, MYLC2/MYL5, DGCR8, Dicer/DICER1, TARBP2, CPEB1, Symplekin/SYMPK, YBX2, ZAR1, CTNNB1, DNMT3B, TERT, YY1, IFGR2/IFNGR2, BTF3, y NELF, como se describió anteriormente. Otros ejemplos de reactivos incluyen las matrices que comprenden sondas que son específicas para uno o más de los genes de interés, o anticuerpos contra las proteínas codificadas por estos genes de interés.

Además de los componentes anteriores, los kits del asunto incluyen además instrucciones para poner en práctica los métodos del asunto. Estas instrucciones pueden estar presentes en los kits del asunto en una variedad de formas, una o más de las cuales puede estar presente en el kit. Una de las formas en que estas instrucciones pueden estar presentes es la información impresa en un medio o sustrato adecuado, por ejemplo, un trozo o trozos de papel sobre las cuales se imprime la información, en el paquete del kit, en un inserto del paquete, etc. Otro medio más sería un medio legible por ordenador, por ejemplo, un disquete, un CD, etc., sobre el cual se ha registrado la información. Otro medio más que puede estar presente es una dirección de sitio web que usarse a través de Internet para acceder a la información en un sitio retirado. Cualquier medio conveniente puede estar presente en los kits.

Obtención de imágenes celulares automatizadas con una matriz de microscopios

Algunos de los métodos descritos anteriormente requieren la capacidad de observar el desarrollo de los embriones y las células madre a través de la obtención de imágenes de lapso de tiempo. Esto puede lograrse mediante el uso de un sistema compuesto por una matriz de microscopios en miniatura de múltiples canales que se puede adaptar dentro de una incubadora estándar. Esto permite obtener las imágenes de múltiples muestras de forma rápida y simultáneamente, sin tener que mover físicamente las placas. Un prototipo ilustrativo, que se muestra en la Fig. 22, consiste en una matriz de microscopios de 3 canales con iluminación de campo oscuro, aunque podrían usarse otros tipos de iluminación. Por "tres canales", se entiende que hay tres microscopios independientes que obtienen imágenes de tres placas de cultivo diferentes simultáneamente. Un motor de paso a paso se usa para ajustar la posición focal para enfocar o adquirir una pila de imágenes de 3D. LEDs de luz blanca se usan para la iluminación, aunque se ha observado que para los embriones humanos, el uso de LEDs del rojo o cerca del infrarrojo (IR) puede mejorar la relación del contraste entre las membranas celulares y las porciones internas de las células. Esta relación de contraste mejorada puede ayudar al análisis de las imágenes, tanto manual como automatizado. Además, al moverse a la región del infrarrojo se puede reducir la fototoxicidad para las muestras. Las imágenes se capturan mediante cámaras web de bajo costo y alta resolución, pero pueden usarse otros tipos de cámaras.

Como se muestra en la Fig. 22, cada microscopio del sistema prototipo descrito anteriormente se usa para obtener imágenes de una placa de cultivo que puede contener en cualquier posición de 1-30 embriones. El microscopio recoge la luz proveniente de un LED de luz blanca conectado a un disipador de calor para ayudar a disipar cualquier calor generado por el LED, el cual es muy pequeño para tiempos de exposición breves. La luz pasa a través de un parche de campo oscuro convencional para detener la luz directa, a través de una lente condensadora y encima de un espécimen marcado con "placa de Petri", que es una placa de cultivo que contiene los embriones que se están cultivando y estudiado. La placa de cultivo puede tener pocillos que ayudan a mantener el orden de los embriones y evitar que se muevan mientras que la placa se lleva hacia y desde la incubadora. Los pocillos pueden colocarse juntos dejando un espacio estrecho entre ellos para que los embriones puedan compartir la misma gota de los medios. La luz dispersa se pasa entonces a través de un objetivo del microscopio, luego a través de un doblete acromático, y a un sensor CMOS. El sensor CMOS actúa como una cámara digital y está conectado a un ordenador para el análisis y seguimiento de imágenes de la forma anteriormente descrita.

Este diseño es fácilmente escalable para proporcionar significativamente más canales y diferentes técnicas de iluminación, y se puede modificar para acomodar dispositivos fluidicos para la alimentación de las muestras. Además, el diseño puede integrarse con un sistema de control de realimentación, donde las condiciones de cultivo, tales como temperatura, CO₂ (para controlar el pH), y los medios se optimizan en tiempo real sobre la base de la retroalimentación y a partir de los datos de las imágenes. Este sistema se usó para adquirir vídeos de lapso de tiempo del desarrollo embrionario humano, lo cual tiene utilidad en la determinación de viabilidad de los embriones para los procedimientos de fecundación in vitro (FIV). Otras aplicaciones incluyen la terapia con células madre, la

selección de fármacos, y la ingeniería de tejidos.

En una realización del dispositivo, la iluminación se proporciona mediante un diodo emisor de luz blanca (LED) Luxeon montado sobre un disipador de calor de aluminio y accionado mediante un controlador de corriente regulada BuckPuck. La luz del LED se pasa a través de una lente colimadora. La luz colimada entonces pasa a través de una parada de parche de láser mecanizado personalizado, tal como se muestra en la Fig. 22, y se enfoca en un cono hueco de luz que usa una lente condensadora esférica. La luz que se transmite directamente a través de la muestra es rechazada por el objetivo, mientras que la luz que se dispersa por la muestra se recoge. En una realización, se usan los objetivos Olympus con 20x aumentos, aunque se pueden usar aumentos menores para incrementar el campo de visión, o se pueden usar mayores aumentos para incrementar la resolución. La luz recogida se pasa entonces a través de una lente de doblete acromático (es decir, un lente de tubo) para reducir los efectos de la aberración cromática y esférica. Alternativamente, la luz recogida a partir del objetivo que toma la imagen se puede pasar a través de otro objetivo, que apunta en dirección opuesta, que actúa como un reemplazo de la lente de tubo. En una configuración, el objetivo que toma la imagen puede ser un objetivo de 10x, mientras que el objetivo de lente de tubo puede ser un objetivo 4x. La imagen resultante es captada por un sensor CMOS con una resolución de 2 megapíxeles (1600 x 1200 píxeles). También se pueden usar diferentes tipos de sensores y resoluciones.

La Fig. 23A muestra una fotografía de la matriz de microscopios multicanal, que tiene 3 microscopios idénticos. Todos los componentes ópticos se montan en tubos de lentes. En el funcionamiento del sistema de matriz, las placas de Petri se cargan sobre plataformas acrílicas que están montadas sobre niveles manuales con inclinación en 2 ejes, lo que permite el ajuste del plano de la imagen con respecto al eje óptico. Estos niveles se fijan a la base del microscopio y no se mueven después de la alineación inicial. Los módulos de iluminación, que consisten en los LEDs, lentes colimadoras, paradas de parches, y lentes condensadoras, se montan en los niveles xyz manuales para posicionar y enfocar la luz de la iluminación. Los módulos para la obtención de las imágenes, que consisten de los objetivos, los lentes acromáticos, y los sensores CMOS, también se montan en los niveles manuales xyz para posicionar el campo de visión y focalizar los objetivos. Los 3 módulos de obtención de imágenes se acoplan a portaobjetos lineales y se apoyan mediante un brazo de palanca única, que se acciona mediante un motor paso a paso. Esto permite la focalización controlada por ordenador y la captura automática de pilas de imágenes. Se pueden usar otros métodos de focalización automática, así como de accionamiento.

La matriz de microscopios se colocó dentro de una incubadora estándar, como se muestra en la Fig. 23B. Los sensores de imagen CMOS se conectaron a través de la conexión USB a un solo nodo situado en el interior de la incubadora, el cual se enruta a un PC externo, junto con otras líneas de comunicación y de energía. Todos los cables eléctricos salen de la incubadora a través del centro de un tapón de goma sellado con pegamento de silicona.

La matriz de microscopios descrita anteriormente se usó para registrar imágenes de lapso de tiempo del desarrollo temprano del embrión humano y el crecimiento documentado desde el cigoto a través de los estadios de blastocisto. Se hizo un seguimiento de un total de 242 embriones en cuatro experimentos diferentes. Fuera de este grupo, a 100 se les tomaron imágenes hasta el día 5 ó 6, y los otros se retiraron de las estaciones de imágenes en diversos momentos en el tiempo para el análisis de la expresión génica. En la Fig. 24 se muestra una captura de pantalla del software de captura de imágenes y los embriones a los que se les tomaban imágenes. Las imágenes se capturaron cada 5 minutos, con más o menos 1 segundo de exposición a luz tenue por imagen. La cantidad total de luz recibida por las muestras fue equivalente a 24 minutos de exposición continua, similar al nivel total experimentado en una clínica de fecundación in vitro durante la manipulación. La duración de 1 segundo de exposición a la luz por la imagen puede reducirse. Antes de trabajar con los embriones humanos, realizamos numerosos experimentos de control con embriones de ratón preimplantacionales para asegurarse de que tanto la tasa de formación de blastocistos como los patrones de expresión génica no se veían afectados por el proceso de obtención de imágenes.

Las Figs. 25 y 26 muestran imágenes seleccionadas de las secuencias de lapso de tiempo. Se muestran imágenes para el día 1, el día 2,5, el día 4, y el día 5,5. De la secuencia mostrada en la Fig. 25, 3 de los 9 embriones se desarrollaron dando lugar a blastocistos, y de la secuencia mostrada en la Fig. 26, 5 de los 12 embriones se desarrollan dando lugar a blastocistos. Los embriones individuales se siguieron a lo largo del tiempo, a pesar de que sus posiciones en el campo fotográfico se desplazaron cuando los embriones se sometieron a un cambio de medio en el día 3. El uso de medios secuenciales es necesario para cumplir con los requerimientos específicos de estadio del desarrollo embrionario. Durante el cambio de medios, los embriones se retiraron de la estación de obtención de imágenes durante unos pocos minutos y se transfirieron a nuevas placas de Petri. Con el fin de mantener el seguimiento de la identidad de cada embrión durante el cambio de los medios, la transferencia de las muestras de una placa a otra se grabó en video para comprobar que los embriones no se mezclaban. Este proceso también se usó durante la recogida de las muestras para el análisis de la expresión génica. La problemática del seguimiento de la identidad del embrión se puede mitigar mediante el uso de pocillos para ayudar a organizar a los embriones en un orden particular.

Placas de Petri con micropocillos

Al transferir las placas de Petri entre las diferentes estaciones, los embriones a veces pueden moverse, haciéndose difícil mantener el seguimiento de la identidad del embrión. Esto plantea un reto cuando se realiza la obtención de imágenes de lapso de tiempo en una estación, y los embriones se mueven posteriormente a una segunda estación para la selección de los embriones y la transferencia. Un método es cultivar los embriones en placas de Petri individuales. Sin embargo, esto requiere que cada embrión tenga su propia gota de medios. En un procedimiento típico de FIV, por lo general es deseable cultivar todos los embriones de un paciente en la misma placa de Petri y en la misma gota de medios. Para solucionar este problema, hemos diseñado una placa de Petri personalizada con micropocillos. Esto evita que los embriones se muevan y mantengan su disposición en la placa de Petri al ser transferidos a y desde la incubadora o las estaciones de obtención de imágenes. Además, los pocillos son lo suficientemente pequeños y se juntan dejando un espacio estrecho entre ellos de tal manera que pueden compartir la misma gota de los medios y verse todos simultáneamente por el mismo microscopio. La superficie inferior de cada micropocillo tiene un acabado de calidad óptica. La Fig. 27A muestra un dibujo con dimensiones para una realización. En esta versión, existen 25 micropocillos juntos con un espacio estrecho entre ellos con un campo de visión de 1,7 x 1,7 mm. La Fig. 27B muestra una vista en 3D de los micropocillos, que están rebajados aproximadamente 100 micras en la superficie de la placa. En la placa se incluyen marcadores fiduciarios, incluidos letras, números y otras marcas, para ayudar a la identificación.

Todas las referencias citadas en la presente memoria se incorporan mediante referencia en su totalidad.

Ejemplos

Los ejemplos siguientes se presentan con el fin de proporcionarles a los expertos en la técnica una divulgación y una descripción de cómo realizar y usar la presente invención, y no están destinados a limitar el alcance de lo que los inventores consideran su invención ni tienen la intención de representar que los experimentos que siguen son todos o los únicos experimentos que se realizaron. Se han hecho esfuerzos para asegurar la precisión en lo que respecta a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.), pero se debe contar con algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio en peso, la temperatura está en grados Centígrados y la presión es o está cercana a la atmosférica.

Fuente de la muestra

Todos los embriones usados en este estudio se recogieron durante un período de varios años y fueron fecundados y crioconservados por varios embriólogos. El número promedio de embriones por paciente en nuestro estudio fue de 3, y se incluyeron todos los grupos de edad que se encontraron en un centro de FIV rutinario. Notablemente, todos los embriones usados para estos experimentos se generaron mediante FIV (en oposición a ICSI), por lo que los embriones se derivaron de esperma que tenía una función relativamente normal (al menos en términos de su capacidad para penetrar el cúmulo, la zona, y el oolemma y formar un pronúcleo). Los protocolos de estimulación fueron los protocolos de Lupron largos estándares (cdc.gov/art). La crioconservación de embriones humanos sobrantes se llevó a cabo mediante su colocación en un medio de congelación (1,2 propanodiol 1,5 M + sacarosa 0,2 M) durante 25 minutos a temperatura ambiente (22 + 2°C). Los embriones se congelaron a continuación, usando un protocolo de congelación lenta (-1°C/min a -6.5°C; mantenimiento de temperatura durante 5 minutos, siembra; mantenimiento de temperatura durante 5 minutos; -0.5°C/min hasta -80°C, inmersión en un baño en nitrógeno líquido). Comité. No hay información de salud protegida que pudiera estar asociada con los embriones.

Un gran conjunto de los embriones crioconservados se validaron y se realizaron las siguientes observaciones: 1) Los embriones demostraron el ritmo indicativo del desarrollo embrionario normal, en términos de puntos de referencia que incluyen: Escisión a 2 células (ocurrió tempranamente en el día 2), inicio de la degradación del ARN (ocurrió en los días 1 a 3), escisión a 4 y 8 células (ocurrió al final del día 2 y del día 3, respectivamente), activación del genoma embrionario (en el día 3 en el estadio de 8 células), y formación de la mórula y el blastocisto (ocurrió en los días 4 y 5, respectivamente). 2) Los embriones demostraron una eficiencia en alcanzar el estadio de blastocisto que es típica de los embriones obtenidos en un entorno clínico. Esto se debió probablemente al hecho de que los embriones se crioconservaron en la etapa 2PN y representaban la matriz de embriones que se encuentran en una clínica de FIV ya que no se hizo ninguna "preselección" de los que se desarrollarían y no se desarrollarían antes de la crioconservación en el estadio de 1 célula (como es típico de los embriones crioconservados más tarde en el desarrollo en el día 3 o en los estadios de blastocisto). Por lo tanto, nuestros datos confirman que estos embriones mostraron tasas similares de formación de blastocisto en comparación con los que se observan en las clínicas típicas de FIV. 3) Los estudios previos han demostrado que los embriones que se congelan en la etapa 2PN presentan un potencial similar para el desarrollo, implantación, embarazo clínico y parto, en comparación con los embriones frescos. Otros estudios también han mostrado resultados similares para los ovocitos congelados lo que sugiere que los primeros eventos del desarrollo embrionario humano mantienen un ritmo apropiado después de la crioconservación. 4) Nos concentramos en los parámetros que no eran dependientes del momento de la fecundación o del tiempo de descongelación. El primer parámetro que medimos (duración de la primera citocinesis) es de corta duración (aproximadamente de 10-15 minutos) y no es dependiente del momento de la fecundación en este estudio (que puede medirse independientemente en todos los embriones, independientemente del resultado final). Más aún, todos los parámetros subsiguientes se midieron con respecto a este punto de medida inicial y se compararon entre los embriones que se desarrollaron con éxito dando lugar a

blastocisto y los que no lograron hacerlo. 5) Finalmente, hacemos notar que los embriones frescos (sin congelar) que están en 3PN se sabe que se desarrollan a lo largo del mismo período de tiempo que los embriones normales frescos; se compararon los parámetros de los embriones frescos 3PN que se obtuvieron de la clínica de FIV de Stanford, y se observó que no eran diferentes de los de los embriones crioconservados o los informes publicados.

5 Plan experimental

En cuatro series de experimentos, se siguió el desarrollo de 242 embriones en etapa pronuclear (61, 80, 64 y 37, respectivamente). En cada serie de experimentos, los cigotos humanos se descongelaron en el día 1 y se cultivaron en grupos pequeños en múltiples placas. Cada placa se observó de forma independiente con microscopía de lapso de tiempo bajo iluminación de campo oscuro en estaciones de obtención de imágenes separadas. En intervalos de aproximadamente 24 horas, una placa de embriones se retiró del sistema de imágenes y se recogió ya sea como embriones individuales o como células individuales (blastómeros) para el análisis de la expresión génica por PCR cuantitativa en tiempo real de alto rendimiento. Cada placa contenía típicamente una mezcla de embriones que alcanzaron el estadio de desarrollo esperado en el momento de ser recogidos (los denominados "normales") y los que se detuvieron o se retrasaron en estadios de desarrollo anteriores, o se fragmentaron ampliamente (los denominados "anormales"). Los embriones se analizaron, ya sea como embriones intactos individuales o se disociaron en blastómeros independientes, seguido por amplificación del ARN de los genes específicos. Se obtuvieron las imágenes de un subconjunto de embriones (100 de 242) hasta el día 5 ó 6 con el objetivo de monitorizar la formación de blastocistos.

Cultivo y microscopía de embriones humanos

Los embriones humanos se descongelaron extrayendo los crioviales del tanque de almacenamiento con nitrógeno líquido y colocándolos a temperatura ambiente. Una vez que un vial se descongeló, se abrió y los embriones se visualizaron bajo un microscopio de disección. El contenido del vial se vertió a continuación en la parte inferior de una placa de cultivo 3003. Los embriones se localizaron en la gota y se evaluó y se registró la supervivencia de cada embrión. A temperatura ambiente, los embriones se transfirieron a una placa de cultivo 3037 que contiene 1,2-propanodiol 1 M + sacarosa 0,2 M durante 5 minutos, a continuación, 1,2-propanodiol 0,5 M + sacarosa 0,2 M durante 5 minutos, y 1,2-propanodiol 0,0 M + sacarosa 0,2 M durante 5 minutos. Posteriormente, los embriones se cultivaron en medio de escisión Advantage de Quinn (CooperSurgical), complementado con 10% de Sustituto de Proteína del Suero Advantage de Quinn (SPS; CooperSurgical) entre los días 1 a 3, y medio de Blastocistos Advantage de Quinn (CooperSurgical) con 10% de SPS después del día 3 utilizando microgotas bajo aceite. Todos los experimentos usaron el mismo tipo de medio de estadio-escisión, excepto en dos estaciones durante el primer experimento, en las cuales se usó un medio Global (LifeGlobal, Guilford, CT). En este pequeño subgrupo (12 embriones), los embriones mostraron una tasa de formación de blastocistos ligeramente inferior (3 de cada 12, ó 25%), pero la sensibilidad y la especificidad de los parámetros predictivos fueron ambas del 100% para este grupo.

La obtención de imágenes de lapso de tiempo se realizó en múltiples sistemas para acomodar el análisis concurrente de múltiples muestras, así como para validar la consistencia de los datos a través de diferentes plataformas. Los sistemas consistieron en 7 microscopios individuales: (1) dos microscopios Olympus IX-70/71 modificados equipados con fases calentadas Tokai Hit, LEDs Luxeon de luz blanca, y una abertura para la iluminación de campo oscuro, (2) dos microscopios Olympus CKX-40/41 modificados equipados con fases calentadas, LEDs Luxeon de luz blanca, e iluminación de Contraste de Modulación de Hoffman (nota: estos sistemas sólo se usaron durante los primeros 4 experimentos después de lo cual se decidió que la iluminación de campo oscuro era preferible para medir los parámetros), y (3) una matriz de microscopios en miniatura de 3 canales construida de forma personalizada que cabe dentro de una incubadora estándar, equipada con LEDs Luxeon de luz blanca y aberturas para la iluminación de campo oscuro. No se observó diferencia significativa en el comportamiento del desarrollo, la tasa de formación de blastocistos, o los perfiles de expresión génica entre los embriones cultivados en estos diferentes sistemas, de hecho, nuestros parámetros para la predicción de blastocistos fueron consistentes a través de múltiples sistemas y experimentos.

La intensidad de la luz para todos los sistemas fue significativamente menor que la luz que se usa típicamente en un microscopio de reproducción asistida debido a la baja potencia de los LEDs (en relación con una bombilla halógena de 100 W típica) y la alta sensibilidad de los sensores de la cámara. Mediante el uso de un medidor de potencia óptica, se determinó que la potencia de un microscopio de reproducción asistida típico (Olympus IX-71 Hoffman Modulation Contrast) en una longitud de onda de 473 nm varía desde aproximadamente 7 a 10 mW dependiendo de los aumentos, mientras que la potencia de nuestros sistemas de obtención de imágenes se midieron para que estuvieran entre 0,2 y 0,3 mW a la misma longitud de onda. Las imágenes se capturaron en un tiempo de exposición de 1 segundo cada 5 minutos durante un máximo de 5 ó 6 días, lo que resulta en aproximadamente 24 minutos de exposición a la luz continua. A una potencia de 0,3 mW, esto es equivalente a aproximadamente 1 minuto de exposición bajo un microscopio de reproducción asistida típico.

Para realizar el seguimiento de la identidad de cada embrión durante el experimento de obtención de imágenes y de expresión génica correlacionadas, se instaló una cámara de video en el microscopio estereoscópico y se registró el proceso de transferencia de la muestra durante el cambio de los medios y la toma de muestras. Se realizaron experimentos de control con embriones de ratón preimplantacionales (n = 56) y un pequeño subconjunto

de embriones humanos ($n = 22$), y no se observó diferencia significativa ($p = 0,96$) en la tasa de formación de blastocistos entre los embriones a los que se les tomó las imágenes y los de control.

Análisis a través de qRT-PCR de alto rendimiento

- Para el análisis por qRT-PCR de un solo embrión, o de un solo blastómero, los embriones se trataron primero con una solución de Ácido de Tyrode para eliminar la zona pelúcida. Para recoger los blastómeros independientes, los embriones se incubaron en medio Advantage de Quinn libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} con HEPES (CooperSurgical) durante de 5 a 20 minutos a 37°C con pipeteado riguroso. Las muestras se recogieron directamente en $10\ \mu\text{l}$ de tampón de reacción; posteriormente se realizó un solo paso de reacción de transcripción inversa/preamplificación como se ha descrito anteriormente. Como cebadores específicos de los genes durante las reacciones de transcripción inversa y preamplificación se usaron los de la mezcla de reacción conjunta de cebadores y sondas de qRT-PCR del ensayo bajo demanda 20X ABI (Applied Biosystems). Las reacciones de qRT-PCR de alto rendimiento se realizaron con las matrices Fluidigm Biomark 96.96 Dynamic Arrays tal como se ha descrito anteriormente usando las sondas de qRT-PCR del ensayo bajo demanda ABI. Todas las muestras se cargaron en 3 ó 4 réplicas técnicas. El análisis de los datos de la qRT-PCR se realizó con qBasePlus (Biogazelle), Microsoft Excel y un software personalizado.
- Ciertos genes se omitieron del análisis de los datos ya sea debido a la calidad deficiente de los datos (por ejemplo, curvas deficientes de amplificación por PCR) o consistentemente baja o nula expresión en los embriones evaluados. Para el análisis de la edad de los blastómeros, el panel de transcritos maternos que se usó incluye DAZL, GDF3, IFITM1, STELLAR, SYCP3, VASA, GDF9, PDCD5, ZAR1 y ZP1, mientras que el panel de genes embrionarios incluye ATF7IP, CCNA1, EIF1AX, EIF4A3, H2AFZ, HSP70.1, JARID1B, LSM3, PABPC1 y SERTAD1.
- El valor de la expresión de cada gen en relación con los genes de referencia GAPDH y RPLPO, así como en relación al promedio de los genes, se calculó usando los métodos geNorm y $\Delta\Delta\text{Ct}$. GAPDH y RPLPO se seleccionaron como los genes de referencia para este estudio basándose empíricamente en el valor de la estabilidad génica y del coeficiente de variación: 1,18 y 46% para GAPDH y 1,18 y 34% para RPLPO. Estos fueron los más estables entre los 10 genes constitutivos que se probaron, y entraban bien dentro del intervalo de un conjunto típico de muestras heterogéneas. En segundo lugar, se observó que en los blastómeros individuales, como se esperaba, la cantidad de transcritos de RPLPO y GAPDH disminuyó en aproximadamente 1 valor de Ct por división entre el estadio de 1 célula y el estadio de 8 células, lo que es congruente con las expectativas que cada célula hereda aproximadamente la mitad de la combinación de ARNm con cada división de escisión, en ausencia de nuevos transcritos antes de la EGA durante los 3 primeros días del desarrollo humano. En tercer lugar, se notó que el nivel de expresión de estos genes de referencia en los blastómeros individuales, se mantuvo estable entre el estadio de 8 células y el estadio de mórula, después que comenzara la EGA. Al nivel de embrión intacto, los valores de Ct tanto para RPLPO como para GAPDH se mantuvieron casi constantes durante todo el desarrollo hasta el estadio de mórula, con un ligero aumento a continuación del estadio de blastocisto tal vez debido al aumento de los niveles de transcritos en el mayor número de los blastómeros presentes. La mayor parte del análisis de la expresión génica que se llevó a cabo en este estudio se enfocó en los estadios de desarrollo previos al estadio de mórula, sin embargo, cuando el nivel de expresión de los genes de referencia era extremadamente estable.

Seguimiento automatizado de las células

- Nuestro algoritmo de seguimiento de las células usa un marco probabilístico basado en los métodos secuenciales de Monte Carlo, a los cuales en el campo de la visión por ordenador se alude frecuentemente como el filtro de partículas. El filtro de partículas sigue la propagación de las tres principales variables en el tiempo: el estado, el control, y la medida. La variable de estado es un modelo de un embrión y se representa como una colección de elipses. La variable de control es una entrada que transforma la variable de estado y consiste en nuestro modelo de propagación y división celular. La variable de medida es una observación del estado y consiste en nuestras imágenes adquiridas por el microscopio de lapso de tiempo. Nuestra estimación del estado actual en cada paso de tiempo se representa con una distribución de probabilidad *a posteriori*, la cual se aproxima por un conjunto de muestras ponderadas llamadas partículas. Usamos los términos *partículas* y *modelos embrionarios* de manera intercambiable, donde una partícula es una hipótesis de un modelo embrionario en un momento dado. Después de la inicialización, el filtro de partículas aplica varias veces tres pasos: predicción, medición y actualización.
- Predicción:** Las células se representan como elipses en el espacio de 2D, y cada célula tiene una orientación e índice de superposición. El índice de superposición especifica la altura relativa de las células. En general, hay dos tipos de comportamiento que queremos predecir: movimiento celular y división celular. Para el movimiento celular, nuestra entrada de control toma una partícula y perturba aleatoriamente cada parámetro para cada célula, incluyendo la posición, la orientación y la longitud de los ejes mayor y menor. La perturbación se muestra aleatoriamente a partir de una distribución normal con varianza relativamente pequeña (5% de los valores inicializados). Para la división celular, se usa el siguiente enfoque. En un punto dado en el tiempo, para cada partícula, le asignamos una probabilidad del 50% de que una de las células se dividirá. Este valor se escoge empíricamente, y se extiende por una amplia gama de posibles divisiones celulares, mientras que se mantiene una buena cobertura de la configuración actual. Si se prevé una división, entonces, la célula que se divide se escoge al azar. Cuando una célula se escoge para dividirse, se aplica una división simétrica a lo largo del eje mayor de la elipse, produciendo dos células hijas de igual tamaño y forma. Entonces, al azar, se perturba cada valor de las células hijas. Finalmente, se seleccionan aleatoriamente los índices de superposición de las dos células hijas,

mientras que mantiene su superposición colectiva con respecto al resto de las células.

Después de aplicar la entrada de control, convertimos cada partícula en una imagen simulada. Esto se logra mediante la proyección de la forma elíptica de cada célula en la imagen simulada usando el índice de superposición. Los valores de los píxeles correspondientes se establecen en un valor binario de 1 y se dilatan para crear un espesor de la membrana comparable al de los datos de la imagen que se observa. Debido que los embriones son parcialmente transparentes y se recoge la luz fuera de foco, las membranas celulares en la parte inferior del embrión son sólo visibles algunas veces. En consecuencia, las membranas celulares ocluidas se añaden con 10% de probabilidad. En la práctica, se ha encontrado que estos puntos de la membrana ocluida son cruciales para el modelado de la forma precisa, pero es importante para que estén suficientemente esparcidos de manera que no se parezcan a un borde visible.

