

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 417 142**

51 Int. Cl.:

**G01N 21/64** (2006.01)

**A61B 17/435** (2006.01)

**A61B 5/00** (2006.01)

**G01N 21/31** (2006.01)

**G01N 33/50** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.08.2006 E 06795387 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2013 EP 1979472**

54 Título: **Determinación metabólica en tecnología de reproducción asistida**

30 Prioridad:

**09.01.2006 US 757242 P**

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

**06.08.2013**

73 Titular/es:

**THE ROYAL INSTITUTION FOR THE  
ADVANCEMENT OF LEARNING/MCGILL  
UNIVERSITY (100.0%)  
845 SHERBROOKE STREET WEST  
MONTREAL, QUEBEC H3A 2T5, CA**

72 Inventor/es:

**BURNS, DAVID, HUGH**

74 Agente/Representante:

**PONTI SALES, Adelaida**

**ES 2 417 142 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

Determinación metabolómica en tecnología de reproducción asistida

5 **REFERENCIA CRUZADA RELATIVA A SOLICITUDES RELACIONADAS**

[0001] Esta invención reivindica prioridad sobre la solicitud provisional con número de serie 60/757.242, presentada el 9 de enero de 2006.

10 **ÁMBITO TÉCNICO**

[0002] La presente