Medición: Una vez que se ha generado una distribución de modelos hipotéticos, las imágenes simuladas correspondientes se comparan con la imagen del microscopio real. La imagen del microscopio se preprocesa para crear una imagen binaria de las membranas celulares usando un método basado en el principio de la curvatura seguido por el umbral. La precisión de la comparación se evaluó usando una distancia chaflán simétrica truncada, la cual luego se usa para asignar un peso, o probabilidad, a cada partícula.

Actualización: Después que se asignan los pesos, las partículas se seleccionan en proporción a estos pesos para crear un nuevo conjunto de partículas para la próxima iteración. Esto enfoca la distribución de partículas en la región de máxima probabilidad. Las partículas con baja probabilidad se descartan, mientras que las partículas con alta probabilidad se multiplican. El re-muestreo de las partículas se realiza usando el método de varianza baja.

Una vez que los embriones se han modelado, podemos extraer los parámetros de la obtención dinámica de imágenes, tales como la duración de la citocinesis y el tiempo entre las mitosis, como se discutió en el texto principal. Nuestro software de seguimiento de células se implementó previamente en Matlab, y los tiempos de cálculo variaron desde un par de segundos a medio minuto para cada imagen dependiendo del número de partículas. Nuestra versión actual del software se implementa en C, y los tiempos de cálculo varían desde 1 a 5 segundos, dependiendo del número de partículas.

Ejemplo 1

Análisis de las imágenes para determinar el potencial de desarrollo de los embriones.

Métodos

Embriones humanos de 1 célula congelados, a los que también se hace referencia como cigotos, se descongelaron y se colocaron en cultivo y se cultivaron bajo condiciones tales como las que se usan en los procedimientos de FIV. Como se describió en más detalle anteriormente, estos embriones parecen ser representativos de la población típica de la fecundación *in vitro* (FIV) ya que se congelaron en el estadio 2PN y así se crioconservaron indiscriminadamente. Esto está en contraste con los embriones típicamente crioconservados en estadios posteriores del desarrollo tras la transferencia de aquellos que se percibe que son de la más alta calidad durante los ciclos en fresco. Para algunos experimentos, los embriones se colocaron en una placa de cultivo estándar. Para otros experimentos, los embriones se cultivaron en placa de cultivo personalizada con micropocillos de calidad óptica.

Los embriones en crecimiento, por lo general entre 1 y 30 por placa, se siguieron individualmente mediante la obtención de imágenes de lapso de tiempo con un microscopio controlado por ordenador, equipado para el almacenamiento y análisis de imágenes digitales. En algunos casos, la obtención de las imágenes de lapso de tiempo se realizó con microscopios invertidos equipados con fases calentadas y cámaras de incubación. En otros casos, la obtención de imágenes de lapso de tiempo se realizó con matrices de microscopios en miniatura construidas de forma personalizada que caben dentro de una incubadora convencional, lo que permitió el cultivo simultáneo de múltiples placas de muestras en la misma incubadora y que fue escalable para acomodar múltiples canales sin limitaciones en cuanto al intervalo de tiempo mínimo entre la captura de imágenes sucesivas. Usar múltiples microscopios también eliminó la necesidad de mover la muestra, lo que mejora la precisión y la fiabilidad del sistema en general. Los sistemas de obtención de imágenes usaron iluminación de campo oscuro, lo cual proporcionó el incremento del contraste de la imagen para la extracción de las características y el posterior análisis de la imagen, aunque se notó que otra iluminación habría sido suficiente. Los microscopios individuales en la incubadora se aislaron uno del otro, proporcionando a cada placa de cultivo su propio ambiente controlado. Esto permitió que las placas se transfirieran hacia y desde las estaciones de obtención de imágenes sin perturbar el ambiente de las otras muestras.

Las imágenes de lapso de tiempo se recogieron para el análisis posterior de la morfología celular, incluyendo la medida de al menos uno de los parámetros celulares siguientes: la duración de la primera citocinesis, el intervalo de tiempo entre la primera y la segunda división celular, y el intervalo de tiempo entre la segunda y la tercera división celular. Las imágenes mostradas en las figuras se tomaron en un tiempo de exposición de 1 segundo cada 5 minutos durante un máximo de 5 ó 6 días. Como se describe en mayor detalle más adelante, la primera citocinesis habitualmente ocurre un día después de la fecundación y dura entre aproximadamente 14 minutos. La

primera y la segunda divisiones celulares están separadas habitualmente por un promedio de aproximadamente de 11 horas. La segunda y la tercera divisiones celulares están separadas habitualmente por un promedio de aproximadamente 1 hora. De esta manera, la obtención de las imágenes se prolongó durante un período de tiempo que duró aproximadamente 36 horas (más o menos varias horas) después de la fecundación.

5 Resultados

La línea de tiempo de desarrollo de un embrión humano sano preimplantacional en cultivo se documentó a lo largo un período de seis días mediante la obtención de imágenes de lapso de tiempo (Fig. 2). Se observó que un cigoto humano normal experimenta la primera división de escisión tempranamente en el día 2. Posteriormente, el embrión se escinde dando un embrión de 4 células y 8 células al final del día 2 y el día 3, respectivamente, antes de la compactación en una mórula en el día 4. La primera diferenciación celular morfológicamente evidente se observa en el día 5 y 6 durante la formación del blastocisto, cuando los blastómeros totipotentes se diferencian ya sea en las células trofodérmicas, las cuales dan lugar a las estructuras extraembrionarias como la placenta, o la masa celular interna, la cual se desarrolla dando lugar al feto in vivo y a células madre embrionarias pluripotentes in vitro.

A continuación seguimos el desarrollo de 242 embriones fecundados normalmente en cuatro series de experimentos independientes y documentamos la distribución de los embriones normales y detenidos entre las muestras que se cultivaron hasta el día 5 y 6. De los 242 embriones, 100 se cultivaron hasta el día 5 ó 6 y se observó que la tasa de formación de blastocisto estaba entre 33% - 53%, similar a la tasa de formación de blastocisto en una clínica típica de FIV (Fig. 3). Los embriones restantes quedaron detenidos en diferentes estadios de desarrollo, con mayor frecuencia entre los estadios de 2 células y de 8 células, y se definieron como anormales (Fig. 3). Con el fin de identificar los parámetros cuantitativos de la obtención de imágenes que predicen el éxito en el desarrollo embrionario hasta llegar al estadio de blastocisto, se extrajeron y analizaron varios parámetros de los vídeos de lapso de tiempo, incluyendo el tamaño de los blastómeros, el espesor de la zona pelúcida, el grado de fragmentación, la duración de los primeros ciclos celulares, los intervalos de tiempo entre las primeras mitosis, y la duración de la primera citocinesis. Durante el análisis de imágenes de video de embriones, tanto de desarrollo normal como anormal, se observó que muchos embriones detenidos experimentaban una citocinesis aberrante durante la primera división celular. Los embriones normales completaron la citocinesis en una ventana de tiempo estrecha de 14,3 $\pm$ 6,0 min desde la aparición de los surcos de escisión hasta completar la separación de las células hijas, de una manera suave y controlada. Esto se muestra en la Fig. 4 arriba. En contraste, los embriones anormales comúnmente mostraron uno de dos fenotipos de citocinesis aberrantes. En el fenotipo más suave, la morfología y el mecanismo de la citocinesis parecían normales, pero el tiempo requerido para completar el proceso fue más largo, oscilando desde unos pocos minutos adicionales a una hora (Fig. 4). De vez en cuando, un embrión que experimentó una citocinesis ligeramente prolongada aún se convirtió en un blastocisto. En el fenotipo más grave, la morfología y el mecanismo de la citocinesis estaban perturbados. Por ejemplo, como se muestra en el ejemplo en el panel inferior de la Fig. 4, los embriones formaban un surco de escisión de un solo lado y experimentaban una serie inusual de eventos de ondulamientos de la membrana durante varias horas antes de que finalmente se fragmentaran en componentes más pequeños. También se observaron otras variaciones de este comportamiento. Además, los embriones anormales que demuestran estos fenotipos más graves con frecuencia se fragmentan, proporcionando evidencia directa de que la fragmentación de embriones es probable un subproducto de la citocinesis aberrante que posteriormente se traduce en el desarrollo embrionario anormal.

El análisis detallado de los resultados de nuestras imágenes indicó que los embriones normales seguían una cadencia de tiempo estricta en la citocinesis y la mitosis durante las divisiones iniciales, antes de que se inicie la activación de genes embrionarios (EGA), lo que sugiere que el potencial de desarrollo de un embrión está predeterminado por los programas heredados maternos. En particular, observamos tres intervalos temporales, o parámetros, en los ciclos de células de los embriones en estadios tempranos que están regulados estrictamente: (1) la duración de la primera citocinesis, (2) intervalo de tiempo entre la primera y segunda mitosis, y (3) sincronía de la segunda y tercera mitosis. La relación entre estos tres intervalos de tiempo y los cambios morfológicos se muestra en la Fig. 5. Para los embriones normales, medimos que estos parámetros eran, aproximadamente, 14,3 $\pm$ 6,0 minutos, 11,1 $\pm$ 2,1 horas y 1,0 $\pm$ 1,6 horas, respectivamente (expresados aquí como la media más/menos la desviación estándar).

También se realizó obtención de imágenes de un conjunto pequeño ($n = 10$) de embriones recién obtenidos (no crioconservados) que fueron 3PN (triploides) a partir del estadio de una sola célula. Los embriones 3PN se ha demostrado que siguen la misma línea de tiempo de eventos significativos que los embriones normales recién obtenidos a lo largo de al menos los tres primeros ciclos celulares. De estos embriones se obtuvieron imágenes antes de nuestros experimentos principales con el fin de validar los sistemas de obtención de imágenes (pero por razones técnicas no se realizó su seguimiento hasta dar blastocistos). A parte de este conjunto de embriones recién obtenidos, 3 de los embriones siguieron una línea de tiempo de eventos similar a la de nuestros embriones 2PN crioconservados, con la duración de la citocinesis oscilando entre 15 y 30 minutos, el tiempo entre la primera y segunda mitosis oscilando entre 9,6 y 13,8 horas, y el tiempo entre la segunda y tercera mitosis oscilando entre 0,3 y 1,0 horas. Sin embargo, en 7 de los embriones se observó un fenotipo de citocinesis único que se caracterizaba por la aparición simultánea de 3 surcos de escisión, una citocinesis ligeramente prolongada y, finalmente, la separación en tres células hijas (Fig. 4). Estos embriones tenían una duración de la citocinesis que oscilaba entre 15 y 70 minutos (caracterizada como el tiempo entre el inicio de los surcos de escisión hasta la separación

completa en 3 células hijas), el tiempo entre primera y segunda mitosis (3 células a 4 células) oscilando entre 8,7 y 12,7 horas, y el tiempo entre la segunda y tercera mitosis (4 células a 5 células) oscilando entre 0,3 y 2,6 horas. Esta observación, junto con la amplia gama de fenotipos de citocinesis mostrada por los embriones anormales, sugiere que nuestros embriones crioconservados no sufren un retraso en el desarrollo por el proceso de crioconservación y se comportan de manera similar a los cigotos frescos que escindirán dando 2 blastómeros.

Se podían predecir los embriones que alcanzaban el estadio de blastocisto, con sensibilidad y especificidad del 94% y 93% respectivamente, por tener una primera citocinesis de entre 0 y 33 minutos, un tiempo entre la primera y segunda mitosis de entre 7,8 y 14,3 horas, y un tiempo entre la segunda y tercera mitosis de entre 0 y 5,8 horas (Fig. 6). Por el contrario, los embriones que presentaban valores más allá de una o más de estas ventanas estaba predicho que se detenían. Todos los embriones normales que se desarrollaban con éxito dando un blastocisto mostraron valores similares en los tres parámetros. En contraste, los embriones anormales exhibieron una elevada cantidad de variabilidad en la longitud de los tiempos que tomaron para completar los intervalos (Fig. 6). Se observó que (1) un período de tiempo más largo para completar la primera citocinesis de lo normal indica potencial de desarrollo deficiente, (2) un intervalo más largo o más corto entre la primera y la segunda divisiones celulares de lo normal indica potencial de desarrollo deficiente, y (3) un intervalo más largo entre la segunda y la tercera divisiones celulares de lo normal indica potencial de desarrollo deficiente. Por lo tanto, estos parámetros son predictivos de la capacidad del embrión para proceder a la formación de blastocisto y la calidad del blastocisto.

Finalmente, se observó que si bien cada parámetro era predictivo del potencial de desarrollo embrionario de forma autónoma, el uso de la totalidad de los tres parámetros proporcionaba una sensibilidad y especificidad que excedían ambas del 90%, con un punto de corte de 3 veces las desviaciones estándar. La curva de característica operativa del receptor (ROC) para estos parámetros se muestra en la Fig. 7. La curva en este gráfico muestra la tasa de verdaderos positivos (sensibilidad) frente a la tasa de falsos positivos (1 - especificidad) para distintos puntos de corte de desviación estándar. Para llegar a este ROC, se utilizaron los siguientes números: número de verdaderos positivos = 34 (correctamente predicho que llegan a blastocisto); número de verdaderos negativos = 54 (correctamente predicho que se detenían), número de falsos positivos = 4 (incorrectamente predicho que llegan a blastocisto); número de falsos negativos = 2 (incorrectamente predicho que se detenían).

Discusión

Nuestro análisis indica que los embriones que siguen una cadencia estricta en la mitosis y la citocinesis durante las tres primeras divisiones de escisión es mucho más probable tanto que se desarrollen hasta llegar al estadio de blastocisto como que formen un blastocisto de alta calidad con una masa celular interna expandida (ICM). Los parámetros morfológicos dinámicos se pueden utilizar para seleccionar los embriones óptimos para ser transferidos o para la crioconservación durante un procedimiento de FIV. Estos parámetros también se pueden utilizar para distinguir entre diferentes calidades de blastocisto, lo que permite una clasificación de los potenciales relativos de desarrollo de los embriones dentro de un grupo. La práctica habitual en las clínicas de FIV es la transferencia en el estadio de 8 células (día 3). Algunas clínicas eligen cultivar los embriones hasta el estadio de blastocisto (día 5), ya que la transferencia de blastocistos tiene hasta el doble de tasas de implantación en comparación con la transferencia en el día 3. Sin embargo, muchas clínicas evitan el cultivo prolongado debido al mayor riesgo de trastornos epigenéticos. Los parámetros predictivos relacionados con la obtención de imágenes se pueden utilizar para predecir la viabilidad de embriones hacia el estadio de 4 células (en el día 2) y previamente a la activación de genes embrionarios. Esto puede permitir la transferencia o la crioconservación de embriones un día completo antes de lo que normalmente se hace en la práctica y antes de que los embriones experimenten cambios significativos en sus programas moleculares. Esto también puede permitir que los embriones más óptimos sean seleccionados para DGP u otros tipos de análisis.

Ejemplo comparativo 2

La validación de los parámetros de obtención de imágenes a través del análisis de la expresión génica, y la utilización del análisis de la expresión génica para determinar el potencial de desarrollo.

Métodos

Embriones humanos de 1 célula congelados, a los que también se hace referencia como cigotos, se descongelaron y se colocaron en cultivo y se cultivaron bajo condiciones tales como las que se usan en los procedimientos de FIV. Para algunos experimentos, los embriones fueron colocados en una placa de cultivo estándar. Para otros experimentos, los embriones se cultivaron en una placa de cultivo personalizada con micropocillos de calidad óptica.

Los embriones fueron retirados del cultivo y el sistema de imágenes y se recogieron o como embriones individuales o células individuales (blastómeros) para el análisis de la expresión génica. Cada placa contenía típicamente una mezcla de embriones, algunos alcanzando el estadio de desarrollo esperado en el momento de la recogida, y otros, deteniéndose en los primeros estadios de desarrollo o fragmentándose ampliamente. Aquellos que alcanzaron el estadio de desarrollo esperado en el momento de la recogida fueron clasificados como "normales", mientras que aquellos que se detuvieron se consideraron "anormales". Por ejemplo, cuando una placa de embriones se separó

de la estación de obtención de imágenes al final del día 2 para recoger muestras, cualquier embrión que había alcanzado el estadio de 4 células y pasado más allá se identificó como normal, mientras que aquellos que no habían llegado a alcanzar la etapa de 4 células eran etiquetados como detenidos. Estos embriones detenidos fueron clasificados según el estadio de desarrollo en el cual se llegaron a detener, de tal manera que un embrión con sólo 2 blastómeros al final del día 2 se analizaba como un embrión de 2 células detenido. Se tuvo cuidado de excluir a los embriones que morfológicamente parecían estar muertos y porosos en el momento de la recogida de muestras (por ejemplo, blastómeros degenerados). Sólo los embriones que aparecieron vivos (tanto normales como detenidos) fueron utilizados para el análisis de expresión génica. Sin embargo, es posible que los embriones que aparecieron normales durante el momento de la recogida en última instancia pudieran detenerse si se les permitiera crecer hasta un estadio posterior. El análisis de la expresión génica de embriones representativos de cada una de estas clases se realizó mediante RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR). Aproximadamente a intervalos de 24 horas, se recogieron embriones de los sistemas de obtención de imágenes individuales para el análisis por qRT-PCR de alto rendimiento de la expresión génica con reacciones multiplex de hasta 96 genes ensayados frente a 96 muestras. El análisis de la expresión génica se realizó con el sistema Fluidigm Biomark, que puede llevar a cabo hasta 9216 reacciones simultáneas de qRT-PCR basadas en el ensayo TaqMan en cantidades de nanolitros.

Resultados

Con el fin de dilucidar los mecanismos moleculares que subyacen bajo los eventos morfológicos, se realizó un perfil de correlación de la expresión génica. Los niveles de expresión de 96 genes diferentes que pertenecen a diferentes categorías fueron analizados por cada muestra, incluyendo genes constitutivos, marcadores de células germinales, factores maternos, marcadores de EGA, marcadores de trofoblasto, marcadores de masa celular interna, marcadores de pluripotencia, reguladores epigenéticos, factores de transcripción, receptores hormonales y otros, (Tabla 1, en la Figura 19). Dos conjuntos ligeramente diferentes, pero solapantes, de genes se ensayaron en dos conjuntos experimentales diferentes, proporcionando un conjunto único de genes de diagnóstico del destino de un embrión humano. Los conjuntos únicos de genes fueron compilados a partir de datos sobre la expresión génica en embriones de organismos modelo, o en células madre embrionarias humanas, así como de nuestros propios datos de micromatrices (microarrays) no publicados. En este estudio se revela por primera vez el estado de expresión de estos conjuntos de genes en embriones humanos preimplantacional.

El valor de la expresión de cada gen en relación con los genes de referencia GAPDH y RPLPO, así como en relación con el promedio de los genes, se calculó utilizando los métodos geNorm (El -Toukhy T, et al., (2009) Hum Reprod) y AACT (Vanneste E et al., (2009) Nat Med 15:577 -. 83). El valor de la estabilidad génica y el coeficiente de variación fueron de 1,18 y el 46% para GAPDH y 1,18 y 34% para RPLPO, los más estables entre los 10 genes constitutivos que hemos probado, y bien dentro del intervalo de un conjunto típico de muestras heterogéneas. En blastómeros individuales, como se esperaba, la cantidad de transcritos de RPLPO y GAPDH disminuyó aproximadamente 1 valor de Ct valor por división entre el estadio de 1 célula y el estadio de 8 células, debido al efecto de reducción a la mitad de la división de escisión, así como la falta de EGA durante los primeros 3 días de desarrollo humano. El nivel de expresión de estos genes de referencia en blastómeros independientes, se mantuvo estable entre el estadio de 8 células a mórula. A nivel del embrión completo, los valores de Ct de ambos RPLPO y GAPDH se mantuvieron casi constantes durante todo el desarrollo hasta el estadio de mórula. El nivel de expresión de GAPDH y RPLPO aumentó significativamente en los blastocistos, muy probablemente debido al aumento del número de blastómeros presentes. Estas variaciones no afectaron a la validez de RPLPO y GAPDH como genes de referencia. La mayor parte del análisis de la expresión génica llevado a cabo en este estudio se enfocó en los estadios de desarrollo anteriores a la etapa de mórula, cuando el nivel de expresión de los genes de referencia era extremadamente estable.

Expresión diferencial de genes entre embriones normales y anormales. La Fig. 8 muestra el nivel promedio de expresión de 52 genes de 6 embriones anormales de 1 a 2 células y 5 embriones normales de 1 a 2 células trazados en un gráfico de radar a escala logarítmica. Los embriones detenidos en general mostraron menor cantidad de ARNm en comparación con los embriones normales, siendo los genes que facilitan la citocinesis, el procesamiento del ARN y la biogénesis de miARN los más gravemente afectados. Los genes marcados con un asterisco indican una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre embriones normales y anormales según lo determinado por la prueba de Mann-Whitney. Estos 18 genes son Coffillin, DIAPH1, ECT2, MYLC2, DGCR8, Dicer, TARBP2, CPEB1, Symplekin, YBX2, ZAR1, CTNNB1, DNMT3B, TERT, YY1, IFGR2, BTF3 y NELF. Cada gen pertenece a un grupo como se indica en la Figura, es decir, Citocinesis: Coffillin, DIAPH1, ECT2 y MYCL2; biogénesis de miARN: DGCR8, Dicer y TARBP2; procesamiento del ARN: YBX2; factores maternos: ZAR1; genes constitutivos: CTNNB1; pluripotencia: DNMT3B, TERT y YY1; receptor: IGFR2, y factor de transcripción: BTF3 y NELF. En la mayoría de los casos, la expresión de estos genes era más alta en embriones normales de 1 y 2 células que en embriones detenidos de 1 y 2 células.

Curiosamente, algunas categorías de genes se vieron afectadas más en los embriones anormales que otras. Por ejemplo, en los embriones anormales, la mayoría de los genes constitutivos, los receptores de hormonas y factores maternos no se alteraron sensiblemente en la expresión génica, mientras que muchos genes implicados en la citocinesis y la biogénesis de miARN mostraron una expresión significativamente reducida. Por otra parte, entre los genes que se vieron afectados, algunos genes mostraron una diferencia mucho mayor entre los embriones normales y anormales que otros. Por ejemplo, los genes involucrados en la vía de la biogénesis de miARN, como

DGCR8, Dicer y TARBP2, mostraron niveles de expresión muy reducidos en los embriones anormales. Notablemente, CPEB1 y Symplekin, dos de los genes más gravemente afectados, pertenecían al mismo mecanismo molecular que regula el almacenamiento y reactivación de ARNm materno mediante la manipulación de la longitud de una cola de poli(A) del transcrito (Bettegowda, A. et al., (2007) Front. Biosci. 12:3713-3726). Estos datos sugieren que la anomalía de los embriones se correlaciona con defectos en el programa de regulación del ARNm del embrión.

Correlación de la citocinesis, con perfiles de expresión génica. El análisis de la expresión génica se realizó con genes que codifican componentes clave de la citocinesis. La identidad de cada embrión fue seguida mediante la instalación de una cámara en el microscopio estereoscópico y grabación en vídeo del proceso de transferencia de la muestra durante el cambio de los medios y la recogida de muestras. Al evaluar los perfiles de expresión génica de embriones anormales, se observó una fuerte correlación entre la citocinesis aberrante y menor nivel de expresión génica en componentes clave de la citocinesis. Curiosamente, los perfiles de expresión génica de embriones anormales eran tan diversos y variables como sus fenotipos morfológicos aberrantes.

Se descubrió que la expresión de genes de citocinesis variaba entre embriones normales de 2 células y embriones anormales de 2 células (Fig. 9) y entre embriones normales y anormales de 4 células (Fig. 10). Las Figs. 9 y 10 muestran las expresiones relativas de genes que están más altamente expresados en embriones normales de dos células humanas (Fig. 9) y embriones normales de 4 células (Fig. 10), correlacionados con fenotipos de diferentes citocinesis. Como se representa en la Fig. 9, un embrión detenido de 2 células que muestra ondulación de membrana anormal durante la primera citocinesis tenía niveles de expresión significativamente reducidos de todos los genes reguladores de citocinesis probados. Los genes que muestran diferencias en la Fig. 9 son anillin, cofilin, DIAPH1, DIAPH2, DNM2, ECT2, MKLP2, MYCL2 y RhoA. Los niveles de expresión normales se expresan en las barras de la derecha y se puede ver que son más elevados en cada gen. En las fotografías por encima de las gráficas de la Figura 9, que muestran embriones anormales de dos células, la barra de escala representa 50 µm. La Fig. 10 muestra los resultados de un embrión de cuatro células detenido que experimentó una citocinesis aberrante con un surco de citocinesis de un solo lado y una citocinesis extremadamente prolongada durante la primera división, mostró una disminución de la expresión en los reguladores de citocinesis Anillin y ECT2. La barra de escala en la Fig. 10 también representa 50 µm.

Patrones de expresión génica específicos de estadio embrionario. La Figura 11 muestra cuatro patrones específicos de estadio embrionario (ESSPs) que fueron identificados durante el análisis de expresión génica de 141 embriones individuales y blastómeros independientes que se habían desarrollado con normalidad. Los genes incluidos en cada uno de los cuatro ESSPs se enumeran en la Tabla 2 (Fig. 20). Los trazos en la Figura. 11 fueron creados por la agrupación de los genes sobre la base de patrones de expresión similares y realizando un promedio de sus valores de expresión (en relación con los genes de referencia). El nivel relativo de expresión de un ESSP se calculó promediando los niveles de expresión de genes con un patrón de expresión similar. Los niveles de expresión génica se representan frente a diferentes estadios celulares, es decir, 1c = una célula, M = mórula, B = blastocisto. En la Fig. 11, se muestra la expresión relativa de genes de cada uno de los cuatro ESSPs como función del desarrollo, desde 1 célula (1c) hasta mórula y blastocisto. El ESSP1 muestra herencia materna, el ESSP2 muestra la activación de la transcripción de genes, el ESSP3 muestra la activación en estadios tardíos, y el ESSP4 muestra transcritos persistentes. Como se indica en el ESSP2, el punto típico de transferencia en una clínica de FIV se produce en el día 3, cuando los embriones están experimentando importantes cambios en el desarrollo debido a la activación de los genes embrionarios. Los datos de las imágenes de lapso de tiempo indican que el potencial de desarrollo de un embrión puede ser identificado mediante el estadio de 4 células, permitiendo con ello la transferencia más temprana de embriones en el día 2 y previamente a esta activación de genes. Esta transferencia temprana es útil para mejorar la tasa de éxito de los procedimientos de FIV.

En la Tabla 2 (Fig. 20) se enumeran los genes que pertenecen a cada una de los cuatro ESSPs identificados. El nivel relativo de la expresión génica de cada gen se calculó con respecto a los genes de referencia (GAPDH y RPLPO) y con relación al promedio de los genes. El patrón de expresión de cada gen frente a la línea de tiempo del desarrollo embrionario siguió uno de los cuatro ESSPs siguientes: patrón ESSP (1) estadio temprano: genes que comienzan con valores elevados, se degradan lentamente, y dejan de expresarse antes del estadio de blastocisto; patrón ESSP (2) estadio intermedio: genes que se activan después del estadio de 4 células; patrón ESSP (3) etapa final: genes que se activan en la mórula o el blastocisto; y patrón ESSP (4) Constante: genes que tienen valores de expresión relativamente constantes.

ESSP1 describe el patrón de genes heredados por vía materna. Estos transcritos comenzaron con un alto nivel de expresión en el estadio de cigoto y posteriormente declinaron al irse desarrollando los embriones dando lugar a blastocistos. La semivida de estos transcritos era aproximadamente 21 horas. Los factores maternos clásicos de otros organismos modelo, tales como GDF9 y ZAR1, así como los genes específicos de células germinales (ovocito) VASA y DAZL quedaron incluidos en esta categoría. ESSP2 incluye los genes embrionarios activados, los cuales fueron transcritos por primera vez en los embriones después del estadio de 4 células. Algunos genes de esta categoría parecieron mostrar dos ondas de activación, la primera y más pequeña en el estadio de 5 a 6 células, y la segunda y más grande en el estadio de 8 células. Genes de EGA conocidos de otros organismos modelo, como EIF1AX31 y JARID1 B32, quedaron incluidos en esta categoría. ESSP3 se compone de genes activados de forma tardía que no se manifestaron hasta el estadio de blastocisto, incluido el marcador de

trofoblastos GCM1. ESSP4 contiene transcritos persistentes que mantienen la expresión estable en relación con los genes de referencia a lo largo del desarrollo. La semivida de estos genes era 193 horas, aproximadamente 9 veces más larga que ESSP1. Esta categoría incluye una mezcla de genes constitutivos, factores de transcripción, reguladores epigenéticos, receptores hormonales y otros. Estos 4 patrones de expresión génica se confirmaron en otro grupo de experimentos usando 61 muestras de embriones normales y blastómeros individuales.

Los embriones anormales que exhibían un comportamiento aberrante citocinético y mitótico durante las primeras divisiones, se correlacionaron con perfiles de expresión génica altamente erráticos, sobre todo en los genes implicados en el manejo de ARN embrionario. Así, uno puede combinar estas metodologías para proporcionar métodos que pueden usarse para predecir la viabilidad de los embriones preimplantacionales. Los resultados sugieren que los embriones anormales comienzan la vida con programas defectuosos en el procesamiento del ARN y la biogénesis de miARN, causando una degradación excesiva del ARNm materno. La naturaleza estocástica de tal degradación no regulada de ARN conduce a la destrucción al azar de transcritos, causando la gran variedad de fenotipos aberrantes observados en embriones anormales. La disminución del nivel de miARNs causa defectos en la degradación regulada del ARN materno, lo que lleva a la detención del desarrollo en diferentes estadios.

Análisis de blastómeros individuales. A fin de evaluar cuándo se inició la diferenciación molecular en los embriones humanos preimplantacionales, se analizó el nivel de expresión de CDX2 en blastómeros independientes, recogidos a partir de 17 embriones en diferentes estadios de desarrollo. La Fig. 12A muestra el nivel relativo de expresión de dos genes, CTBBN1 (barras oscuras) y CDX2 (barras claras) como una función del estadio de desarrollo, desde 2 células a blastocisto. Como puede verse, CDX2 se expresó de forma esporádica en niveles bajos en algunos blastómeros individuales de embriones previos al estadio de 4 células (Fig. 12A). Sin embargo, a partir del estadio de 6 células en adelante, cada embrión contenía por lo menos 1 blastómero que expresaba CDX2 a un nivel significativo. El nivel de expresión del gen constitutivo CTNNB1 también mostrado en la Fig. 12A permaneció constante entre los blastómeros del mismo embrión, lo que indica que el patrón de expresión heterogéneo de CDX2 no era un artefacto de qPCR. Los datos de un experimento independiente demostraron observaciones similares. Estos resultados indican que la diferenciación molecular en embriones humanos preimplantacionales podría ocurrir ya inmediatamente después del estadio de 4 células.

Curiosamente, la inspección de los perfiles de expresión génica en blastómeros independientes, reveló embriones que contenían blastómeros con huellas de expresión génica que corresponden a diferentes edades de desarrollo. El perfil de expresión génica de un embrión dado en cualquier momento dado es igual a la suma de la degradación del ARNm materno y la EGA. Un blastómero joven de edad de desarrollo temprana por lo general contiene una gran cantidad de transcritos maternos y una baja cantidad de genes cigóticos, y lo opuesto es cierto para un blastómero más viejo en una edad de desarrollo más avanzado. En este experimento, el programa material se definió como los valores promedio de expresión de 10 marcadores de ESSP1 (transcritos maternos), y el programa embrionario por los valores promedio de expresión de 10 marcadores de ESSP2 (transcritos embrionarios). El panel de transcritos maternos usado incluye DAZL, GDF3, IFITM1, STELLAR, SYCP3, VASA, GDF9, PDCD5, ZAR1 y ZP1, mientras el panel de genes embrionarios incluye ATF7IP, CCNA1, EIF1 AX, EIF4A3, H2AFZ, HSP70.1, JARID1 B, LSM3, PABPC1, y SERTAD1. Entre los 6 blastómeros recogidos con éxito de este embrión de 8 células en particular, 3 blastómeros mostraron una huella de expresión génica similar a la de los blastómeros de una muestra de un embrión normal de 3 células, mientras que los otros 3 blastómeros eran similares a los blastómeros de una muestra de un embrión normal de 8 células (Fig. 12B). La explicación más probable de esta observación es la detención de una subpoblación de células en el embrión. Este fenotipo de detención parcial también se observó en otro embrión de 9 células y 2 mórulas entre las muestras analizadas. El hecho de que el nivel de transcritos maternos se mantuviera alto en los blastómeros detenidos, que habían pasado la misma cantidad de tiempo en cultivo que sus células hermanas normales, indica que la degradación de ARN materno no es un proceso espontáneo que simplemente se produce a través del tiempo sino que lo más probable es que requiera el funcionamiento de los mecanismos específicos de degradación del ARN, como los microARNs (miARNs). Estos datos también proporcionan una prueba más de que la degradación del ARNm materno es un evento conservado en el desarrollo de mamíferos durante la embriogénesis y es necesario para el desarrollo normal del embrión (Bettegowda, A., et al., (2008) *Reprod. Fertil. Dev.* 20:45-53). Además, estos datos sugieren que blastómeros individuales en un embrión son autónomos y pueden desarrollarse independientemente uno del otro. Además, estos resultados indican que se pueden utilizar las pruebas de nivel de expresión génica que se describen en la presente memoria para un comprobar el nivel de un ARNm (lo cual es indicativo del nivel de expresión génica) en una célula a ensayar, donde el ARN es de un gen conocido por ser parte del programa materno, y la persistencia de tal nivel de expresión en una estadio más tardío del desarrollo embrionario se correlaciona con una probabilidad de resultado anormal, o parte del programa embrionario, donde la ausencia en el tiempo es indicativa de una probabilidad de un resultado anormal. Los genes del programa materno examinados aquí son ZAR1, PDCD5, NLRP5, H5F1, GDF9 y BNC2. Se conocen otros genes de efecto materno y pueden ser utilizados.

Activación de genes embrionarios. Los presentes métodos están basados al menos en parte en los hallazgos de que los embriones anormales, detenidos en su desarrollo con frecuencia exhiben cadencias aberrantes de citocinesis y mitosis durante las primeras tres divisiones antes de que se produzca la EGA (activación de genes embrionarios). Esto sugiere que el destino del desarrollo de un embrión está determinado en gran medida por la herencia materna, un hallazgo en sorprendente concordancia con un modelo matemático de desarrollo humano

preimplantacional realizada por Hardy et al., En 2001³⁴. Por otra parte, las anomalías de la mitosis y la citocinesis están fuertemente correlacionadas con la disminución de los niveles de transcritos maternos en los genes que regulan la biogénesis de miARN y el enmascaramiento, almacenamiento y reactivación de ARNm materno. Los miARNs regulan la traducción promoviendo la degradación del ARNm en diversos procesos biológicos, incluyendo el desarrollo del organismo y su diferenciación (Blakaj, A. & Lin, H. (2008) J. Biol. Chem. 283:9505-9508; Stefani, G. & Slack, F. J. (2008) Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 9:219-230). Cada vez más pruebas de los organismos modelo muestran que los miARNs pueden ser los reguladores clave de la degradación de transcritos maternos en embriones tempranos (Bettgowda, A., et al., (2008) Reprod. Fertil. Dev.. 20:45-53). Por lo tanto, los defectos en la biogénesis de miARN es probable que conduzcan al desarrollo anormal del embrión. Por otro lado, la falta de manejo adecuado de los ARNm maternos también puede conducir a una embriogénesis pobre. Los ovocitos de mamíferos sintetizan una gran combinación de transcritos de ARN materno necesarios para dar soporte al crecimiento temprano del embrión antes de nacer de la madre. Estos transcritos son reprimidos y almacenados durante un período prolongado de tiempo, hasta que se reactivan después de la fecundación. Los defectos en este programa de gestión del ARN materno probablemente afectarán a la cantidad y la calidad de los transcritos materno y por lo tanto pondrán en peligro la posibilidad de un desarrollo exitoso.

Modelo para evaluar la viabilidad de los embriones. La Fig. 13 muestra un modelo del desarrollo embrionario humano basado en correlación de imágenes y análisis molecular. Se muestra la línea de tiempo del desarrollo desde el cigoto hasta blastocisto incluyendo breves momentos críticos para la predicción del desarrollo exitoso hasta blastocisto y un esquema del desarrollo embrionario. Los datos moleculares clave, tal como se indica en el esquema, indican que los embriones humanos comienzan la vida con un conjunto distinguible de ARNs del ovocito que se heredan de la madre. Este conjunto de ARNs se mantiene y se empaqueta adecuadamente mediante programas específicos de gestión de ARN en el huevo. Después de la fecundación, la degradación de un subconjunto de los ARNs maternos específicos del huevo (ESSP1; patrón específico de estadio embrionario 1) deben ser degradados al comenzar la transición de ovocitos a embrión. Al mismo tiempo, otros ARNs se dividen idealmente por igual entre cada blastómero según continúa el desarrollo (ESSP4). La degradación y compartimentación exitosas de los ARNs culmina con la activación del genoma embrionario (EGA) y la transcripción de los genes de ESSP2 de manera autónoma en cada célula. Cabe destacar que, durante las divisiones de escisión, los blastómeros embrionarios pueden detenerse o progresar de forma independiente. El resultado del desarrollo autónomo de las células en el embrión es que los blastómeros individuales pueden detenerse o progresar y según progresa el embrión de 8 células al estadio de mórula y más allá, la calidad del blastocisto se verá afectada por el número de células que se detengan o progresen más allá de 8 células. Los datos de las imágenes demuestran que existen períodos críticos del desarrollo que predicen el éxito o el fracaso: la primera citocinesis, la segunda división de escisión y la sincronía de las divisiones segunda y tercera. Estos parámetros se pueden medir automáticamente utilizando los algoritmos de seguimiento de células y el software descritos anteriormente. Los sistemas y métodos descritos se pueden utilizar para diagnosticar el resultado de los embriones con predictores de imagen clave y pueden permitir la transferencia de menos embriones en etapas más tempranas del desarrollo (antes de la EGA).

Ejemplo 3

Obtención de imágenes de maduración de los ovocitos y el desarrollo posterior del embrión.

Resultados

Una de las principales limitaciones de los actuales procedimientos de FIV es la calidad y la disponibilidad del ovocito. Por ejemplo, los actuales protocolos de FIV ovocitos reclutan los ovocitos desde el pequeño conjunto del ciclo, proporcionando un pequeño número de ovocitos (por ejemplo 1-20) para la fecundación. Por otra parte, aproximadamente el 20% de los ovocitos recuperados después de la estimulación hormonal durante los procedimientos de FIV se clasifican como inmaduros, y normalmente se descartan debido a un potencial reducido para el desarrollo embrionario bajo las condiciones de cultivo actuales.

Un método para aumentar el conjunto de ovocitos es a través de la maduración in vitro. La Fig. 14 muestra tres estadios de desarrollo durante la maduración in vitro, incluyendo vesícula germinal, metafase I y metafase II. Los estadios de vesícula germinal y metafase I se clasifican como ovocitos inmaduros, mientras que la metafase II se clasifica como madura debido a la presencia del primer cuerpo polar, que se produce a las 24-48 horas después de iniciarse la maduración in vitro. La Fig. 15 muestra el desarrollo embrionario de un óvulo que ha sido madurado in vitro.

Otro método para aumentar el conjunto de los ovocitos es reclutar a los ovocitos del conjunto primario y secundario, que proporciona hasta varios miles de ovocitos. En este procedimiento, los folículos inactivos son reclutados en el ovario y son programados in vitro para producir ovocitos con la composición de cromosomas, el estado epigenético, la expresión del ARN, y la morfología normales. En otros aspectos, los ovocitos se pueden derivar de células madre pluripotentes diferenciadas in vitro hasta dar células germinales y maduras hasta convertirse en óvulos humanos.

Como se ilustra en la Fig. 14, el proceso de maduración de un ovocito in vitro se caracteriza por varios cambios

celulares que pueden ser utilizados para definir parámetros celulares para su medida y análisis en los métodos de la presente invención. Estos incluyen, por ejemplo, los cambios en la morfología de la membrana del ovocito, por ejemplo la velocidad y extensión de separación de la zona pelúcida, los cambios en la morfología del núcleo del ovocito, por ejemplo el inicio, compleción, y la tasa de ruptura de vesículas germinales (GVBD), la velocidad y la dirección del movimiento de los gránulos en el citoplasma y núcleo, y el movimiento de y la extrusión del primer cuerpo polar.

Ejemplo 4

Obtención de imágenes de diferenciación de células madre.

Resultados

- 10 El análisis de imágenes de lapso de tiempo también se puede utilizar para evaluar la viabilidad, el potencial de desarrollo, y el resultado de otros tipos de células, tales como células madre, células madre pluripotentes inducidas (iPSCs), y células madre embrionarias humanas (hESCs). El potencial de desarrollo de las células madre puede evaluarse mediante el uso de análisis de imágenes de lapso de tiempo para medir los cambios en la morfología durante el desarrollo y la diferenciación celular (Fig. 17). Las células diferenciadas pueden entonces ser analizadas y seleccionadas para el trasplante in vivo u otro uso. Varios parámetros de las células madre pueden ser extraídos y analizados a partir de datos de imágenes de lapso de tiempo, tales como la duración de la citocinesis, el tiempo entre los eventos de mitosis, tamaño y forma celular, número de células, movimiento de las células, patrones de división, diferenciación, división asimétrica (donde una célula hija mantiene una célula madre, mientras que la otra se diferencia), división simétrica (donde ambas células hijas o bien permanecen como células madre o bien se diferencian), y la especificación del destino (para determinar con precisión cuándo una célula madre se diferencia).

- 25 La fórmula básica de la terapia de células madre es que las células madre no diferenciadas pueden ser cultivadas in vitro, diferenciarse en tipos de células específicos, y posteriormente ser trasplantadas a los receptores para la regeneración de tejidos dañados y/u órganos. El análisis de imágenes de lapso de tiempo se puede utilizar como un dispositivo de alto rendimiento no invasivo para identificar las células madre que forman una progenie no tumorigénica diferenciada capaz de integración en tejidos maduros. Las aplicaciones potenciales incluyen el tratamiento de trastornos neurológicos como el Alzheimer y el Parkinson, trastornos del sistema vascular y las enfermedades del corazón, trastornos musculares y óseos, tales como artritis, enfermedades autoinmunes y el cáncer, así como el descubrimiento de fármacos mediante la evaluación de dianas y nuevos productos terapéuticos.

- 30 En los humanos, los tejidos dañados son generalmente reemplazados mediante el reclutamiento continuo y la diferenciación de las células madre en el cuerpo. Sin embargo, la capacidad del cuerpo para la regeneración se reduce con el envejecimiento. Un ejemplo de esto es la incontinencia urinaria que resulta de la deficiencia del esfínter. El envejecimiento se cree que es una de las principales causas de la deficiencia del esfínter porque el número de fibras musculares y la densidad de los nervios disminuyen con la edad. Con el fin de tratar a los pacientes con incontinencia, se pueden derivar iPSCs de fibroblastos cultivados de tejidos de la pared vaginal con el fin de producir células musculares lisas diferenciadas. Estas células diferenciadas pueden entonces ser trasplantadas in vivo. Antes del trasplante, se puede utilizar análisis de imagen de lapso de tiempo para caracterizar las iPSCs con respecto a la pluripotencia, diferenciación, metilación, y tumorigenicidad. Otras aplicaciones incluyen la obtención de imágenes de iPSCs que se derivan de células de la piel de los pacientes con Parkinson y se diferencian en neuronas para trasplante (Fig. 18).

Ejemplo 5

Validación de los parámetros de imagen a través del análisis automatizado

- 45 Como lo demuestran los datos de las imágenes de lapso de tiempo, el desarrollo embrionario humano es un proceso altamente variable entre los embriones dentro de una cohorte y los embriones pueden exhibir una amplia gama de comportamientos durante la división celular. Por lo tanto, la caracterización manual de ciertos eventos de desarrollo tales como la duración de la citocinesis altamente anormal (Fig. 4) puede estar sujeta a interpretación. Para validar nuestros parámetros de imagen y la capacidad para predecir de forma sistemática la formación de blastocistos, hemos desarrollado un algoritmo para el seguimiento automatizado de las divisiones celulares hasta la etapa de 4 células. Nuestro algoritmo de seguimiento emplea una técnica de estimación del modelo probabilístico basado en métodos secuenciales de Monte Carlo. Esta técnica funciona mediante la generación de distribuciones de modelos hipotéticos de embriones, la simulación de imágenes basadas en un modelo de óptica simple, y la comparación de las simulaciones con los datos de las imágenes observadas (Fig. 21a).

- 55 Los embriones se modelan como un conjunto de elipses con posición, orientación, e índice de superposición (para representar las alturas relativas de las células). Con estos modelos, se puede extraer la duración de la citocinesis y el tiempo entre la mitosis. La citocinesis se define típicamente por la primera aparición del surco de citocinesis (donde se forman indentaciones bipolares a lo largo del eje de escisión) hasta la separación completa de las células hijas. Hemos simplificado el problema mediante la aproximación de la citocinesis como la duración del alargamiento de las células antes de la división de 1 célula a 2 células. Una célula se considera alargada si la

diferencia de las longitudes de los ejes supera el 15% (elegido empíricamente). El tiempo entre la mitosis es sencillo de extraer contando el número de células en cada modelo.

Hemos probado nuestro algoritmo en un conjunto de 14 embriones humanos (Fig. 21b) y se compararon las medidas automatizadas con el análisis de imagen manual (Fig. 21c, Fig. 21d). En este conjunto de datos, 8 de los 14 embriones alcanzaron el estadio de blastocisto, con buena morfología (Fig. 21e arriba). Las medidas automatizadas fueron emparejadas con las medidas de manuales, y se predijo correctamente que la totalidad de los 8 embriones se desarrollaban hasta blastocistos. 2 de los 14 embriones se desarrollaron hasta blastocistos con morfología deficiente (mala calidad de la masa celular interna; Fig. 21e abajo). Para estos embriones, la evaluación manual indicó que 1 se desarrollaría hasta blastocisto y 1 se detendría, mientras que la evaluación automatizada predijo que ambos se detendrían. Por último, 4 de los 14 embriones se detuvieron con anterioridad al estadio de blastocisto, y se predijo correctamente todos que todos se iban a detener por ambos métodos.

Almacén del filtro de partículas

El filtro de partículas es una técnica de estimación de modelos basada en la simulación de Monte Carlo. Se utiliza para estimar modelos desconocidos u "ocultos" mediante la generación de distribuciones de modelos hipotéticos y la comparación de estos modelos con los datos que se observan. Su capacidad para adaptarse a la dinámica de los movimientos arbitrarios y las incertidumbres en las medidas hace que sea un candidato ideal para el seguimiento de las divisiones celulares.

El filtro de partículas rastrea la propagación de las tres variables principales a lo largo del tiempo: el estado x , el control u , y la medida z . La variable de estado x es un modelo del embrión que queremos estimar y se representa como una colección de elipses (para 2D) o elipsoides (para 3D). La variable de control u es una entrada que transforma la variable de estado y consiste en nuestro modelo de división y propagación de células. La variable de medida z es una observación del estado y consta de las imágenes adquiridas por el microscopio de lapso de tiempo. Estos parámetros se describen en mayor detalle en las siguientes secciones.

Una estimación del estado actual x en cada etapa de tiempo t se representa con una distribución de probabilidad posterior. Este posterior se refiere a menudo como la creencia y se define como la probabilidad condicional del estado actual x_t dadas todas las medidas de la imagen pasadas $z_{1:t}$ y controles pasadas $u_{1:t}$.

$$bel(x_t) = p(x_t | u_{1:t}, z_{1:t}).$$

El filtro de partículas aproxima el posterior con un conjunto de muestras ponderadas, o partículas, denominadas como:

$$x_t = x_t^{[1]}, x_t^{[2]}, \dots, x_t^{[M]},$$

donde M es el número de partículas. Los términos partículas y modelos embrionarios se utilizan indistintamente en la presente memoria. Por lo tanto, una sola partícula $x_t^{[m]}$ (donde $1 \leq m \leq M$) es una de las hipótesis del modelo embrionario en el tiempo t .

Después de la inicialización, el filtro de partículas aplica varias veces tres pasos. El primer paso es la predicción, donde se propaga cada partícula usando la entrada de control:

$$x_t^{[m]} \sim p(x_t | u_t, x_{t-1}^{[m]}).$$

La serie resultante de partículas es una aproximación de la probabilidad previa. La segunda etapa es actualización de las medidas, donde a cada partícula se le asigna una ponderación de su importancia que corresponde a la probabilidad de la medida actual:

$$w_t^{[m]} = p(z_t | x_t^{[m]}).$$

El conjunto de partículas ponderadas es una aproximación del posterior $bel(x_t)$.

Un componente clave del filtro de partículas entra en el tercer paso, donde el conjunto de partículas se remuestrea de acuerdo con sus ponderaciones. Este paso de remuestreo concentra la distribución de partículas en la región de máxima probabilidad.

Representación de células

Las células están representadas como elipses en el espacio 2D. Cada célula tiene un eje mayor, eje menor, y una posición con dos dimensiones en coordenadas cartesianas, dadas por la ecuación:

$$\frac{(x - x_0)^2}{a^2} + \frac{(y - y_0)^2}{b^2} = 1.$$

- 5 Cada elipse tiene también una dirección de rumbo θ (viraje), que permite que gire en el plano x-y. Puesto que las elipses casi siempre se superponen unas con otras, también hemos nombrado un índice de superposición h , que especifica el orden de superposición (o la altura relativa de las células). Los parámetros para cada modelo embrionario en el tiempo t , por lo tanto se expresan como:

$$\mathbf{x}_t^{[m]} = \begin{bmatrix} x_{0_1} & y_{0_1} & a_1 & b_1 & \theta_1 & h_1 \\ x_{0_2} & y_{0_2} & a_2 & b_2 & \theta_2 & h_2 \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ x_{0_N} & y_{0_N} & a_N & b_N & \theta_N & h_N \end{bmatrix},$$

- 10 donde N es el número de células en este modelo.

Perturbación y división de las células

El primer paso del filtro de partículas es la predicción, donde se propaga cada partícula usando la entrada de control. Para nuestra aplicación, hay dos tipos de comportamiento que se desea modelar. El primer tipo de comportamiento incluye el movimiento celular, que incluye la traslación, la rotación alrededor del ángulo de viraje, y cambios en la longitud de los ejes mayor y menor. El segundo tipo de comportamiento es la división celular, donde una célula se divide en dos células nuevas.

- 15 Para modelar el movimiento celular, nuestra entrada de control toma una partícula y al azar perturba cada valor para cada célula: x_{0i} , y_{0i} , a_i , b_i , θ_i . La perturbación se muestrea aleatoria desde una distribución normal con una varianza relativamente pequeña (usualmente fijada en el 5% de los valores inicializados).

- 20 Para modelar la división celular, se utiliza la siguiente aproximación. En un punto dado en el tiempo, para cada partícula, se asigna una probabilidad del 50% a que una de las células se va a dividir. Este valor fue elegido empíricamente, y abarca amplia gama de posibles divisiones celulares mientras se mantiene una buena cobertura de la configuración actual. Si se predice una división, a continuación, la célula que se divide es elegida al azar. Un modelo más sofisticado podría tener en cuenta factores adicionales, tales como el número de células en una partícula y de la historia de sus patrones de división, y potencialmente podría llegar a crear modelos basados en el comportamiento que se observa a partir de datos reales.

- 30 Cuando una célula se elige para dividirse, se aplica una división simétrica a lo largo del eje mayor de la elipse, produciendo dos células hijas de igual tamaño y forma. Cada valor de las células hijas es entonces perturbado al azar. La perturbación se muestrea de nuevo a partir de una distribución normal, pero con una varianza mayor (10% de los valores inicializados) para acomodar una gran variabilidad en las formas de células nuevas. Finalmente, los índices de superposición de las dos células hijas se seleccionan al azar, manteniendo su superposición colectiva con respecto al resto de las células.

Simulación de imágenes

- 35 Después de aplicar la entrada de control a cada partícula, la representación de partículas debe ser convertida en una imagen simulada que pueda ser comparada con las imágenes reales. Una simulación precisa de imágenes puede ser una tarea difícil, y a menudo requiere el uso de técnicas de trazado de rayos y modelos ópticos. En lugar de intentar simular imágenes realistas, el método de la presente invención se centra en la simulación de las características que son fácilmente identificables en las imágenes. Específicamente, se simulan las imágenes de las membranas celulares.

- 40 Hay dos observaciones físicas que deben ser tenidas en cuenta. En primer lugar, aunque el microscopio se centra en un solo plano a través del embrión, la profundidad de campo es bastante grande y se recoge luz fuera de foco

de casi todo el embrión. Y segundo, los embriones son parcialmente transparentes, lo que significa que las membranas de las células en la parte inferior del embrión a veces pueden (pero no siempre) ser vistas a través de las células de la parte superior del embrión.

- 5 Con estas observaciones físicas en mente, ahora se describe el modelo de simulación de imágenes. Para cada célula, su forma elíptica correspondiente se proyecta sobre la imagen simulada utilizando el índice de superposición h . Los valores de los píxeles correspondientes se establecen en un valor binario de 1 y se dilatan para crear un espesor de la membrana comparable a los datos de las imágenes que se observan. El índice de superposición h especifica el orden en el cual se encuentran las células unas sobre otras. Dado que las membranas celulares ocluidas son visibles solamente algunas veces, si se detectan puntos ocluidos, se colocan en la imagen simulada con baja probabilidad (típicamente alrededor del 10%). En la práctica, mientras que estos puntos de membrana ocluidos son necesarios para el modelado preciso de la forma, es importante hacerlos lo suficientemente escasos como para que no se parezcan a un borde visible.

Preprocesamiento de imágenes

- 15 La variable de medida z se describirá ahora. Un objetivo del método de la presente invención consiste en extraer imágenes binarias de las membranas celulares de las imágenes del microscopio para la comparación con las imágenes simuladas. Estas membranas exhiben gran curvatura y alto contraste, pero no es fácil extraerlas usando técnicas basadas en umbrales de intensidad o de color. Por consiguiente, se emplea un detector basado en las curvaturas principales. Este método utiliza el operador de Hesse:

$$\mathbf{H}(s, \sigma) = \begin{pmatrix} I_{xx}(s, \sigma) & I_{xy}(s, \sigma) \\ I_{xy}(s, \sigma) & I_{yy}(s, \sigma) \end{pmatrix},$$

- 20 donde I_{xx} , I_{xy} e I_{yy} , son derivadas parciales de segundo orden evaluadas en la localización de píxel s y a escala de Gauss σ . Los valores propios de la matriz Hessiana 2×2 proporcionan información acerca de las curvaturas principales, mientras que el signo de los valores propios distinguen "valles" de "crestas" 43. Para detectar los picos o crestas brillantes, la curvatura principal en cada píxel se calcula como

$$P(s) = |\min(\lambda_2, 0)|,$$

- 25 donde λ_2 es el valor propio mínimo. Para detectar las membranas de espesor variable, se aplica el operador de Hesse en un intervalo de escalas (es decir, $\sigma_{\min} \leq s \leq \sigma_{\max}$), y se extrae la curvatura máxima en toda esta gama. Finalmente, a la imagen hessiana se le asigna un umbral para crear una imagen binaria de las membranas celulares extraídas. El nivel de umbral se establece normalmente en dos veces la desviación estándar de los valores de píxeles en la matriz hessiana.

- 30 Ponderación de partículas

- Como se describe en la sección titulada "Armazón del filtro de partículas," el segundo paso principal del filtro de partículas es la actualización de las medidas, en donde a las partículas se les asigna una ponderación de su importancia que corresponde a la probabilidad de la medida actual dado un modelo particular. En nuestro caso, la ponderación de la importancia se determina comparando la imagen del microscopio preprocesada que se discutió anteriormente, con la imagen simulada que también se discutió anteriormente.

- Este problema ha sido investigado previamente, donde las ponderaciones del filtro de partículas se calcularon mediante la comparación de imágenes simuladas con imágenes reales utilizando información mutua normalizada. Este enfoque es similar a la idea de emparejamiento con la ocupación de rejillas, que busca ubicaciones de píxeles que están ambas ocupadas (valor 1) o ambas vacías (valor 0). Estos métodos pueden tener problemas cuando las imágenes simuladas y reales son similares en forma, pero están ligeramente desalineadas. En su lugar, el método que se describe utiliza una función de probabilidad basado en la distancia de chaffán, que mide el valor medio de las distancias más cercanas desde un conjunto de puntos a otro. Se definen dos conjuntos de puntos A (en el conjunto de números reales de tamaño m), y B (en el conjunto de números reales de tamaño n), correspondientes a los píxeles distintos de cero en la imagen simulada y la imagen real, respectivamente. La distancia de chaffán hacia adelante desde el conjunto de puntos A a B viene dada por:

$$d(A, B) = \frac{1}{m} \sum_{a_i \in A} \min_{b_j \in B} \|a_i - b_j\|.$$

La distancia de chaflán hacia atrás se define de manera similar. El presente método emplea la distancia de chaflán simétrico, que proporciona una medida de hasta qué punto la imagen simulada coincide con la imagen real, así como de hasta qué punto la imagen real coincide con la imagen simulada:

$$d_{sym}(A, B) = d(A, B) + d(B, A).$$

- 5 En la práctica, las medidas de distancias individuales se truncan para reducir la influencia del ruido. Para reducir el tiempo de cálculo, las distancias se determinan mediante la observación de ubicaciones de píxeles en las transformadas de distancia de las imágenes.

La distancia de chaflán se utiliza como una medida de probabilidad de nuestra medición de datos dado el modelo estimado. Es decir, en el tiempo t , para una medición de imagen dada z , y un modelo de partículas $x_t^{[m]}$, la ponderación de la importancia de la partícula viene dada por:

$$w_t^{[m]} \propto \exp[-\lambda \cdot d_{sym}(z_t, x_t^{[m]})].$$

La constante λ se fija normalmente en 1 y se puede variar para controlar la “planicidad” de la distribución de probabilidad.

Remuestreo de partículas y asignación dinámica

- 15 El tercer paso principal del filtro de partículas es el remuestreo, donde las partículas se seleccionan en proporción a su ponderación para crear un nuevo conjunto de partículas. Las partículas con baja probabilidad se descartan, mientras que las partículas con alta probabilidad se multiplican. Ha habido mucho trabajo previo en el desarrollo de algoritmos eficientes para el remuestreo. El presente método utiliza la aproximación de la varianza baja.

- 20 Una cuestión importante en los filtros de partículas es la elección del número de partículas. La opción más simple es utilizar un valor fijo, por ejemplo $M = 1000$. Entonces, para cada paso de tiempo, el conjunto de partículas M se transforma en otro conjunto del mismo tamaño. En el contexto de la aplicación, puede haber períodos relativamente largos de tiempo durante los cuales las células están inactivas o simplemente cambiando ligeramente el tamaño y la posición. Se aprovecha esta observación para reducir la carga de procesamiento asignando dinámicamente el número de partículas de acuerdo con la cantidad de actividad de las células. Es decir, cuando las células están activas y dividiéndose, se aumenta el número de partículas, y cuando las células están inactivas, se reduce el número de partículas.

- 30 Para medir el grado de actividad de las células, se calculan las diferencias de la suma de cuadrados (SSD) en las intensidades de píxeles entre la nueva imagen (adquirida por el microscopio) y la imagen anterior. Para reducir el ruido, las imágenes primero se suaviza con un filtro de Gauss, y el valor de SSD se suaviza a lo largo del tiempo con una media móvil de causalidad. El número de partículas se ajusta dinámicamente a continuación, en proporción a este valor y se trunca para que permanezca dentro de los límites $100 < M < 1000$. La Fig. 30 es un gráfico que muestra cómo podría asignarse el número de partículas a un embrión en división desde el estadio de 1 célula al de 4 células. Cabe señalar que este método sólo proporciona una medida de la cantidad de “actividad” en la imagen, pero no distingue entre la división celular y el movimiento de embriones (traslación y/o rotación) porque no se realizó un registro de imagen previo. En esta situación (determinación del número de partículas) esto es aceptable ya que el número de partículas debería aumentar en uno u otro caso. En la práctica, también se ajusta el número de partículas basándose en el número de células en el modelo embrionario más probable. Es decir, se generan más partículas cuando se cree que están presentes más células en las imágenes.

Limitaciones del seguimiento en dos dimensiones

- 40 El algoritmo de seguimiento de células en 2D descrito anteriormente es útil para determinar el número de células en el embrión, así como sus formas en 2D. Sin embargo, está limitado por el hecho de que no hay una representación física subyacente. Esto puede o no ser importante para el seguimiento automático de divisiones celulares con el fin de evaluar la viabilidad del embrión. Por ejemplo, ciertos parámetros tales como la duración de la citocinesis, y el tiempo entre las divisiones celulares, se puede medir utilizando el algoritmo de seguimiento de células en 2D. En la siguiente sección, extendemos nuestro modelo de 2D a 3D. Para hacer frente a las oclusiones y las ambigüedades de profundidad que surgen de la estimación de formas en 3D a partir de imágenes en 2D, se aplican limitaciones geométricas y limitaciones en conservación del volumen celular.

Representación de la célula y seguimiento en tres dimensiones

- 50 Esta sección describe un algoritmo para el seguimiento en 3D de la división celular. Muchos de los pasos del algoritmo en 2D se llevan a este algoritmo, con algunas excepciones clave. Hay una representación nueva de la

célula para su uso 3D. Las células están representadas como elipsoides en el espacio de 3D, dado por la ecuación:

$$\frac{(x - x_0)^2}{a^2} + \frac{(y - y_0)^2}{b^2} + \frac{(z - z_0)^2}{c^2} = 1.$$

Cada elipsoide también tiene una dirección de rumbo θ , de rotación longitudinal o tono ψ , y de rotación lateral o de rodillo α . Por lo tanto, la representación de cada modelo embrionario en el tiempo t viene dada por:

$$\mathbf{X}_t^{[m]} = \begin{bmatrix} x_{0_1} & y_{0_1} & z_{0_1} & a_1 & b_1 & c_1 & \theta_1 & \psi_1 & \alpha_1 \\ x_{0_2} & y_{0_2} & z_{0_2} & a_2 & b_2 & c_2 & \theta_2 & \psi_2 & \alpha_2 \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ x_{0_N} & y_{0_N} & z_{0_N} & a_N & b_N & c_N & \theta_N & \psi_N & \alpha_N \end{bmatrix}$$

Un efecto importante de este modelo revisado es que puede haber ambigüedades asociadas a inferir formas en 3D a partir de imágenes en 2D. Por ejemplo, una célula que es de forma esférica tendría una apariencia similar a una célula con un eje principal más largo y una rotación longitudinal más grande. Esto no es una preocupación importante, ya que como se verá más adelante, la distribución de partículas mantiene estas hipótesis múltiples hasta que hay suficiente información disponible para hacer una distinción (por ejemplo, de un evento como la división celular).

Los elipsoides se consideran rígidos; es decir, la deformación no está explícitamente modelada. Sin embargo, se permite una pequeña cantidad de superposición entre elipsoides vecinos, y en estas regiones de superposición se supone que las células están aplanadas una contra la otra. Esta es una consideración importante, ya que se observa comúnmente en los embriones, de la que se da cuenta en las siguientes secciones.

Perturbación y división de las células

Nuestro modelo de perturbación y división de las células en 3D es similar al modelo de la Sección 4, “la perturbación y la división celular”, con algunas excepciones clave. La estimación de la forma en 3D se puede utilizar para reforzar la conservación de volumen. Esto evita que las células crezcan y se vuelvan arbitrariamente grandes, particularmente en la dirección z . La conservación del volumen se aplica en dos situaciones. En primer lugar, para la perturbación de una célula, los ejes A y B se varían, y c se calcula de manera que el volumen se conserva para esa célula individual. En segundo lugar, para la división celular, se aplica la siguiente restricción:

$$\frac{4}{3}\pi a_p b_p c_p = \frac{4}{3}\pi (a_{d_1} b_{d_1} c_{d_1} + a_{d_2} b_{d_2} c_{d_2}),$$

donde el subíndice p indica una célula parental y los subíndices d_1 y d_2 representan las dos células hijas. En la práctica, se permite una ligera violación de estas limitaciones dejando que el volumen total del embrión fluctúe entre más/menos 5% del volumen original. Esto se utiliza para compensar las posibles inexactitudes en la estimación del volumen inicial.

Cuando una célula se elige para dividirse en 3D, su división se modela de la siguiente manera. En primer lugar, para la célula individual elegida, se aplica una división a lo largo del eje largo de la elipse, que podría ser a , b , o c dependiendo de la configuración. Las células hijas se inicializan para ser iguales en tamaño y separadas por un espacio uniforme, teniendo en cuenta la rotación de la célula madre. Sus parámetros son entonces perturbados para cubrir una amplia gama de configuraciones posibles, de nuevo usando una distribución normal con varianza fijada en 10% de los valores inicializados.

Restricciones Geométricas

Los problemas de la oclusión y la ambigüedad en la profundidad están parcialmente mitigados a través de la conservación del volumen. Sin embargo, también son necesarias restricciones con respecto a las relaciones

espaciales con los elipsoides vecinos. La primera restricción es que está prohibido que las células se superpongan en más de un 20% en radio. Para las células que se superponen en una cantidad aceptable, se hace la suposición de que han aplanado una contra la otra. El modelo de partículas que se describe representa este fenómeno ignorando los puntos que están dentro de la intersección de elipsoides durante la simulación de la imagen. Esto

5 tiene motivaciones empíricas y se correlaciona bien con el comportamiento que se observa físicamente.

Se impone una segunda restricción que mantiene las células estrechamente próximas. Esta restricción está directamente relacionada con el comportamiento físico de los embriones humanos, donde las células se ven limitadas por una membrana llamada zona pelúcida. La zona se modela como una envoltura esférica y utilizarlo para imponer condiciones de contorno. El radio de la zona se establece como un 30% mayor que el radio del

10 embrión de 1 célula.

Estas restricciones se aplican de la siguiente manera. Para cada partícula en un momento dado, se aplica una entrada de control al azar para generar una nueva partícula, como se discutió anteriormente. Si cualquiera de las limitaciones físicas ha sido violada, la nueva partícula se descarta y se aplica un control aleatorio nuevo. Si no se genera una nueva partícula satisfactoria después de un cierto número de intentos, entonces esa partícula se

15 descarta.

Simulación de imágenes

La ventaja de la iluminación de campo oscuro, que se utiliza en los ejemplos, es que las membranas celulares dispersan más luz que el interior de la célula. Este efecto es más pronunciado en los lugares donde las membranas celulares son paralelas al eje óptico (eje z). En consecuencia, para simular imágenes se buscan estas

20 localizaciones en nuestros modelos de 3D, que no necesariamente se encuentran localizadas en el ecuador de los elipsoides, debido a su rotación. Se siguen las mismas reglas con respecto a los bordes visibles y ocluidos, como se discutió anteriormente.

Ejemplo de seguimiento de célula en 2D

Este ejemplo se refiere a la microscopia de células automatizado y utiliza el algoritmo descrito anteriormente para

25 el seguimiento en 2D de divisiones celulares. Este modelo está diseñado para realizar el seguimiento del número de células en la imagen, así como los contornos en 2D de las membranas celulares. El primer paso es la adquisición de imágenes, lo que motiva las siguientes secciones, tales como la simulación de la imagen y el preprocesamiento de la imagen. En este ejemplo las secuencias de imágenes de lapso de tiempo fueron adquiridas con un microscopio invertido personalizado Olympus IX-50 con un objetivo de 10X. El microscopio está modificado

30 para iluminación de campo oscuro, donde se concentra un cono hueco de luz sobre la muestra mediante la colocación de una abertura circular entre la fuente de luz y la lente condensadora. La lente del objetivo recoge la luz que es dispersada por la muestra y rechaza la luz transmitida directamente, produciendo una imagen brillante sobre un fondo oscuro. Una ventaja de la iluminación de campo oscuro es que las membranas celulares tienden a dispersar la luz más que el interior de la célula, mejorando así su contraste. El microscopio está equipado con una

35 pletina calentada y una cámara de incubación personalizada para permitir el cultivo de los embriones durante un período de hasta 5 ó 6 días. Las imágenes fueron capturadas en intervalos de 5 minutos por una cámara Olympus SLR digital montado en el puerto lateral del IX-50.

La obtención de imágenes de los embriones comenzó cuando eran cigotos o huevos fertilizados con forma aproximadamente esférica. Para inicializar el conjunto de partículas, se calcula el umbral Escaño como se describe

40 en la Sección 6, "Preprocesamiento de imágenes," y se ajusta a un círculo utilizando mínimos cuadrados. Todas las partículas se inicializan entonces como círculos con orientaciones al azar muestreados a partir de una distribución uniforme.

La Fig. 31 muestra los resultados del algoritmo 2D para el seguimiento de las divisiones celulares del estadio de 1 célula a 4 células. Los resultados muestran que las membranas celulares se extrajeron con éxito mediante el

45 algoritmo, incluso para las células situadas hacia la parte inferior que están parcialmente ocluidas. Cabe señalar que en la mayoría de aplicaciones del filtro de partículas, el "único" mejor modelo se representa a menudo como una suma ponderada de los parámetros de estado de la distribución de partículas. Sin embargo, para los resultados presentados en la presente memoria, se muestra la partícula con la mayor probabilidad.

Ejemplo de seguimiento de célula en 3D.

La Fig. 32 muestra dos aplicaciones exitosas del algoritmo para 3D anteriormente descrito para el seguimiento desde el estadio de 1 célula a 4 células. La Fig. 33 es un diagrama que muestra un ejemplo de cómo las partículas se distribuyen durante una división de 1 célula a 2 células (correspondiente al primer ejemplo mostrado en la Fig. 32). Este gráfico muestra la ubicación en 3D de los centros de cada célula. A medida que la célula empieza a dividirse, las predicciones muestran una ambigüedad en cuanto a qué célula hija se encontrará en la parte superior

55 de la otra, pero esto se resuelve en un par de marcos.

Extracción de los parámetros predictivos

Una vez que los embriones han sido modelados usando los métodos descritos anteriormente, ciertos parámetros pueden ser extraídos de los modelos. Por lo general, se utiliza el modelo mejor o más probable. Estos parámetros incluyen, por ejemplo, la duración de la primera citocinesis, el tiempo entre la primera y la segunda divisiones celulares, y el tiempo entre la segunda y tercera divisiones celulares. La duración de la citocinesis se puede aproximar midiendo por cuánto tiempo se alarga el modelo de una célula antes de que se divida en dos células. El alargamiento se puede medir observando la relación de los ejes mayor y menor de la elipse. Otros parámetros que se pueden extraer de los modelos incluyen el tiempo entre la fecundación y la primera división celular, las formas y simetrías de las células y los procesos de división, los ángulos de división, fragmentación, etc. Los parámetros pueden ser extraídos utilizando el algoritmo de seguimiento de la célula en 2D o el algoritmo de seguimiento de la célula en 3D.

La citocinesis está definida por la primera aparición del surco de citocinesis hasta la separación completa de las células hijas. Dado que nuestros modelos embrionarios se componen de elipses no deformables, la identificación de la aparición del surco citocinesis es una tarea difícil. Un método sería permitir que las elipses se deformen, pero esto da como resultado un problema de seguimiento más complejo. Otro método sería el de buscar cambios en la curvatura de la imagen del microscopio de preprocesada; sin embargo, esto frustra el propósito de tratar de medir nuestros parámetros predictivos directamente desde los modelos embrionarios. Por lo tanto, simplificamos el problema mediante la aproximación de la duración de la primera citocinesis como la duración del alargamiento de las células antes de la división de 1 célula a 2 células. El alargamiento se cuantifica mediante el cálculo de la relación del eje mayor a con respecto al eje menor b de la elipse. Una célula se considera alargada si:

$$\frac{a - b}{b} \geq 15\%$$

Este valor de 15% fue elegido empíricamente y funciona bien para este conjunto de datos en particular, sin embargo otros valores pueden ser utilizados. Una vez que un modelo embrionario se ha dividido en 2 células, se puede extraer la duración aproximada de la primera citocinesis mediante el cálculo de la duración del alargamiento para el modelo de 1 célula.

En principio, medir el tiempo entre los eventos de mitosis es sencillo. Por ejemplo, el tiempo entre la primera y segunda mitosis puede ser medido como el tiempo entre el modelo de 2 células y el modelo de 3 células. Sin embargo, en algunos casos los embriones pueden exhibir un comportamiento inusual y al azar. Esto incluye, por ejemplo, un embrión que va desde 1 célula a 2 células, a partir de 2 células a aparentemente 3 ó 4 células, y luego de vuelta a 2 células. El algoritmo descrito es capaz de rastrear este tipo de comportamientos, pero plantea un desafío para determinar el intervalo de tiempo entre los eventos de mitosis.

Una forma de hacer frente a este comportamiento es la siguiente: En lugar de medir el tiempo entre un modelo de 2 células y 3 células (con el fin de encontrar el tiempo entre la primera y segunda mitosis), esto se puede aproximar simplemente contando el número de marcos de imagen en los que un modelo 2 células es más probable. Esto funciona bien en algunos casos, pero no siempre es representativo del tiempo real entre los eventos de mitosis. También se puede hacer frente a estos eventos mediante la aplicación de una restricción sobre los modelos basada en el número de células. Es decir, cuando se elige el mejor modelo o más probable de la distribución en cada iteración, se puede exigir que el número de células en el modelo siempre sea el mismo o que aumente, pero nunca que disminuya. Después de la aplicación de esta restricción, es sencillo calcular el tiempo entre los eventos de mitosis. Esta restricción también es útil para filtrar los resultados de seguimiento que pueden mostrar pequeñas cantidades de fluctuación, que en ocasiones se pueden producir cuando un modelo cambia hacia atrás y hacia delante entre un modelo de 1 célula y de 2 células, por ejemplo.

Método para la extracción de parámetros predictivos

La Fig. 35 muestra un diagrama de flujo que resume los métodos descritos anteriormente. El diagrama de flujo muestra cómo puede analizarse un solo embrión (aunque esto se puede aplicar a múltiples embriones u otros tipos de células y células madre). En el primer paso, se adquiere una imagen de un embrión con un microscopio de lapso de tiempo ("medida"). Esta imagen se puede guardar en un archivo y volver a abrir en un momento posterior en el tiempo. La imagen es usualmente preprocesada con el fin de mejorar ciertas características, aunque esto no es necesario. Se predicen modelos de configuraciones posibles de embriones, y las imágenes son simuladas a partir de estos modelos ("predicción"). La imagen simulada podría incluir imágenes de membranas celulares, como se describió anteriormente, o imágenes que representan con mayor precisión las imágenes del microscopio antes del preprocesamiento. Los modelos se comparan luego con la imagen del microscopio preprocesada ("comparación"). Usando esta comparación, las mejores predicciones se mantienen, mientras que las malas predicciones se descartan. El conjunto resultante de predicciones se utiliza entonces para mejorar las predicciones para la próxima imagen. Después de realizar este proceso para múltiples imágenes secuenciales, es posible medir parámetros morfológicos directamente desde el(los) mejor(es) modelo(s), tales como, por ejemplo, la duración de la citocinesis y el tiempo entre eventos de mitosis. Estos parámetros se pueden utilizar para evaluar la viabilidad de un embrión, como se discutió anteriormente.

Ejemplo 7

Análisis automatizado de la actividad celular

Los métodos descritos anteriormente requieren la capacidad de rastrear el desarrollo de células a través de microscopía. Para los embriones, es deseable realizar un seguimiento de embriones múltiples, que están siendo

- 5 cultivados juntos en la misma placa. Los métodos analíticos utilizados en la presente memoria también requieren que las imágenes se tomen periódicamente (por ejemplo, cada 1-30 minutos durante 1-5 días para los embriones; pueden utilizarse diferentes intervalos de tiempo para otros tipos de células tales como las células madre). Por tanto, se ideó un método de obtención de imágenes para realizar un seguimiento automático el desarrollo embrionario.
- 10 En la microscopía de lapso de tiempo, las células se cultivan en condiciones controladas y se obtienen imágenes de ellas durante un período prolongado de tiempo para monitorizar procesos tales como la motilidad (movimiento en el entorno), la proliferación (crecimiento y división), y cambios en la morfología (tamaño y forma). Debido a la longitud de los experimentos y las enormes cantidades de datos de imágenes generados, la extracción de parámetros tales como la duración y el tiempo entre las divisiones celulares puede ser una tarea tediosa. Esto es
- 15 particularmente cierto para aplicaciones de alto rendimiento, donde múltiples muestras se visualizan simultáneamente. Así pues, existe una necesidad de un software de análisis de imágenes que pueda extraer la información deseada de forma automática.

Una forma de evaluar la viabilidad del embrión es medir la cantidad de “actividad celular” en las imágenes. Esto puede lograrse simplemente tomando pares secuenciales de imágenes y comparando sus valores de píxeles. Más

- 20 específicamente, para medir la cantidad de actividad celular para cada nueva imagen, se calcula la suma de los cuadrados de las diferencias (SSD) en las intensidades de píxeles entre la nueva imagen, denominada I' , y la imagen anterior, denominada I , para todos los píxeles superpuestos i :

$$SSD = \sum_i [I'(x'_i, y'_i) - I(x_i, y_i)]^2 = \sum_i e_i^2.$$

Para reducir el ruido, las imágenes pueden ser suavizadas primero con un filtro de Gauss. La Fig. 28 muestra una

- 25 gráfica de la actividad celular del día 1 al día 3 de un solo embrión. Como se muestra, hay picos agudos correspondientes a la división de 1 célula a 2 células, la división de 2 células a 4 células, y la división de 4 células a 8 células en un embrión humano. Las anchuras de los picos son representativas de las duraciones de las divisiones celulares.
- Una de las limitaciones de este enfoque es que la métrica de SSD sólo mide la cantidad de actividad en la imagen, y eventos tales como el movimiento de embriones (tales como el desplazamiento o la rotación) puede parecer
- 30 bastante similares a la división celular. Una solución a este problema es realizar un registro de imagen antes de calcular la SSD. El registro de imagen es el proceso de encontrar una relación geométrica entre dos imágenes con el fin de alinear en el mismo sistema de coordenadas, y se puede lograr utilizando una variedad de técnicas diferentes. Por ejemplo, se puede utilizar una variación de la rutina iterativa no lineal Levenberg-Marquardt, que
- 35 registra las imágenes minimizando la SSD en intensidades de píxeles superpuestos. El algoritmo LM transforma ubicaciones de píxeles utilizando una matriz de homografía 3x3:

$$\begin{bmatrix} \tilde{x}' \\ \tilde{y}' \\ \tilde{w}' \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} h_0 & h_1 & h_2 \\ h_3 & h_4 & h_5 \\ h_6 & h_7 & 1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} x \\ y \\ 1 \end{bmatrix},$$

donde las ubicaciones de destino de los píxeles x' e y' se normalizan como:

$$x' = \frac{\tilde{x}'}{w'}, \quad y' = \frac{\tilde{y}'}{w'}.$$

- 40 Así:

$$x' = \frac{h_0x + h_1y + h_2}{h_6x + h_7y + h_8},$$

$$y' = \frac{h_3x + h_4y + h_5}{h_6x + h_7y + h_8}.$$

- 5 La matriz de homografía se puede aplicar a una variedad de transformaciones de imagen, y una elección razonable en esta aplicación serían las transformaciones de cuerpo rígido (Euclideana). Esto podría alinear las imágenes de embriones en traslación y rotación en un plano (a lo largo del eje de la cámara). Sin embargo, es posible generalizar ligeramente y utilizar una transformación afín, que permite la inclinación de la imagen. Esta generalización puede o no ser deseable en función de la señal que se esté intentando medir. Las ecuaciones de movimiento se convierten así en:

$$x' = h_0x + h_1y + h_2$$

$$y' = h_3x + h_4y + h_5.$$

- 10 El algoritmo LM calcula primero las derivadas parciales de e con respecto a los parámetros de movimiento desconocidos h_k utilizando la regla de la cadena:

$$\frac{\delta e}{\delta h_k} = \frac{\delta I'}{\delta x'} \frac{\delta x'}{\delta h_k} + \frac{\delta I'}{\delta y'} \frac{\delta y'}{\delta h_k}.$$

Para los parámetros de movimiento afines, estas derivadas parciales se convierten en:

$$\frac{\delta e}{\delta h_0} = x \frac{\delta I'}{\delta x'},$$

$$\frac{\delta e}{\delta h_1} = y \frac{\delta I'}{\delta x'},$$

$$\frac{\delta e}{\delta h_2} = \frac{\delta I'}{\delta x'},$$

$$\frac{\delta e}{\delta h_3} = x \frac{\delta I'}{\delta y'},$$

$$\frac{\delta e}{\delta h_4} = y \frac{\delta I'}{\delta y'},$$

$$\frac{\delta e}{\delta h_5} = \frac{\delta I'}{\delta y'}.$$

- 15 A continuación, utilizando estas derivadas parciales, el algoritmo LM calcula la matriz Hessiana aproximada A (en el conjunto de números reales de tamaño 6×6) y el vector de gradiente ponderado b (en el conjunto de números reales de tamaño 6×1), añadiendo la contribución de cada píxel:

$$a_{kl} = \sum_i \frac{\delta e_i}{\delta h_k} \frac{\delta e_i}{\delta h_l},$$

$$b_k = - \sum_i \frac{\delta e_i}{\delta h_k}.$$

Finalmente, los parámetros de movimiento se pueden actualizar añadiendo el movimiento incremental:

$$\Delta \mathbf{H} = (\mathbf{A} + \lambda \mathbf{I})^{-1} \mathbf{b},$$

donde la constante λ regula el tamaño del paso de la actualización de movimiento e $\mathbf{I}$ es la matriz de identidad.

- 5 En cada iteración del algoritmo, la primera imagen es deformada de acuerdo a la estimación de movimiento actualizada y en comparación con la segunda imagen mediante el cálculo de la SSD de intensidades de los píxeles en las zonas de superposición. La presente solicitud supone que el movimiento de embrión entre imágenes consecutivas es muy pequeño, y por lo tanto, sólo se realiza un pequeño número, fijo, de iteraciones. La Fig. 28B muestra un gráfico de actividad celular sin (28A) y con (28B) los registros de imagen realizados para cada par de imágenes. Dado que la función de error de la rutina de Levenberg-Marquardt es el SSD, se dibuja simplemente el error residual para cada registro. La Fig. 29 compara las gráficas de actividad celular para el desarrollo embrionario normal y anormal. En el día 3, el punto en el que un embriólogo normalmente evaluaría la morfología, los embriones parecen similares y podrían potencialmente considerarse ambos viables. Sin embargo, sus gráficas de actividad celular son drásticamente diferentes, ya que uno de los embriones experimenta una serie típica de divisiones celulares, mientras que el otro se parte desde embrión de 1 célula dando varias células y fragmentos. Como era de esperar, el embrión que tiene una gráfica de actividad normal en última instancia, alcanza el estadio de blastocisto hacia el día 5,5.

- Otros tipos de registro de imágenes se pueden usar antes de calcular la SSD en las intensidades de los píxeles. Esto incluye, por ejemplo, la correlación cruzada, correlación cruzada normalizada, la correlación de fase cruzada, la información mutua, la detección y el seguimiento de características, transformación de características a escala invariante (SIFT), el flujo óptico y descenso de gradiente. El preprocesamiento de imágenes puede ser o no deseable antes de su registro, como una característica o mejora del contraste.

Modelo para evaluar la viabilidad de embriones

- La Fig. 13 muestra un modelo del desarrollo embrionario humano basado en correlación de imágenes y análisis molecular. Se muestra la línea de tiempo del desarrollo desde el cigoto hasta blastocisto incluyendo breves momentos críticos para la predicción del desarrollo exitoso hasta blastocisto y un esquema del desarrollo embrionario. Los datos moleculares clave, tal como se indica en el esquema, indican que los embriones humanos comienzan la vida con un conjunto distinguible de ARNs del ovocito que se heredan de la madre. Este conjunto de ARNs se mantiene y se empaqueta adecuadamente mediante programas específicos de gestión de ARN en el huevo. Después de la fecundación, la degradación de un subconjunto de los ARNs maternos específicos del huevo (ESSP1; patrón específico de estadio embrionario 1) deben ser degradados al comenzar la transición de ovocitos a embrión. Al mismo tiempo, otros ARNs se dividen idealmente por igual entre cada blastómero según continúa el desarrollo (ESSP4). La degradación y compartimentación exitosas de los ARNs culmina con la activación del genoma embrionario (EGA) y la transcripción de los genes de ESSP2 de manera autónoma en cada célula. Cabe destacar que, durante las divisiones de escisión, los blastómeros embrionarios pueden detenerse o progresar de forma independiente. El resultado del desarrollo autónomo de las células en el embrión es que los blastómeros individuales pueden detenerse o progresar y según progresa el embrión de 8 células al estadio de mórula y más allá, la calidad del blastocisto se verá afectada por el número de células que se detengan o progresen más allá de 8 células. Los datos de las imágenes demuestran que existen períodos críticos del desarrollo que predicen el éxito o el fracaso: la primera citocinesis, la segunda división de escisión y la sincronía de las divisiones segunda y tercera. Estos parámetros se pueden medir automáticamente utilizando los algoritmos de seguimiento de células y el software descritos anteriormente. Los sistemas y métodos descritos se pueden utilizar para diagnosticar el resultado de los embriones con predictores de imagen clave y pueden permitir la transferencia de menos embriones en etapas más tempranas del desarrollo (antes de la EGA). Comparación del análisis automatizado frente al análisis manual de imágenes.

- Fig. 34 muestra una comparación del análisis de imagen automatizado con el análisis de imagen manual para un conjunto de 14 embriones. Los embriones del 1 al 10 (según las etiquetas que aparecen sobre las gráficas) alcanzaron el estadio de blastocisto con diferentes morfologías. Los embriones del 11 al 14 se detuvieron y no llegaron a blastocisto. La Fig. 34A muestra la comparación midiendo la duración de la primera citocinesis, y la Fig. 34B muestra la comparación midiendo el tiempo entre la 1ª y 2ª mitosis. Como puede observarse, los dos métodos muestran un buen acuerdo en general. Las pequeñas cantidades de discrepancia en la duración de la primera

- citocinesis son esperadas, ya que se puede atribuir al hecho de que nuestro análisis automatizado hace una aproximación midiendo el alargamiento, como se discutió anteriormente. En unos pocos casos, hay un desacuerdo mayor entre el análisis automatizado y manual, tanto para la duración de la citocinesis, como para el tiempo entre la 1ª y 2ª mitosis. Esto ocurre con unos pocos de los embriones anormales, y está causado por un comportamiento
- 5 inusual que es tanto difícil de caracterizar manualmente como de seguir automáticamente. Para este grupo de embriones, y usando sólo los dos primeros criterios (duración de la primera citocinesis vez y el tiempo entre la 1ª y 2ª mitosis), el algoritmo automático tiene cero falsos positivos. Esto sería extremadamente importante en un procedimiento de FIV donde los falsos positivos deben ser evitados. El análisis manual de imágenes tuvo un falso negativo (embrión 9), mientras que el algoritmo automatizado tuvo dos falsos negativos (embriones 9 y 10). Sin
- 10 embargo, mientras que los dos embriones 9 y 10 técnicamente alcanzaron el estadio de blastocisto, mostraron una morfología deficiente en comparación con otros blastocistos y serían candidatos menos óptimos para la transferencia. Según el análisis manual de imágenes, el embrión de 14 sería un falso positivo sobre la base de estos dos criterios, y se necesita el tercer parámetro de duración entre 2ª y 3ª mitosis para dar un verdadero negativo. Sin embargo, el algoritmo automatizado hace la predicción correcta utilizando sólo los dos primeros
- 15 criterios. Estos resultados indican que nuestro algoritmo automatizado puede predecir con éxito blastocisto frente a no blastocisto así como diferenciar entre distintas calidades de blastocisto. Así, para las situaciones en las que se determina que múltiples embriones tienen buen potencial de desarrollo, es posible calcular una clasificación de sus calidades relativas, con el fin de seleccionar los mejores 1 o 2 embriones para su transferencia durante procedimientos de FIV.
- 20 El procedimiento solamente ilustra los principios de la invención. Se apreciará que los expertos en la técnica serán capaces de idear diversas disposiciones las cuales, aunque no se describan explícitamente o se muestren en la presente memoria, suponen realizaciones de los principios de la invención y se incluyen dentro de su espíritu y alcance. Además, todos los ejemplos y lenguajes condicionales mencionados aquí están principalmente propuestos para ayudar al lector en el entendimiento de los principios de la invención y los conceptos contribuidos
- 25 por los inventores para promover la técnica, y se tienen que concebir como carentes de limitación por tales ejemplos y condiciones específicamente mencionados. Es más, todas las declaraciones de la presente memoria que se refieren a principios, aspectos y realizaciones de la invención así como también ejemplos específicos de los mismos, están propuestos para abarcar equivalentes de los mismos tanto funcionales como estructurales. Adicionalmente, se pretende que tales equivalentes incluyan tanto equivalentes actualmente conocidos como equivalentes desarrollados en el futuro, es decir, cualesquiera elementos desarrollados que realicen la misma función, independientemente de la estructura. El alcance de la presente invención, por lo tanto, no está propuesto para estar limitado a las realizaciones ejemplares mostradas y descritas en la presente memoria. Más bien, el alcance y espíritu de la presente invención están personificados por las reivindicaciones adjuntas.
- 30
- 35 Se divulgan las siguientes realizaciones numeradas:
- A. Un método para determinar el potencial de desarrollo de un embrión humano o célula pluripotente, que comprende:
- a) medir uno o más parámetros celulares de dicho embrión humano o célula pluripotente para llegar a una medida de parámetro celular; y
- 40 b) emplear dicha medida de parámetro celular para proporcionar una determinación del potencial de desarrollo de dicho embrión o célula pluripotente.
- B. El método de la realización (A), en el que los parámetros celulares son medibles por microscopía de lapso de tiempo.
- C. El método de la realización (B), en el que se determina el potencial de desarrollo de un embrión, y el
- 45 parámetro o parámetros celulares se seleccionan del grupo que consiste en:
- (i) la duración de un evento de citocinesis;
- (ii) el intervalo de tiempo entre la citocinesis 1 y la citocinesis 2; y
- (iii) el intervalo de tiempo entre la citocinesis 2 y la citocinesis 3.
- D. El método de la realización (C), en el que un buen potencial de desarrollo de dicho embrión humano está
- 50 indicado por:
- (i) una duración de la citocinesis 1 que es de aproximadamente 0 minutos hasta aproximadamente 30 minutos;
- (ii) un intervalo de tiempo entre la resolución de la citocinesis 1 y el comienzo de citocinesis 2 que es de aproximadamente 8 - 15 horas; y/o

(iii) un intervalo de tiempo entre el inicio de la citocinesis 2 y el inicio de la citocinesis 3 que es de aproximadamente 0 - 5 horas.

E. El método de la realización (D), en el que la etapa de medición además comprende medir la duración del ciclo celular 1.

5 F. El método de la realización (E), en el que un buen potencial de desarrollo del embrión humano está indicado por una duración del ciclo celular 1 que es de aproximadamente 20-27 horas.

10 G. El método de la realización (C), en el que dicha etapa de empleo comprende comparar dicha medida de parámetro celular con una medida de parámetro celular de un embrión humano de referencia, y emplear el resultado de dicha comparación para proporcionar una determinación del potencial de desarrollo de dicho embrión humano.

H. El método de la realización (G), en el que un potencial de desarrollo deficiente de dicho embrión humano está indicado por:

(a) una citocinesis más larga 1 para dicho embrión humano que para dicho embrión humano de referencia;

15 (b) un intervalo de tiempo más largo o más corto entre la resolución de la citocinesis 1 y el comienzo de la citocinesis 2 para dicho embrión humano que para dicho embrión humano de referencia; y/o

(c) un intervalo de tiempo más largo entre el inicio de la citocinesis 2 y el inicio de la citocinesis 3 para dicho embrión humano que para dicho embrión humano de referencia.

I. El método de la realización (H), en el que dicha medida además comprende medir la duración del ciclo celular 1.

20 J. El método de la realización (I), en el que un potencial de desarrollo deficiente de dicho embrión humano está indicado por un ciclo celular 1 más largo para el embrión que para dicho embrión humano de referencia.

K. El método de la realización (A), en el que uno o más parámetros celulares son niveles de expresión de genes que se miden para llegar a una medida de la expresión génica.

25 L. El método de la realización (K), en el que se determina el potencial de desarrollo de un embrión, y dicho gen o genes se seleccionan del grupo que consiste en Cofilin, DIAPH1, ECT2, MYLC2/MYL5, DGCR8, Dicer/DICER1, TARBP2, CPEB1, Symplekin/SYMPK, YBX2, ZAR1, CTNNB1, DNMT3B, TERT, YY1, IFGR2/IFNGR2, BTF3, y NELF.

30 M. El método de la realización (K), en el que dicha etapa de empleo comprende comparar dicha medida de la expresión génica con una medida de la expresión génica de un embrión de referencia o célula pluripotente, y usar el resultado de dicha comparación para proporcionar una determinación del potencial de desarrollo del embrión humano o célula pluripotente.

35 N. El método de la realización (N), en el que se determina el potencial de desarrollo de un embrión, y un nivel inferior de la expresión de uno o más genes seleccionados del grupo que consiste de Cofilin, DIAPH1, ECT2, MYLC2/MYL5, DGCR8, Dicer/DICER1, TARBP2, CPEB1, Symplekin/SYMPK, YBX2, ZAR1, CTNNB1, DNMT3B, TERT, YY1, IFGR2/IFNGR2, BTF3 y NEF en dicho embrión con relación a dicho embrión de referencia es indicativo de un potencial de desarrollo deficiente.

O. Un método para clasificar embriones humanos o células pluripotentes unos con respecto a otros, que comprende las etapas de:

40 (a) medir al menos un parámetro celular para cada embrión humano o célula pluripotente para llegar a una medida de parámetro celular para cada embrión o célula pluripotente; y

(b) emplear al menos dicha medida de parámetro celular de cada uno de dichos embriones o células pluripotentes para clasificar los embriones humanos o células pluripotentes unos con respecto a otros.

P. El método de la realización (O), en el que el dicho al menos un parámetro celular es medible por microscopía de lapso de tiempo.

45 Q. El método de la realización (P), en el que los embriones son clasificados y el dicho al menos un parámetro celular se selecciona del grupo que consiste en:

(i) la duración de un evento de citocinesis;

(ii) el intervalo de tiempo entre la citocinesis 1 y la citocinesis 2; y

(iii) el intervalo de tiempo entre la citocinesis 2 y la citocinesis 3.

- R. El método de la realización (Q), en el que la etapa de medida además comprende medir la duración del ciclo celular 1.
- S. El método de la realización (A), en el que dicho parámetro o parámetros celulares son los niveles de expresión de uno o más genes.
- 5 T. El método de la realización (S), en el que dicho gen o genes se seleccionan del grupo que consiste en Cofilin, DIAPH1, ECT2, MYLC2/MYL5, DGCR8, Dicer/DICER1, TARBP2, CPEB1, Symplekin/SYMPK, YBX2, ZAR1, CTNNB1, DNMT3B, TERT, YY1, IFGR2/IFNGR2, BTF3, y NELF.
- 10 U. El método de la realización (O), en el que dicha etapa de empleo se efectúa comparando dichas medidas de parámetros celulares de cada uno de dichos embriones o células pluripotentes entre sí para determinar el potencial de desarrollo de los embriones o células pluripotentes relativos unos con respecto a otros.
- 15 V. El método de la realización (O), en el que la etapa de empleo se efectúa: comparando dichas medidas de parámetros celulares de cada uno de dichos embriones o células pluripotentes con una medida de parámetro celular de un embrión de referencia o célula pluripotente para determinar los potenciales de desarrollo de cada embrión o célula pluripotente; y comparando los potenciales de desarrollo de cada embrión o célula pluripotente para determinar el potencial de desarrollo de los embriones o células pluripotentes unos con respecto a otros.
- W. Un método para proporcionar un embrión humano con buen potencial de desarrollo a una hembra, en el que comprende las etapas de:
- (a) cultivar uno o más embriones en condiciones suficientes para el desarrollo del embrión;
- 20 (b) medir uno o más parámetros celulares en dicho embrión o embriones para llegar a una medida de parámetro celular;
- (c) emplear dicha medición de parámetro celular para proporcionar una determinación del potencial de desarrollo de uno o más embriones;
- (d) transferir dicho embrión o los dichos embriones que demuestren buen potencial de desarrollo en una hembra en necesidad que lo necesite.
- 25 X. El método de la realización (W) en el que dichos embriones se producen mediante la fecundación de ovocitos *in vitro*.
- Y. El método de la realización (W), en el que dichos ovocitos han madurado *in vitro*.
- Z. El método de la realización (W), en el que dichos ovocitos han madurado *in vivo*.
- 30 AA. El método de la realización (Y), en el que los ovocitos madurados *in vitro* son complementados con factores de crecimiento.
- AB. Aparato para la obtención de imágenes automatizadas en células en cultivo, que comprende:
- (a) una pluralidad de microscopios colocados dentro de una incubadora;
- (b) cada microscopio dispuesto para enfocar una placa de cultivo fija en una platina;
- (c) cada microscopio con una fuente de luz para iluminar las células de la placa de cultivo;
- 35 (d) cada microscopio con una cámara de obtención de imágenes;
- (e) un ordenador para almacenar imágenes de una o más cámaras y programado para analizar imágenes secuenciales a lo largo del tiempo.
- AC. El aparato de la realización (AB), en el que la fuente de luz proporciona iluminación de campo oscuro.
- AD. El aparato de la realización (AB), en el que la fuente de luz es roja o casi infrarroja.
- 40 AE. Aparato para cultivo celular, que comprende:
- (a) una placa de Petri con micropocillos;
- (b) cada micropocillo con una superficie inferior con acabado de calidad óptica;
- (c) los micropocillos dispuestos estrechamente juntos de manera que pueden compartir una única gota de medio.
- 45 AF. El aparato de la realización (AE), en el que se coloca una pared externa alrededor de los micropocillos

para retener una gota de medio.

AG. El aparato de la realización (AE), en el que se colocan marcadores fiduciarios cerca de los micropocillos.

AH. Sistema para determinar el potencial de desarrollo de células embrionarias o células madre en crecimiento, que comprende:

- 5 (a) un microscopio;
- (b) una cámara de obtención de imágenes para adquirir imágenes del microscopio;
- (c) un ordenador para almacenar imágenes de la cámara;
- (d) software para crear modelos de las células para medir al menos uno de entre: (i) la duración de la citocinesis, (ii) el tiempo entre eventos de mitosis.
- 10 AI. Un método automatizado para obtener imágenes microscópicamente de una célula móvil en división que está en cultivo, en el cual la célula en división es muestreada mediante una serie de imágenes digitales que tienen píxeles, que comprende las etapas de:
 - a) Representar el conjunto de píxeles como una forma calculada;
 - 15 b) Predecir cambios en el conjunto de píxeles debidos al movimiento y la división de la célula perturbando valores perturbados de la forma calculada;
 - c) generar un conjunto de imágenes simuladas de la forma predicha;
 - d) comparar las imágenes simuladas con la imagen real;
 - e) usar la comparación para determinar la precisión de la forma predicha.
- 20 AJ. El método de la realización (AI), en el que la simulación de imagen comprende simular un esquema de una o más membranas celulares.
- AK. El método de la realización (B), en el que dicha célula pluripotente es un ovocito, y dicho parámetro o parámetros celulares se seleccionan del grupo que consiste en:
 - (i) la duración de un evento de citocinesis que produce un cuerpo polar; y
 - (ii) el intervalo de tiempo entre los ciclos celulares meióticos.

25

REIVINDICACIONES

1. Un método para evaluar una buena o deficiente competencia para el desarrollo de un embrión humano, que comprende
5
1) medir parámetros celulares del embrión humano in vitro, en donde dichos parámetros celulares incluyen:

(a) la duración de la primera citocinesis;
10 (b) el intervalo de tiempo entre la citocinesis 1 y la citocinesis 2; o
(c) el intervalo de tiempo entre la citocinesis 2 y la citocinesis 3, y

2) determinar que el embrión humano tiene una buena competencia para el desarrollo cuando,

(a') la duración de la primera citocinesis es de 0 a 30 minutos;
15 (b') el intervalo de tiempo entre la resolución de la citocinesis 1 y el comienzo de la citocinesis 2 es de 8-15 horas; o
(c') el intervalo de tiempo entre el comienzo de la citocinesis 2 y el comienzo de la citocinesis 3 es de 0-5 horas.
20 en donde dichos parámetros celulares se miden por microscopía de lapso de tiempo.
2. El método según la reivindicación 1, en el que los parámetros celulares incluyen:

(a) la duración de la primera citocinesis;
25 (b) el intervalo de tiempo entre la citocinesis 1 y la citocinesis 2; y
(c) el intervalo de tiempo entre la citocinesis 2 y la citocinesis 3.
3. El método según la reivindicación 1, en el que dichos parámetros celulares comprenden además la duración del ciclo celular 1.
- 30 4. El método según la reivindicación 3, en el que una buena competencia para el desarrollo de dicho embrión humano está indicada cuando la duración del ciclo celular 1 es de 20 a 27 horas.
5. El método según la reivindicación 1, en el que una competencia deficiente para el desarrollo de dicho embrión humano está indicada por que:
35
(a) la duración de la primera citocinesis es más larga que 30 minutos;
(b) el intervalo de tiempo entre la resolución de la citocinesis 1 y el comienzo de la citocinesis es menor que 8 horas o más largo que 15 horas; y/o
40 (c) el intervalo de tiempo entre el comienzo de la citocinesis 2 y el comienzo de la citocinesis 3 es mayor que 5 horas.
6. El método según la reivindicación 5, en el que dichos parámetros celulares además comprenden la duración del ciclo celular 1.
- 45 7. El método según la reivindicación 6, en el que una competencia deficiente para el desarrollo de dicho embrión humano está indicada cuando la duración del ciclo celular 1 es más larga que 27 horas.
8. El método según la reivindicación 1, en el que dichos embriones se producen mediante fecundación de ovocitos in vitro.
- 50 9. El método según la reivindicación 8, en el que dichos ovocitos se maduran in vitro.
10. El método según la reivindicación 9, en el que dichos ovocitos madurados in vitro son complementados con factores de crecimiento.
- 55 11. El método según la reivindicación 1, en el que los embriones no han sido congelados antes de medir los parámetros.
12. El método según la reivindicación 1, en el que los embriones han sido congelados antes de medir los parámetros.
- 60 13. El método según la reivindicación 1, en el que el embrión humano tiene una buena competencia para el desarrollo cuando la duración de la primera citocinesis es de 0 a 30 minutos.

14. El método según la reivindicación 1, en el que el embrión humano tiene una buena competencia para el desarrollo cuando el intervalo de tiempo entre la resolución de la citocinesis 1 y el comienzo de la citocinesis 2 es de 8-15 horas.
- 5 15. El método según la reivindicación 1, en el que el embrión humano tiene una buena competencia para el desarrollo cuando el intervalo de tiempo entre el comienzo de la citocinesis 2 y el comienzo de la citocinesis 3 es de 0-5 horas.
- 10 16. El método según la reivindicación 1, en el que el embrión humano tiene una buena competencia para el desarrollo cuando el intervalo de tiempo entre la resolución de la citocinesis 1 y el comienzo de la citocinesis 2 es de 8-15 horas y el intervalo de tiempo entre el comienzo de la citocinesis 2 y el comienzo de la citocinesis 3 es de 0-5 horas

15

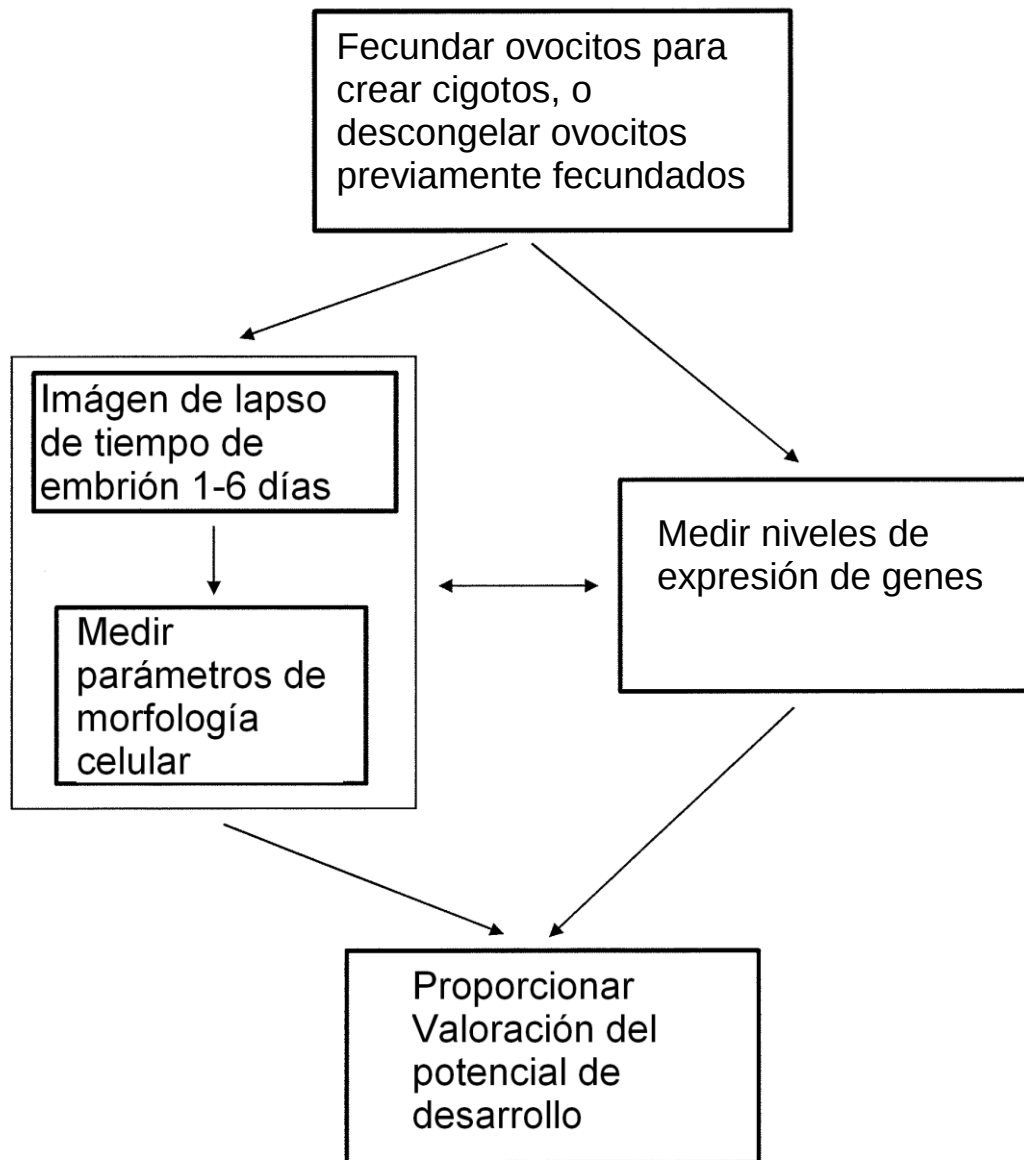


Fig. 1

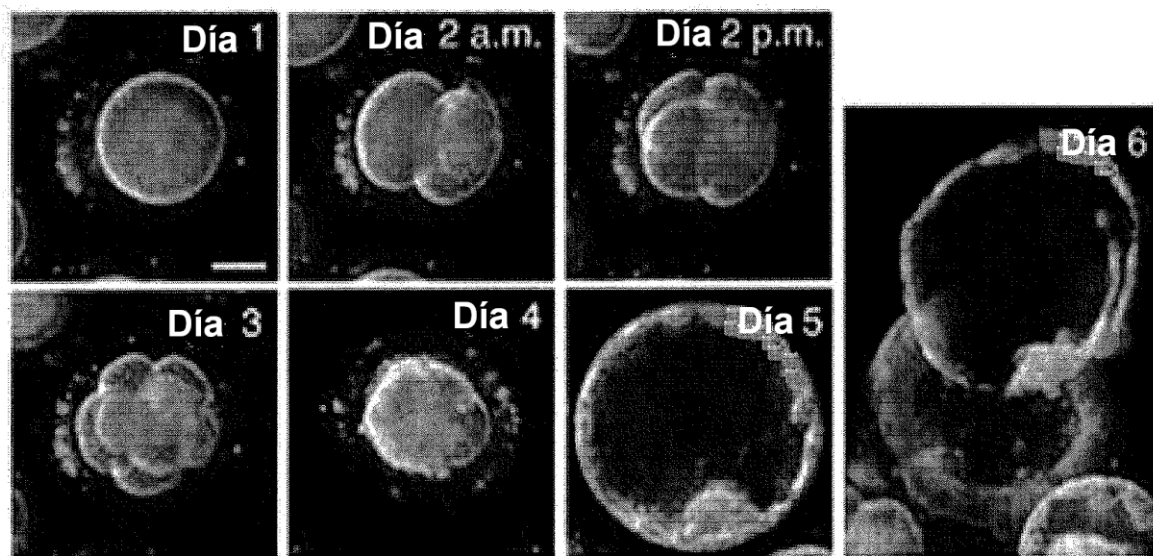


Fig. 2

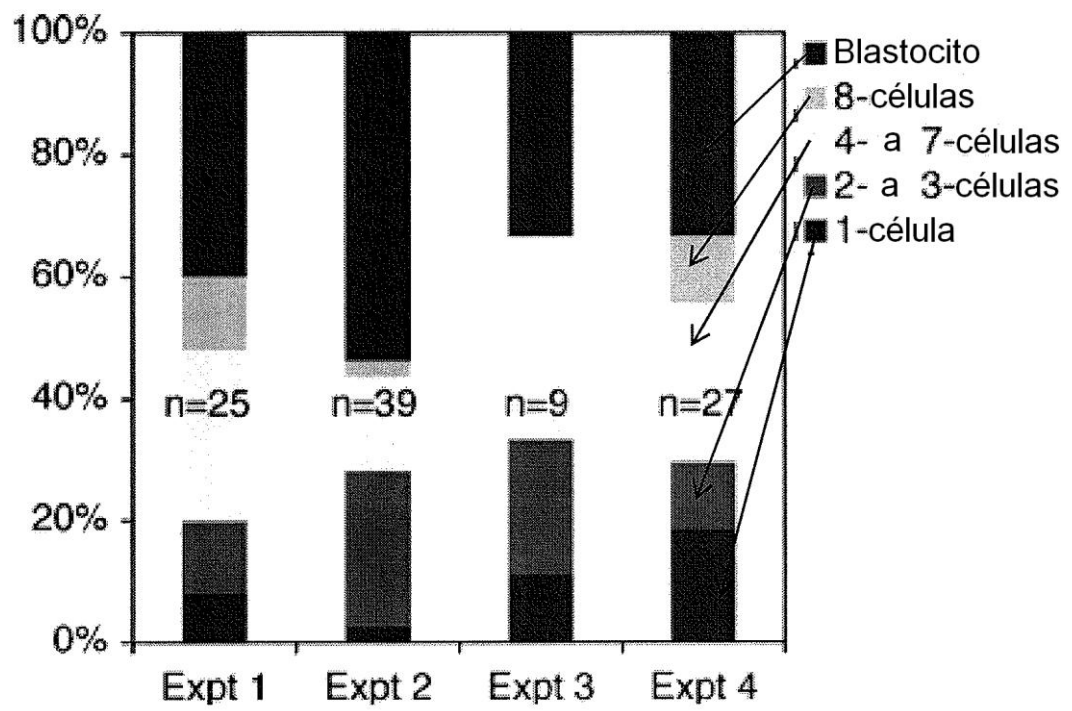
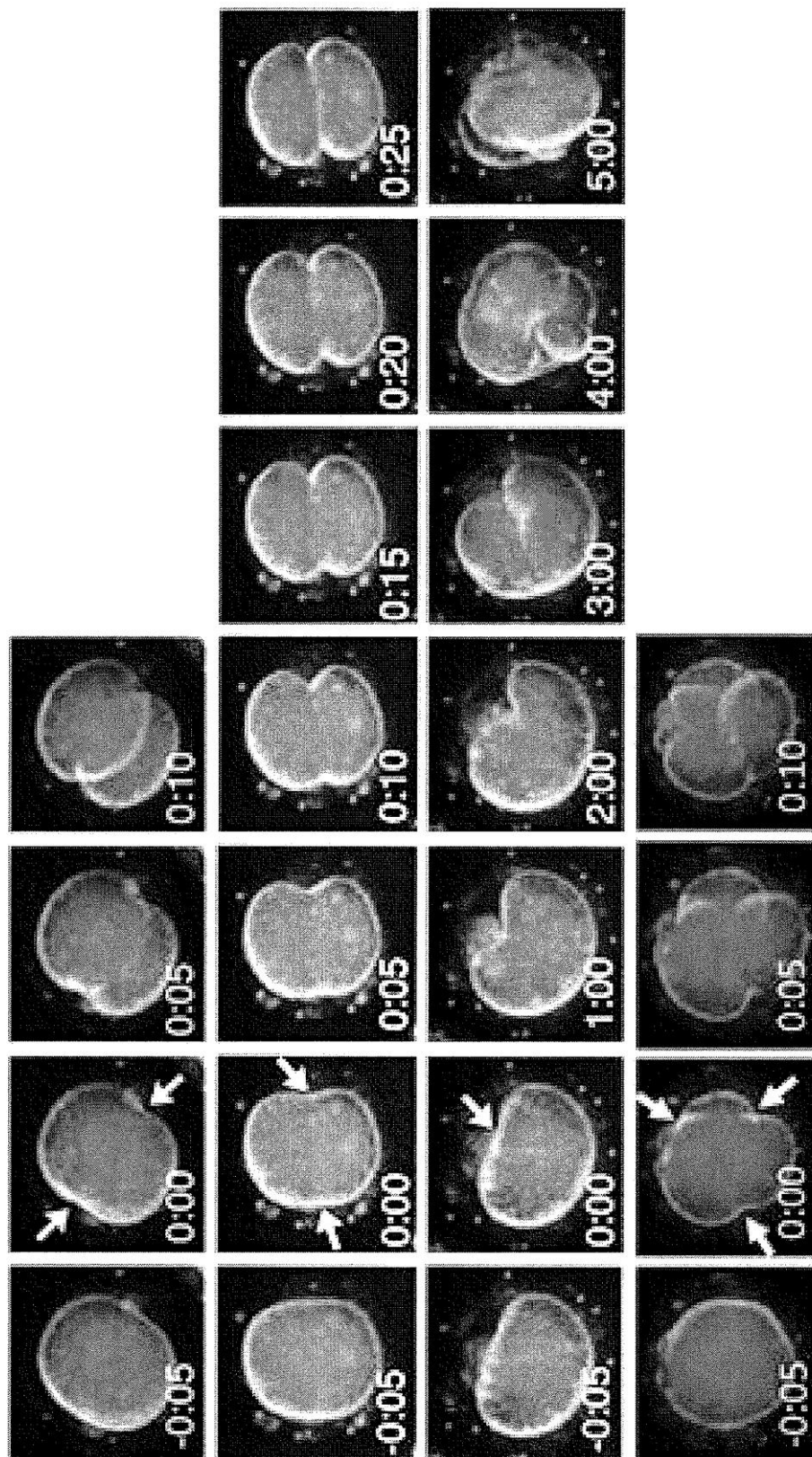


Fig. 3

Figura 4



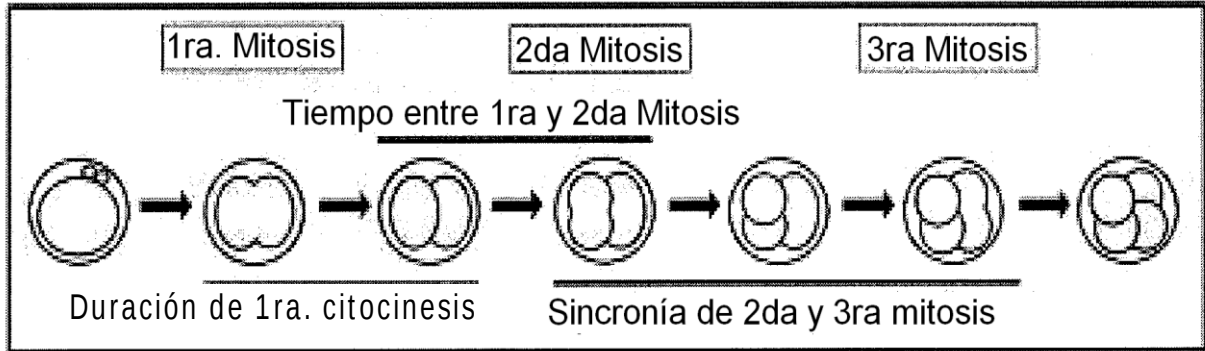


Fig. 5

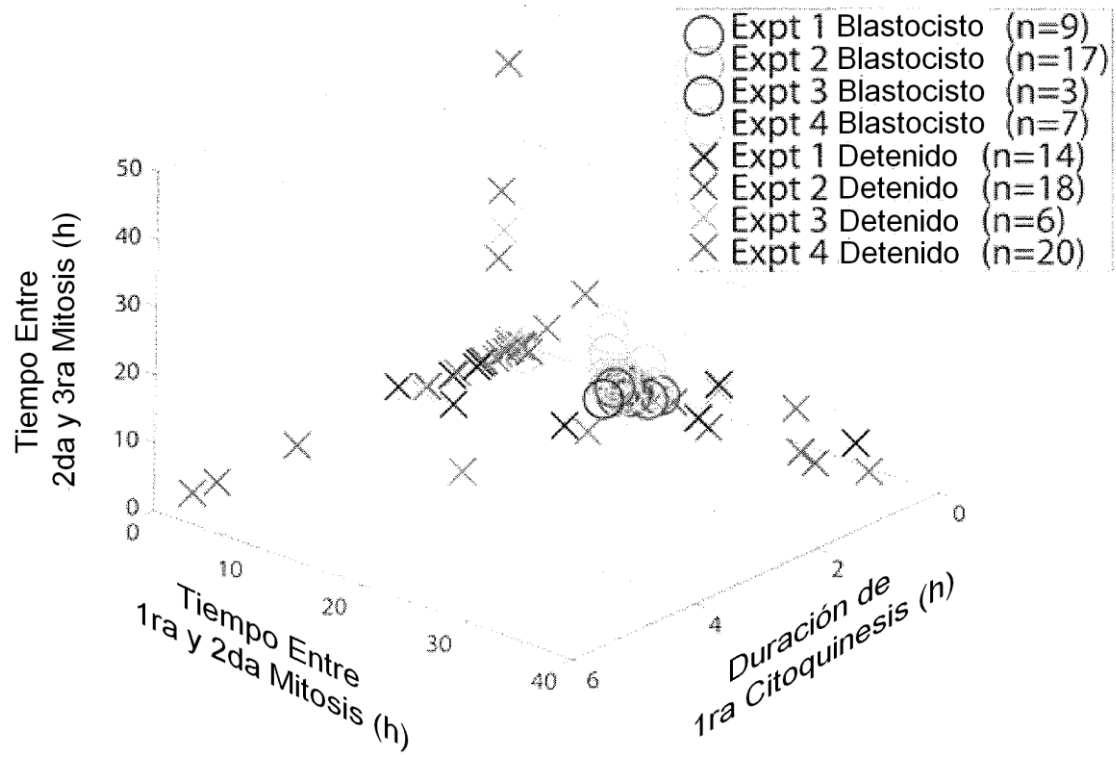


Fig. 6

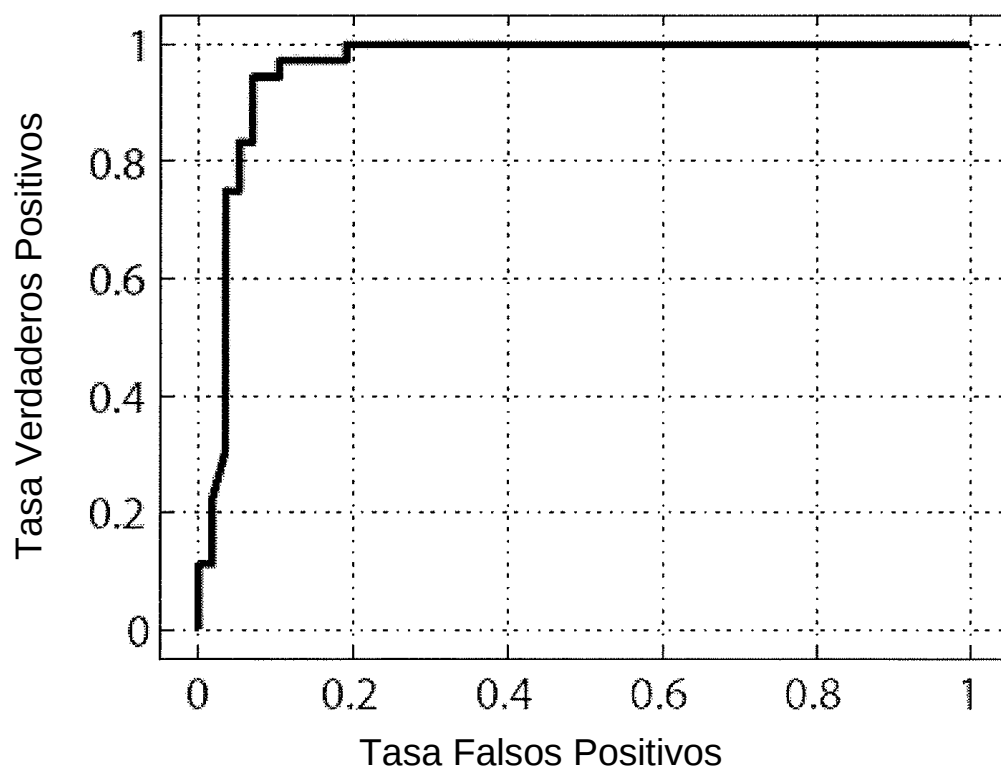


Fig. 7

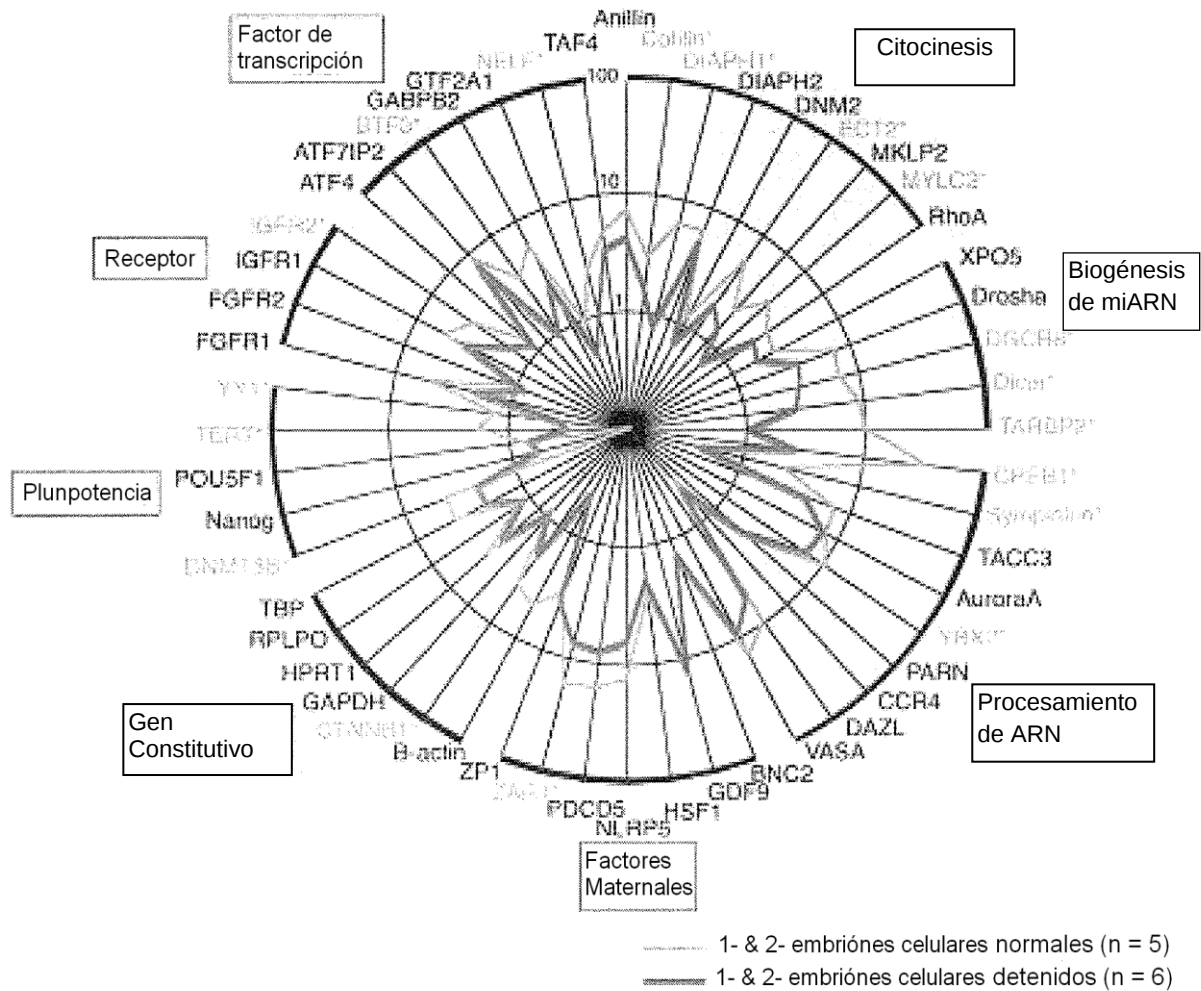


Fig. 8

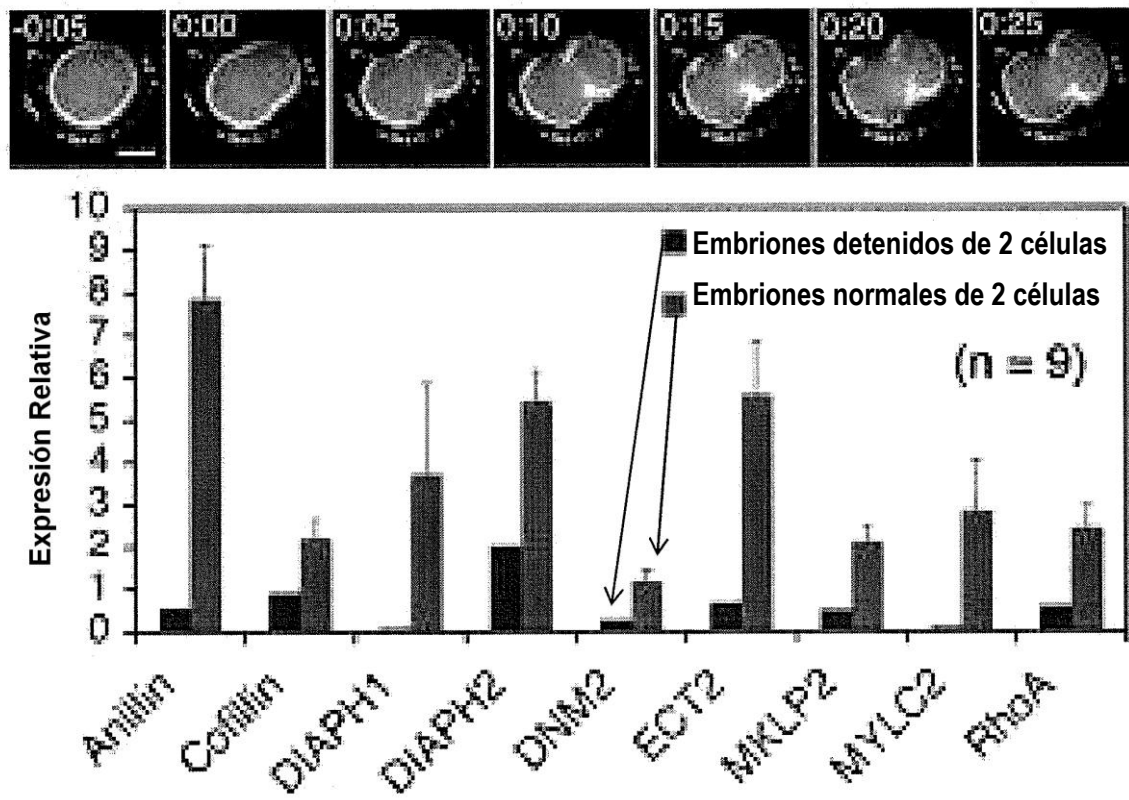


Fig. 9

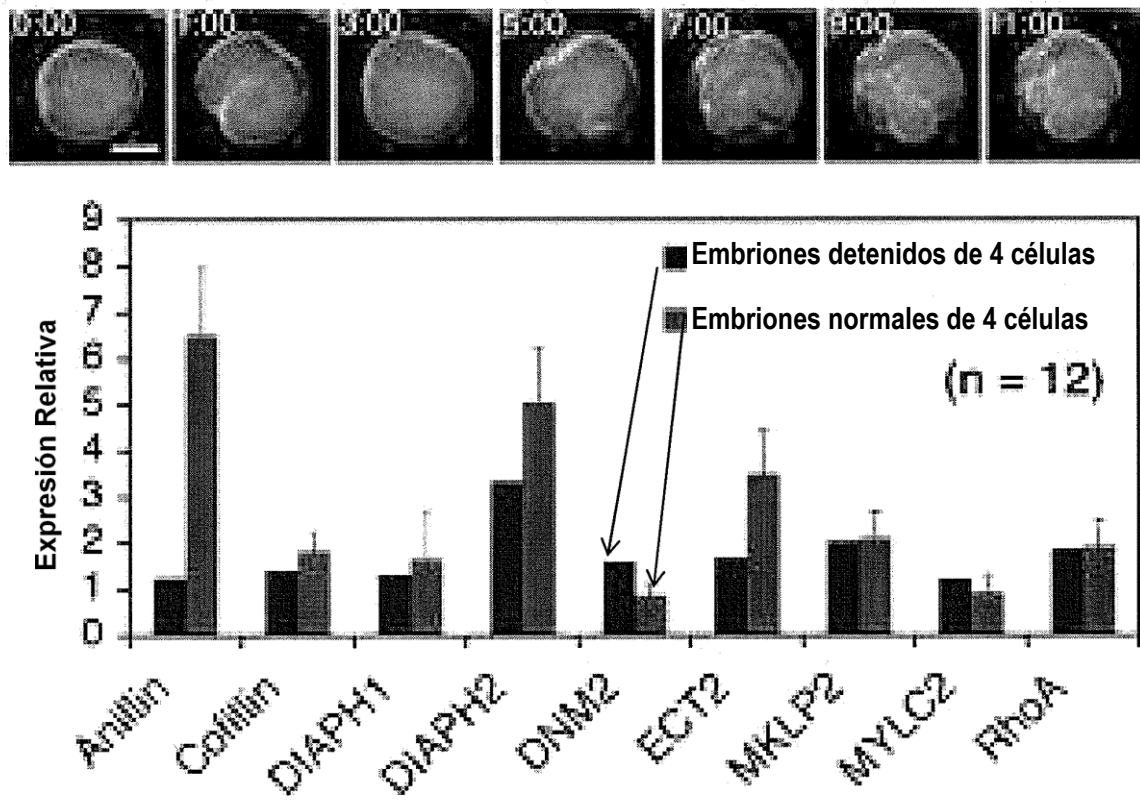


Fig. 10

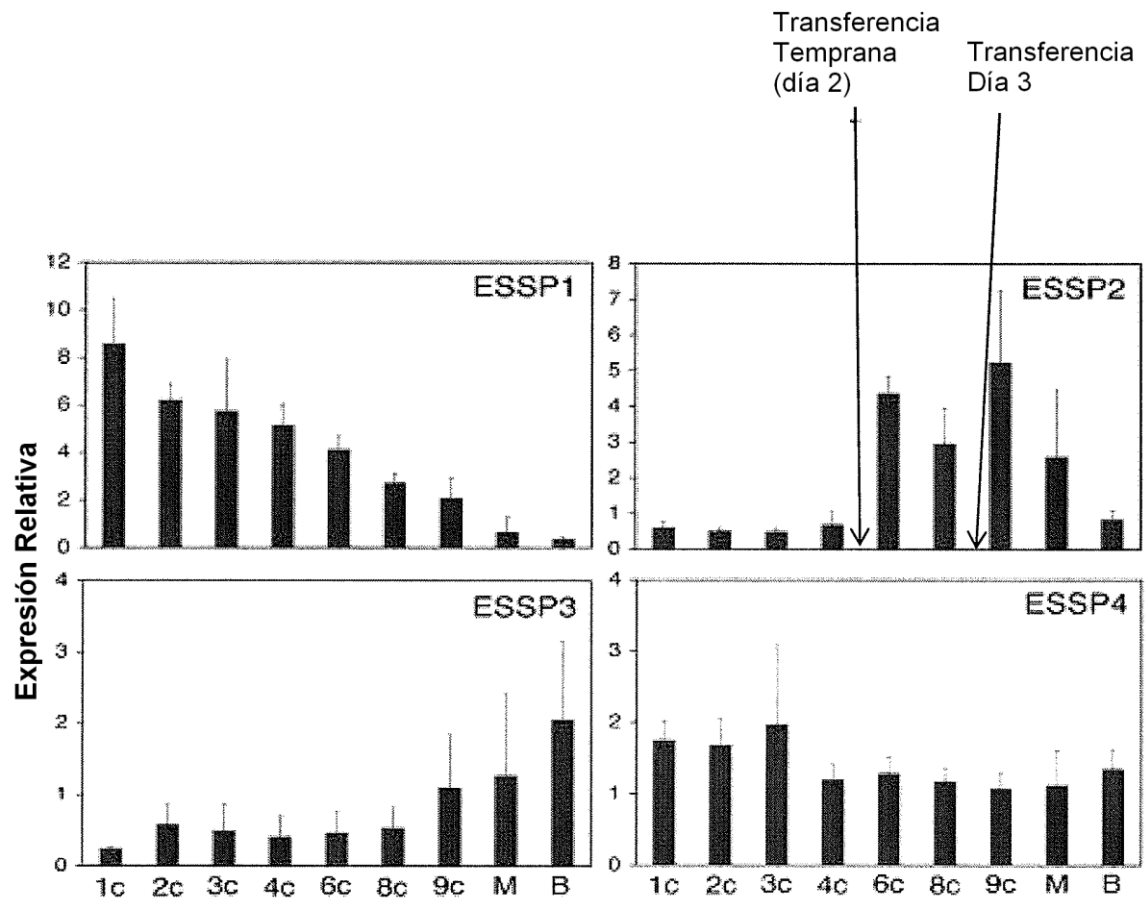
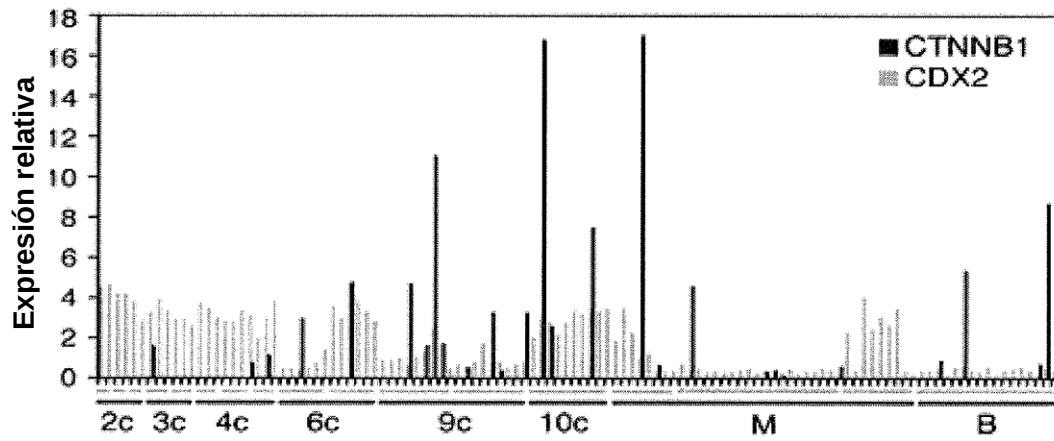


Fig. 11

a.



b.

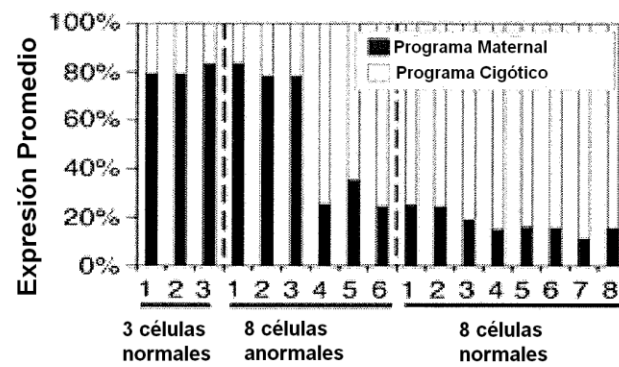
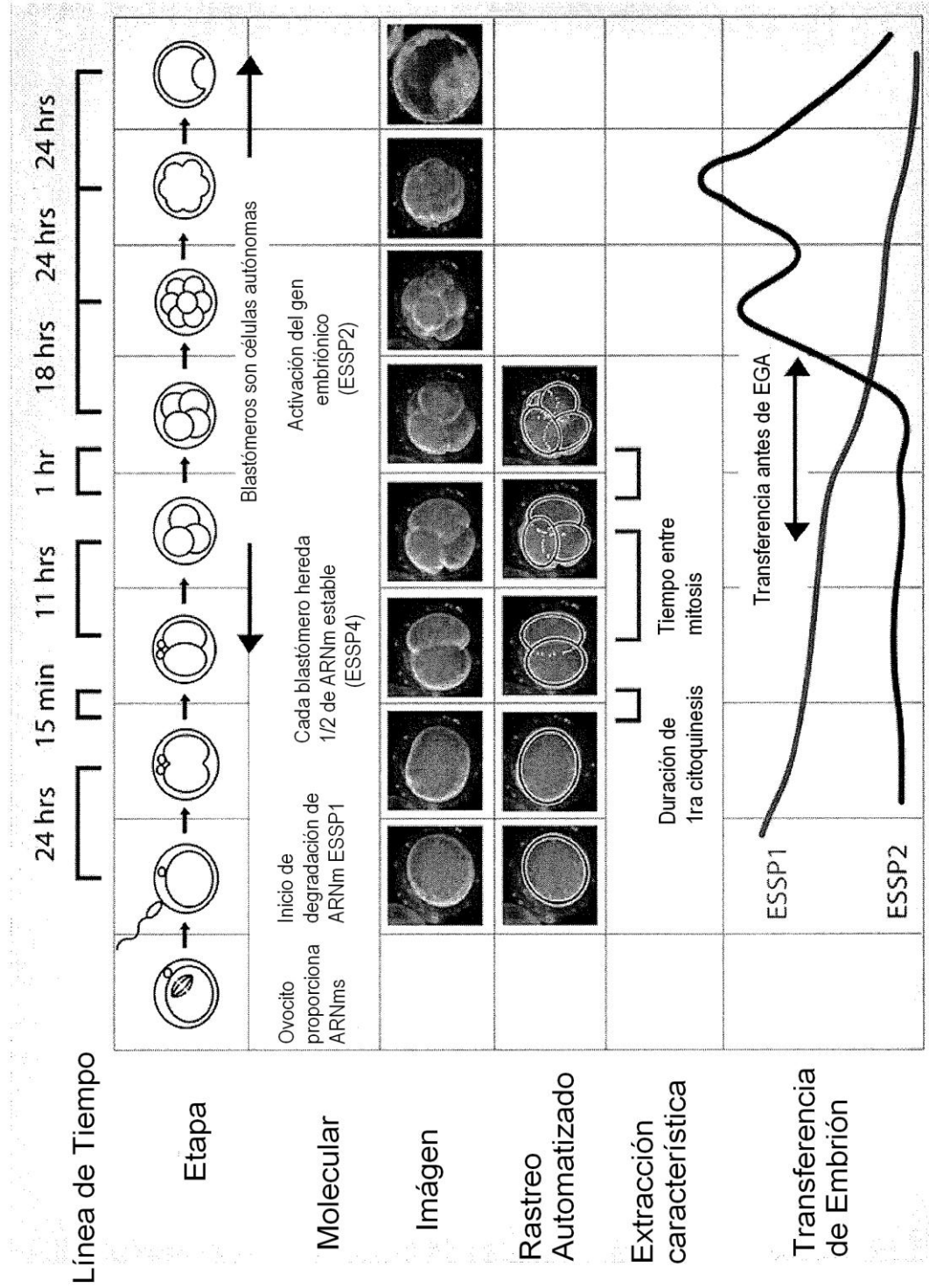


Fig. 12

Figura 13



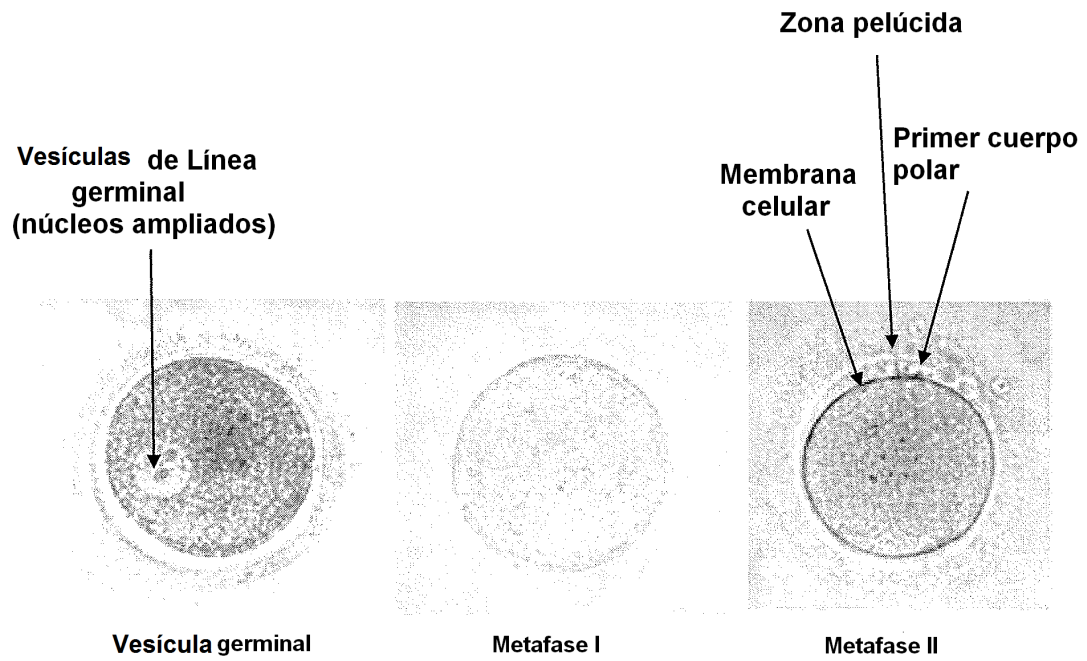


Fig. 14

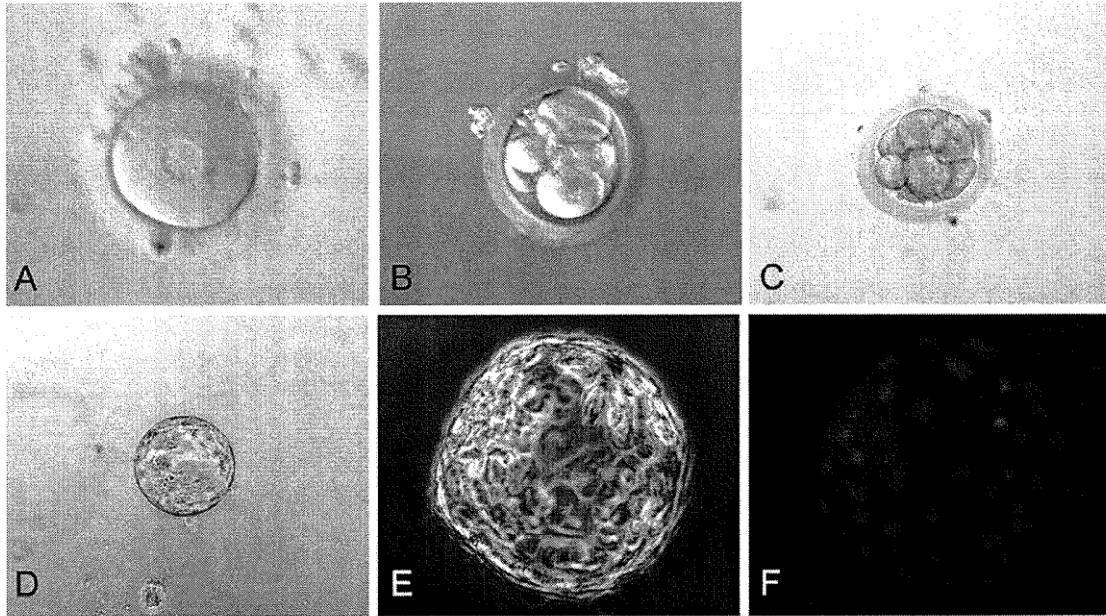


Fig. 15

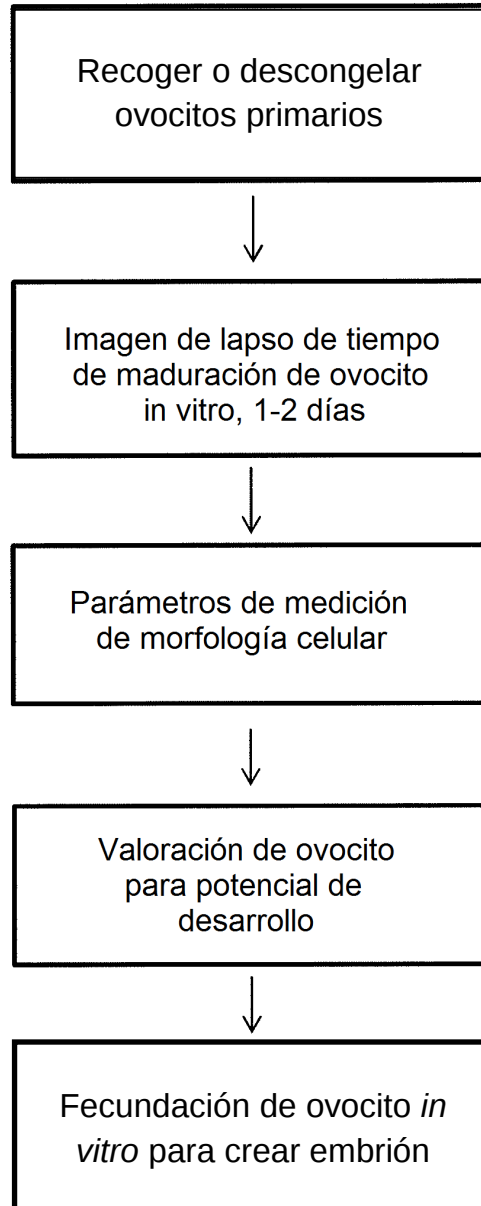


Fig. 16

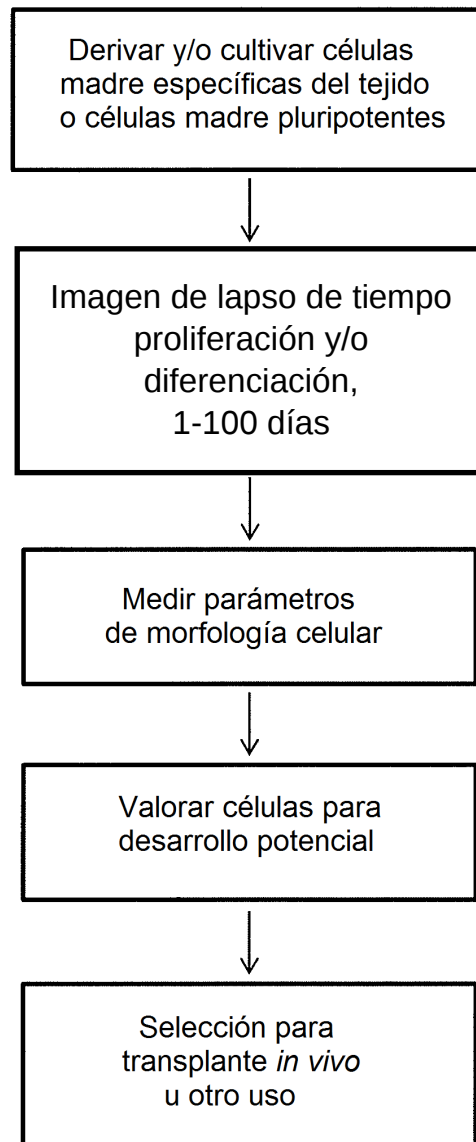


Fig. 17

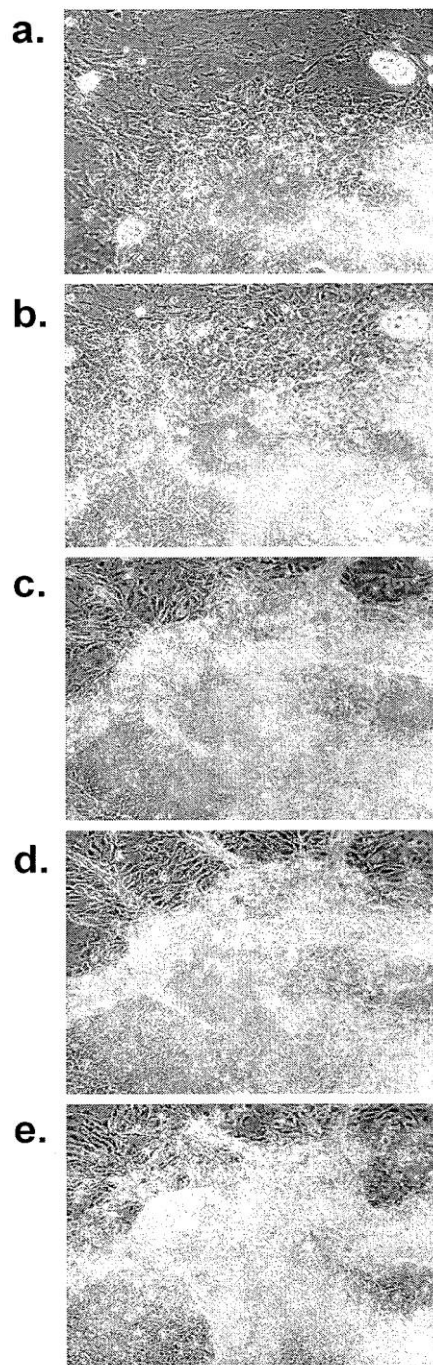


Fig. 18

Figura 19

Tabla 1

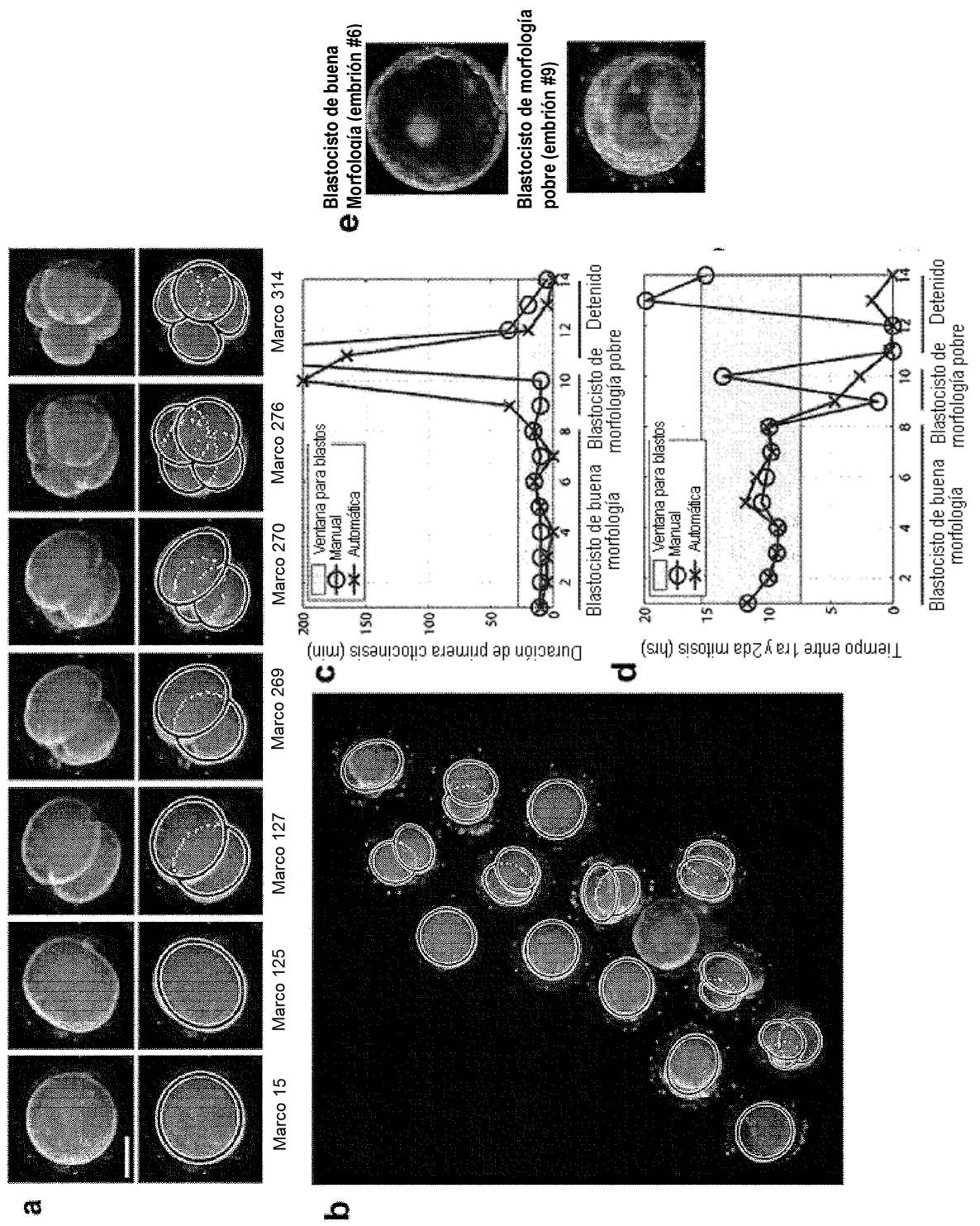
Categoría	# de genes
Apoptosis	5
Citocinesis	10
Diferenciación	9
Activación de genes embrionarios	10
Epigenética	5
Célula germinal	9
Constitutivo	10
Ligando / receptor	11
Efecto materno	8
miARN	5
Pluripotencia	7
Procesamiento de ARN	7
Específico de sexo	2
TE / ICM	14
Factor de transcripción	11

Figura 20

Tabla 2

Patrón 1	Patrón 2	Patrón 4
Anillin	CCNA1	CTK7
ATG5	CCR4	FABP5
ATP2C1	DNM2	FGFR2
Aurora A	EIF1AX	GAPDH
Bclaf1	EIF4A3	HMOX2
Cofilin	EOMES	Hsp70
CPEB1	GDF3	IGF2R
DAZL	GTF2A1	LSM3
Dgcr8	H2AFZ	PABPC1
DIAPH1	JARID1B	PRMT5
DIAPH2	Nanog	RPLPO
Dicer	NES	YY1
DNAJA4	Prdm14	
DNMT3B	PTMA	No definido
Drosha	RUNX2	ATF4
ECT2	SERPINA1	ATF7IP
EHMT2	SERTAD1	ATF7IP2
FGFR1	SOX2	B2M
FYN	STELLAR	BNC2
GABPB2	YY1	BTF3
GDF9		CDX2
HMOX2	Patrón 3	CTNNB1
HPRT1	B-actin	Dby
HSF1	Bcl2	Hsp70.1
IGF1R	GCM1	PRDM1
IGF2R	HDAC7A	Symplekin
LAMB1	IFITM1	TARBP2
MKLP2	POU5F1	Xist
MYLC2	SALF	
NLRP5	TGFBR2	
PARN		
PDCD5		
PVR		
RhoA		
Sycp3		
TACC3		
TAF4		
TBP		
TERT		
VASA		
XPO5		
YBX2		
Zar1		
ZP1		

Figura 21



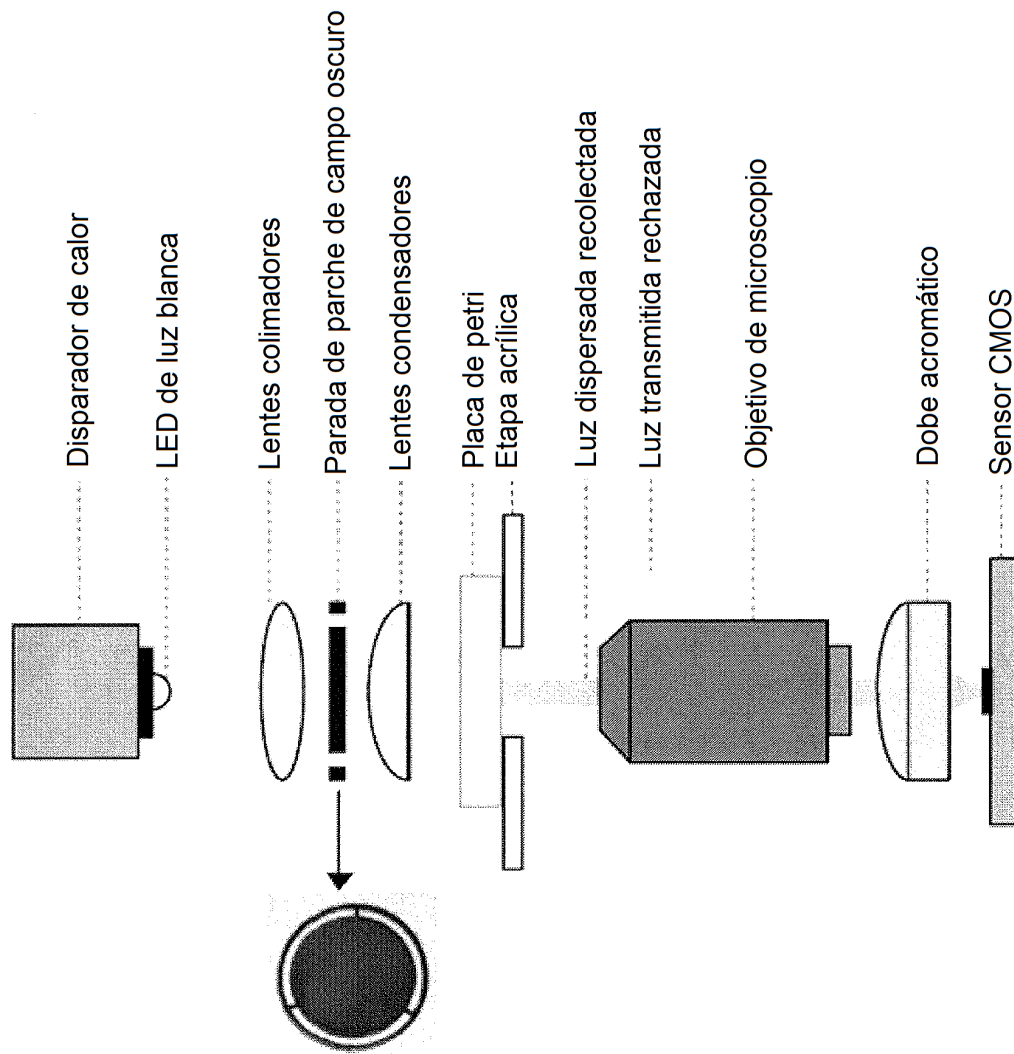
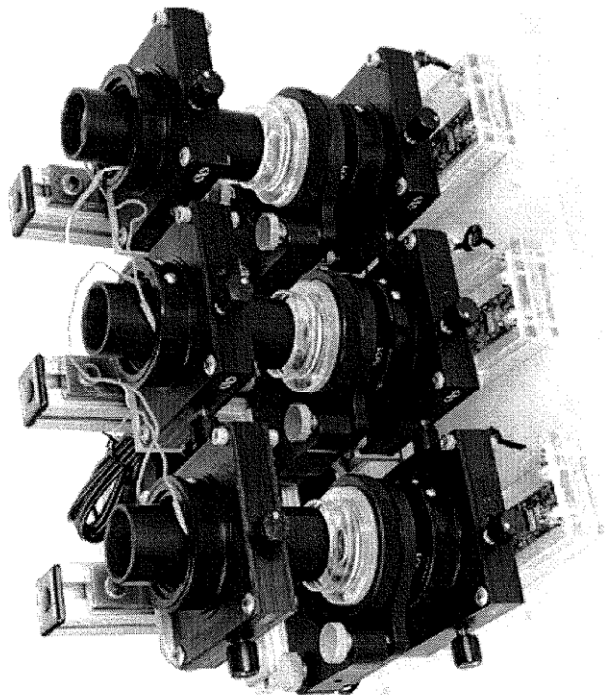
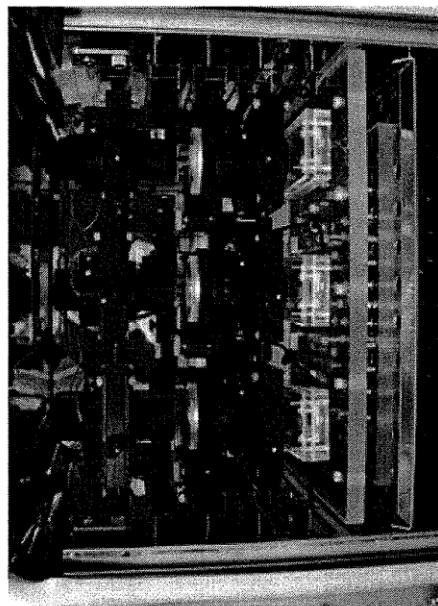


Fig. 22

Figura 23



23A



23B

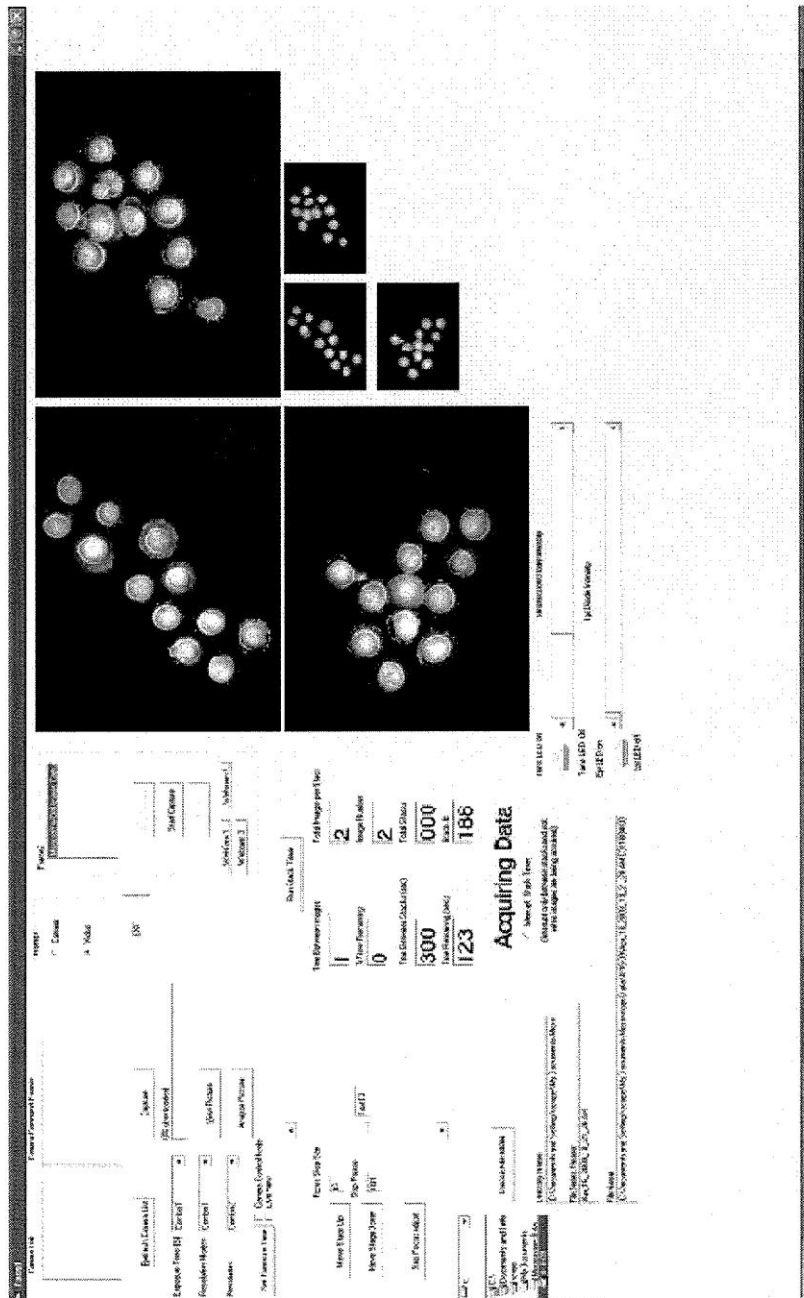
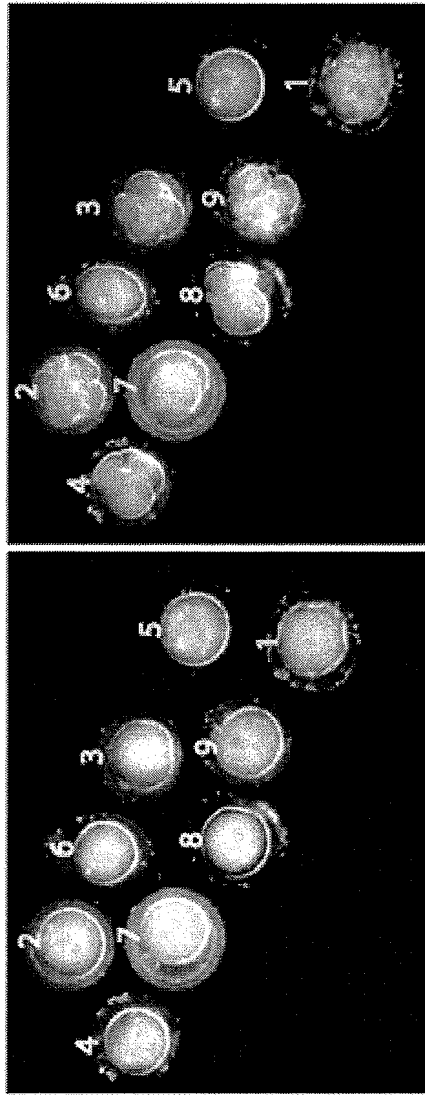
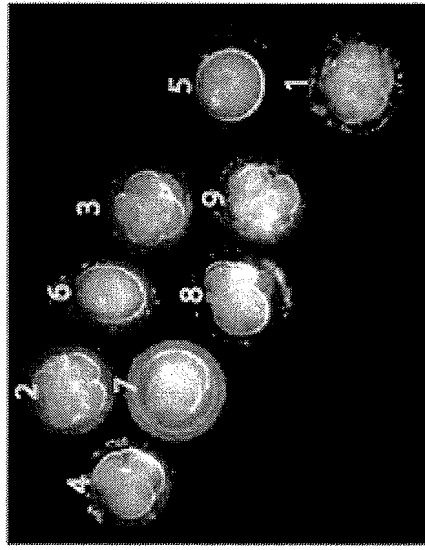


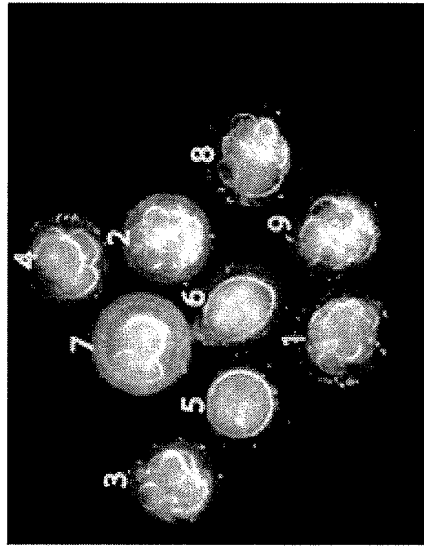
Fig. 24



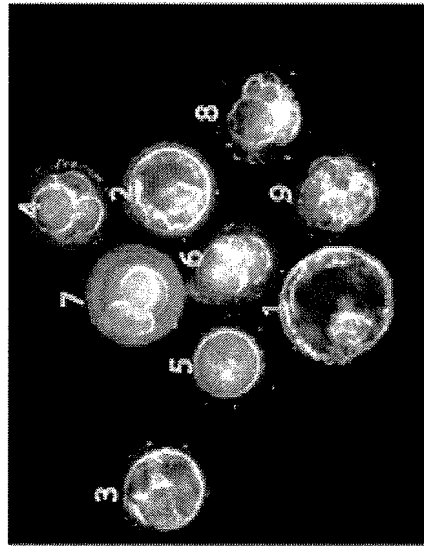
(a) Experimento 2, Estación 2, Día 1



(b) Experimento 2, Estación 2, Día 2.5



(c) Experimento 2, Estación 2, Día 4



(d) Experimento 2, Estación 2, Día 5.5

Fig. 25

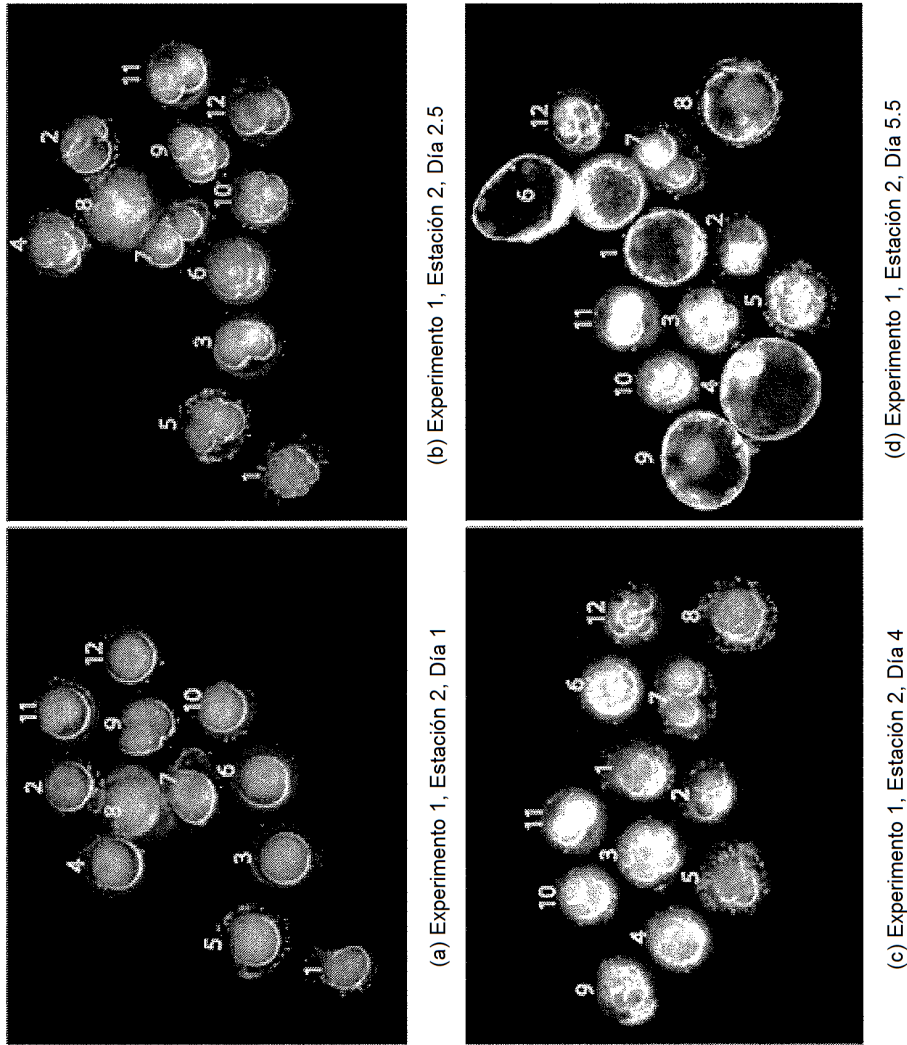


Fig. 26

Todas las tolerancias en la placa (micropocillos excluidos) son de $\pm .050\text{mm}$

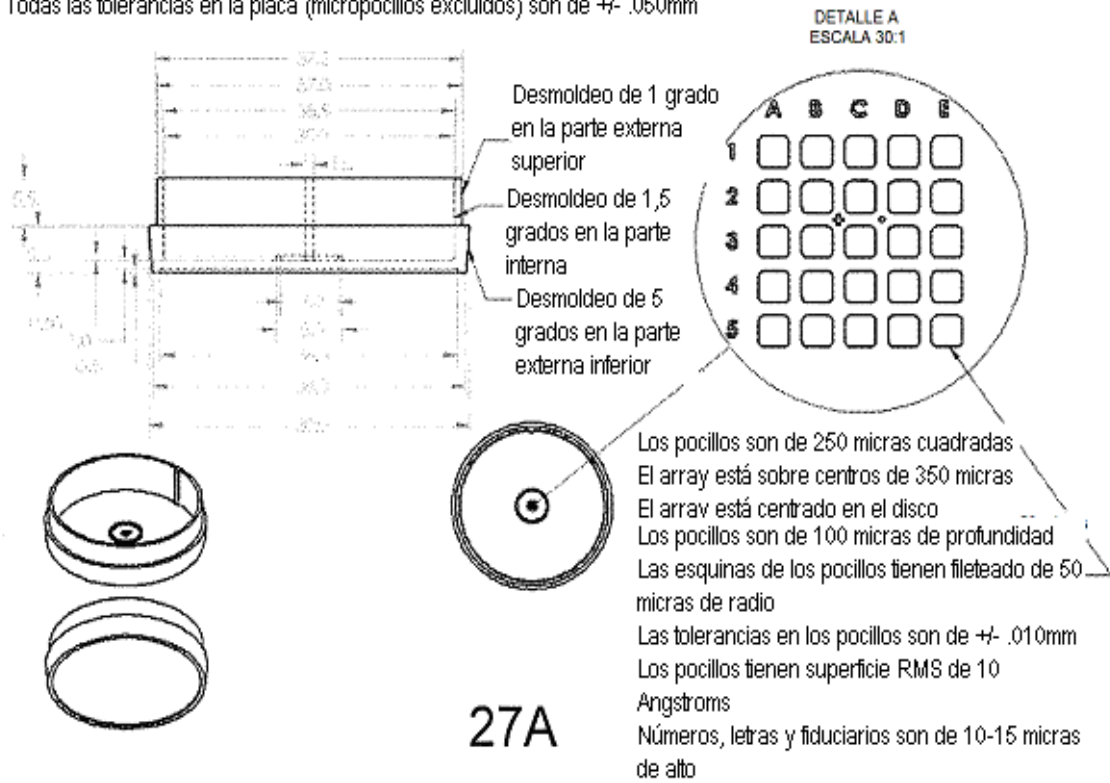
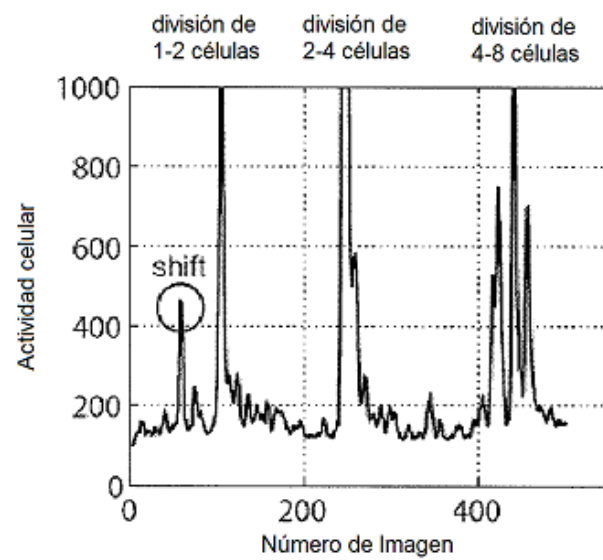
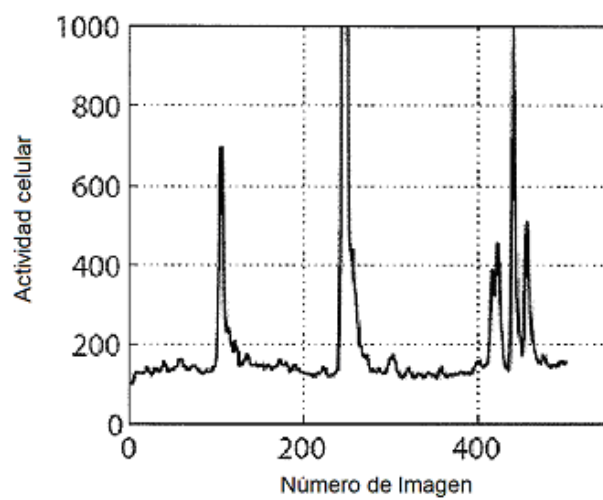


Fig. 27



(a) Sin registro de imagen previa



(b) Sin registro de imagen previa

Fig. 28

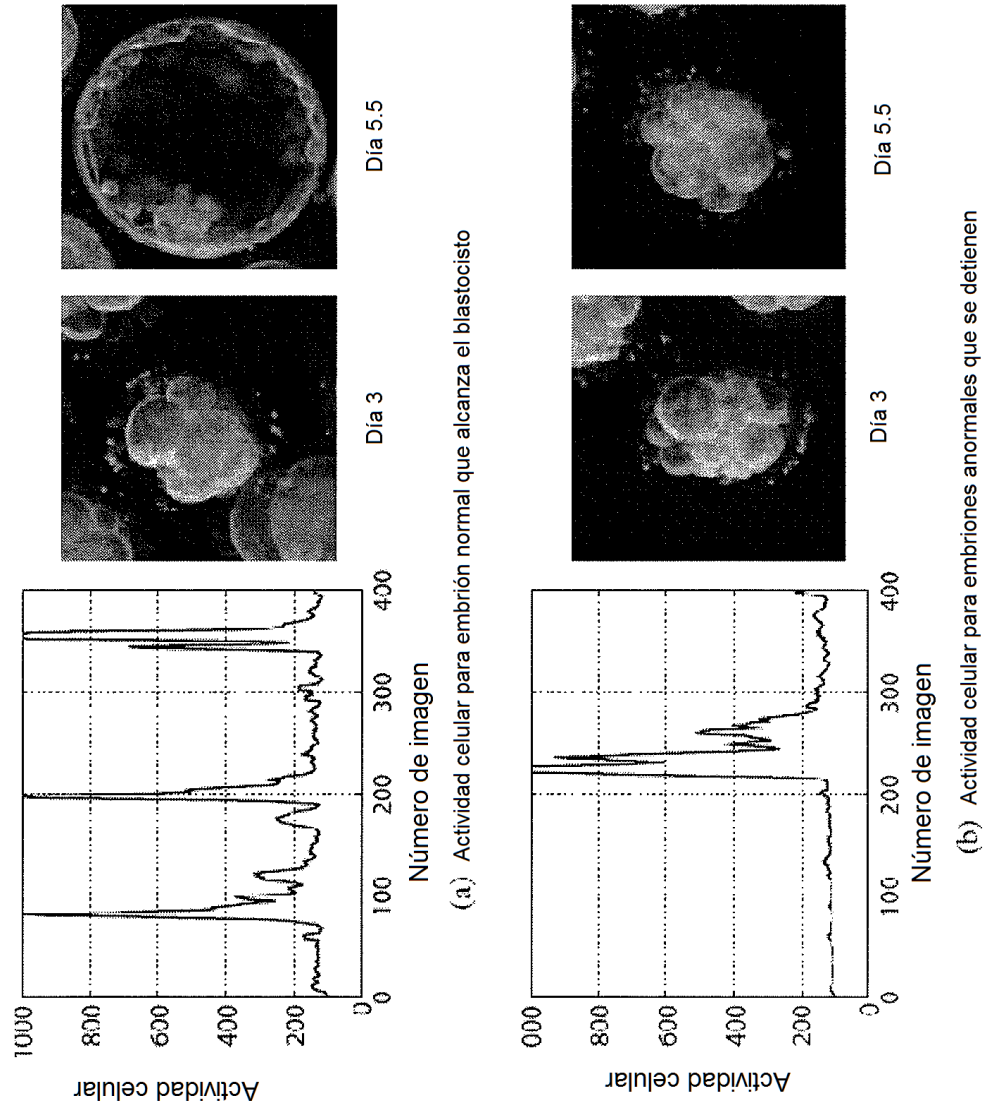


Fig. 29

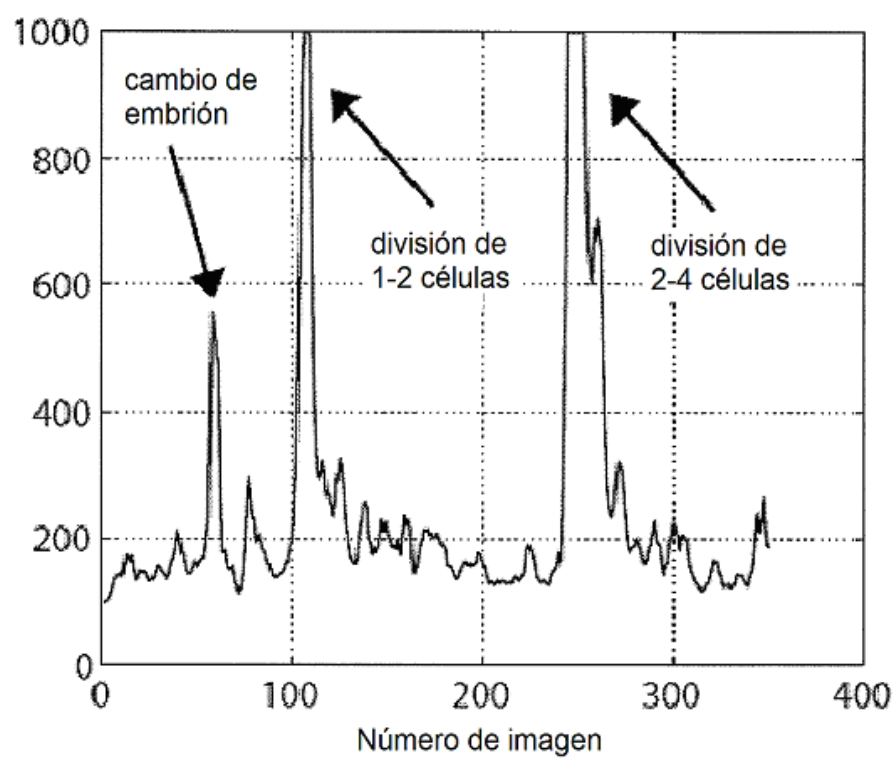


Fig. 30

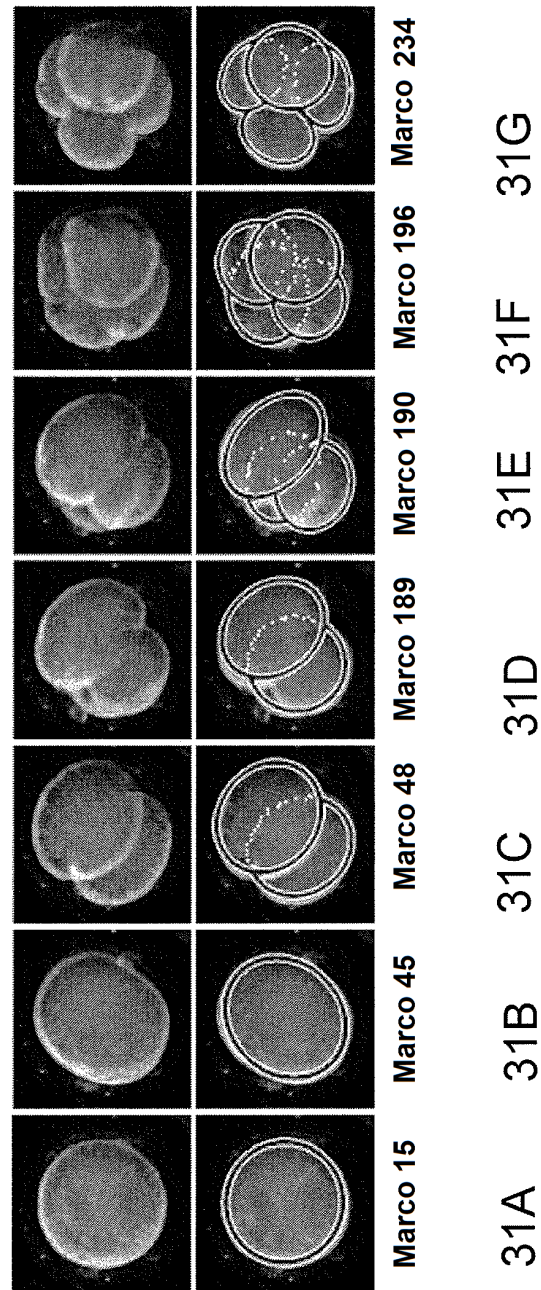
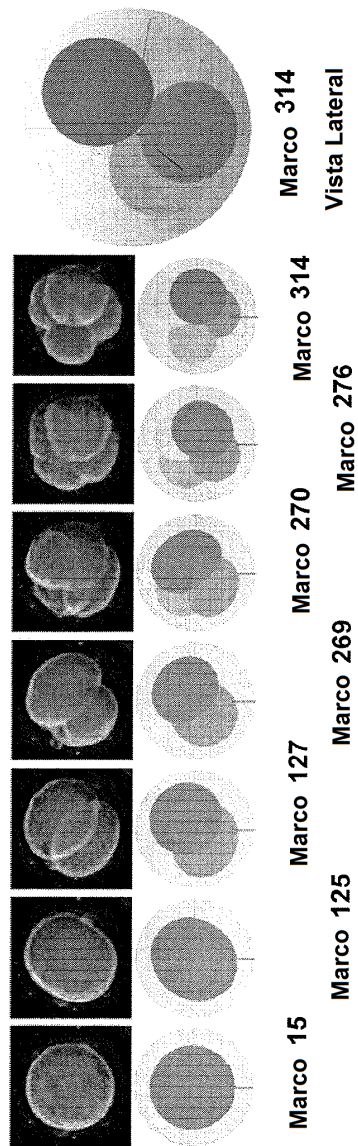
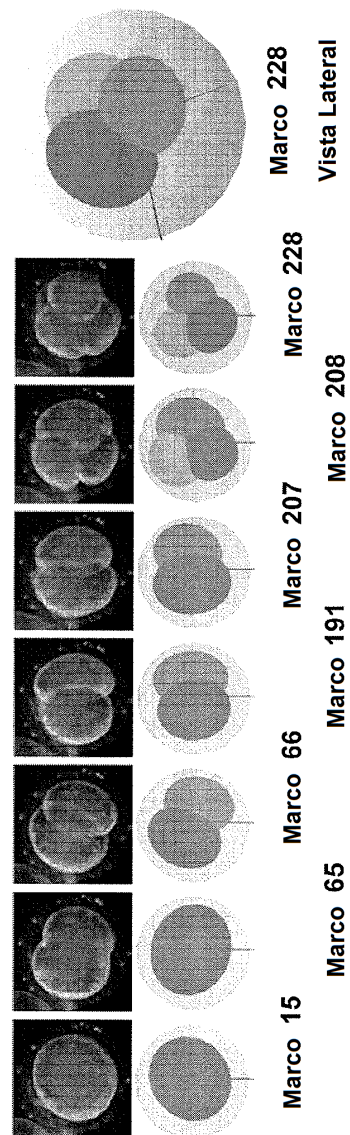


Fig. 31



31A



32B

Fig. 32

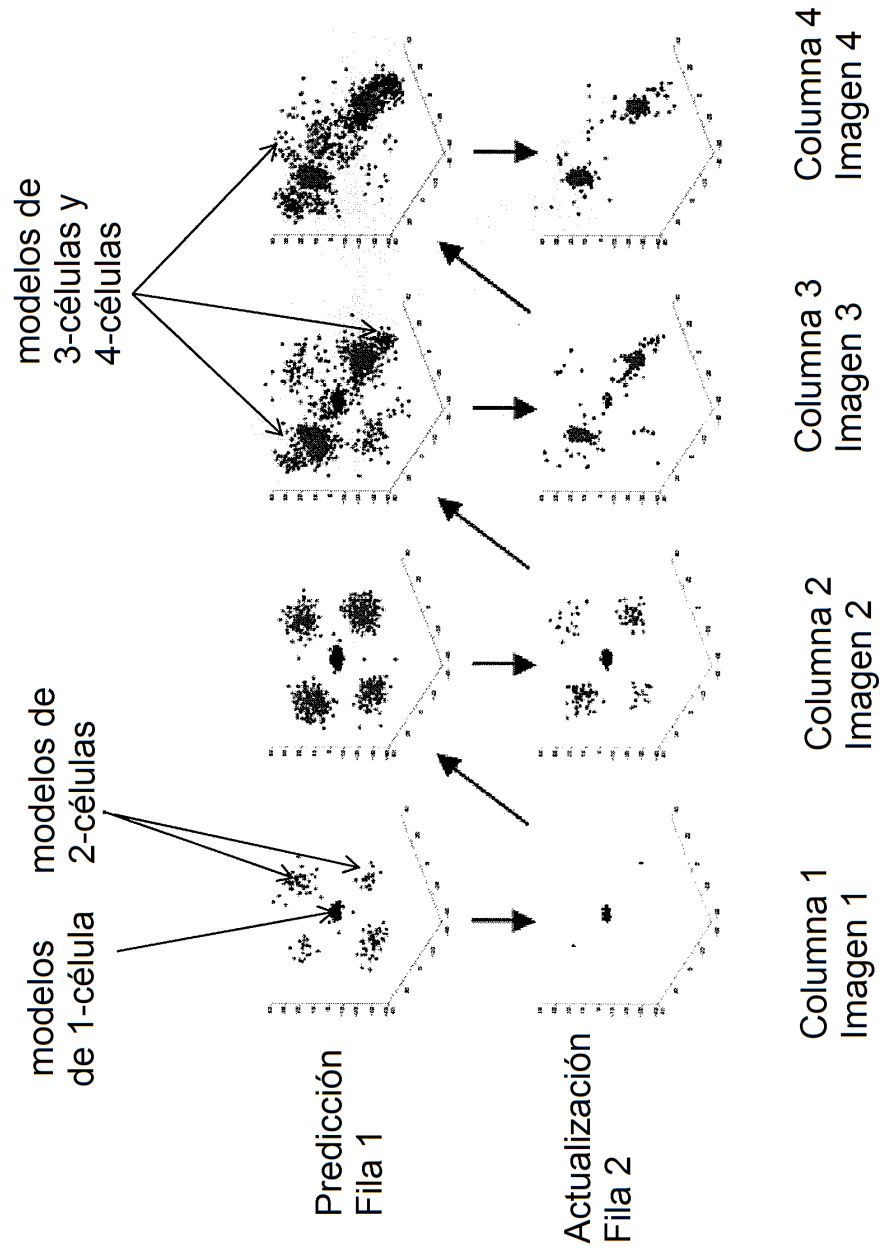
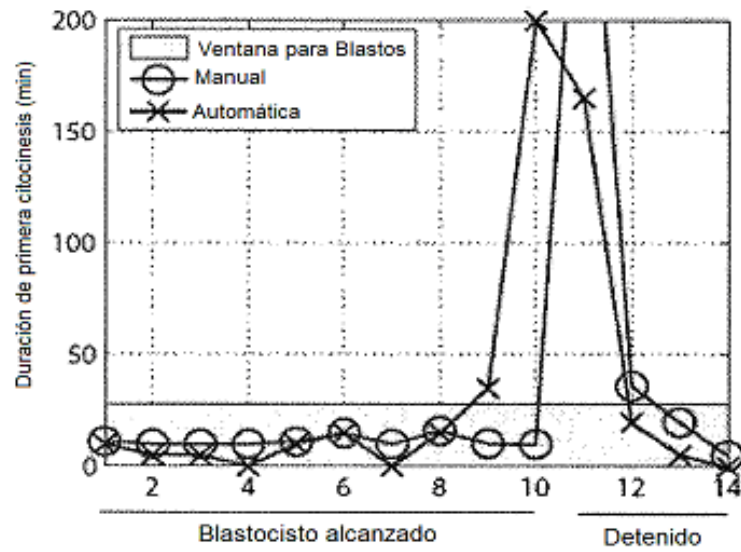
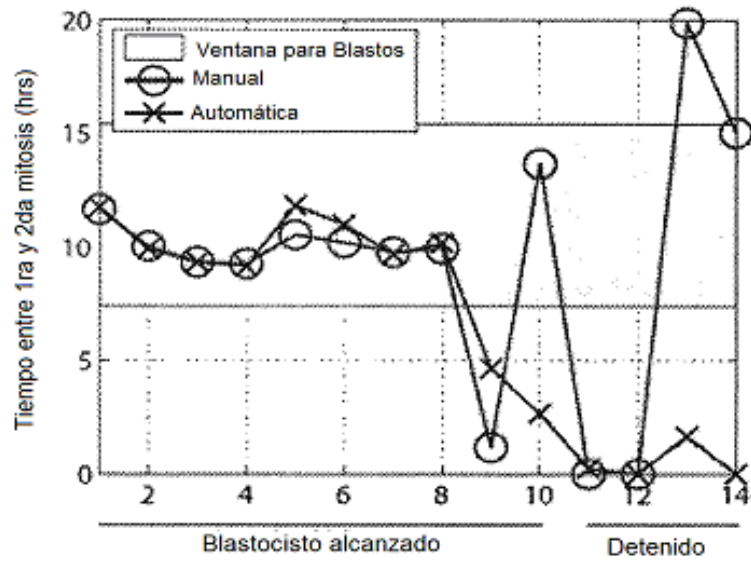


Fig. 33



(a) Duración de primera citocinesis



(b) Tiempo entre 1ra y 2da mitosis

Fig. 34

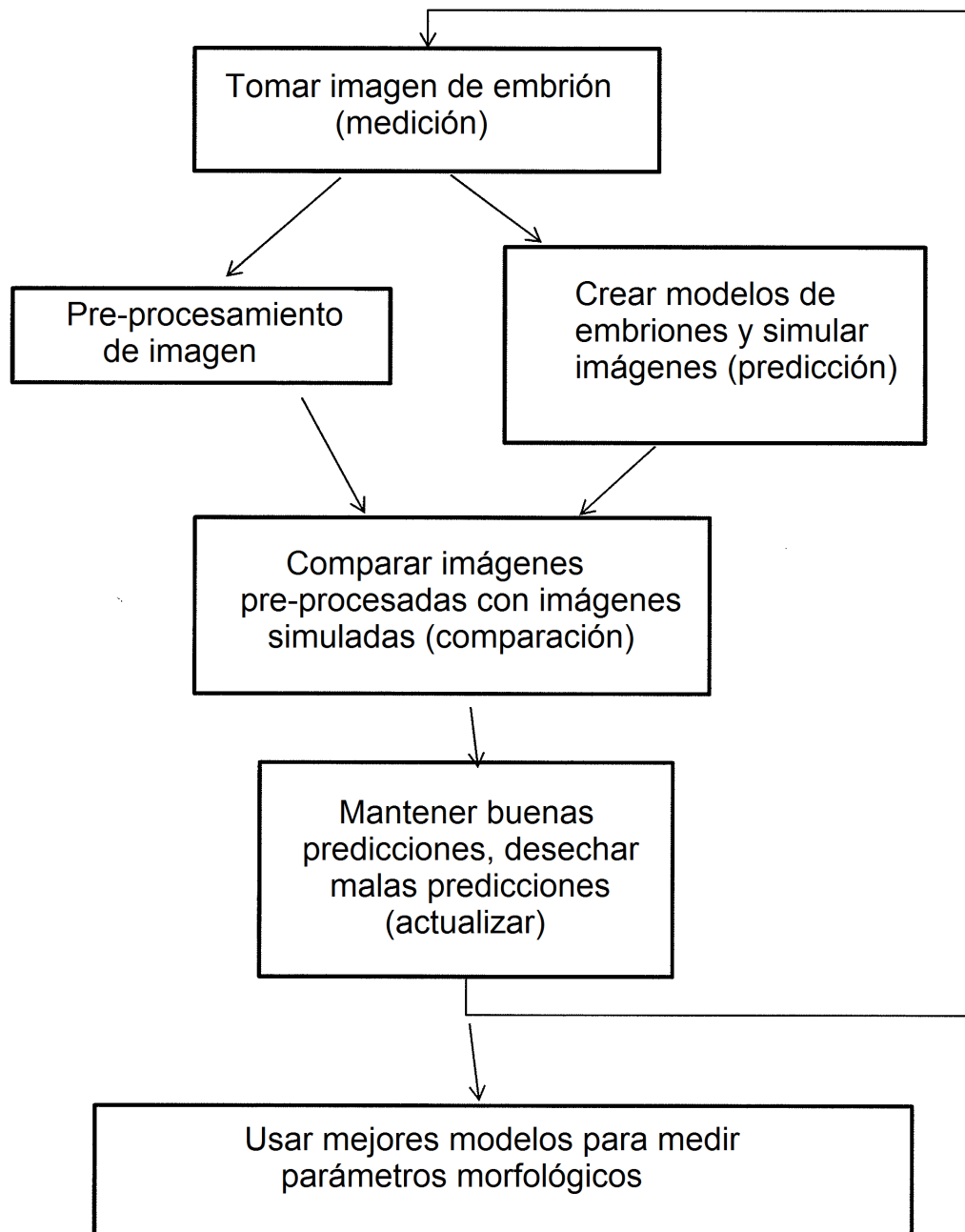


Fig. 35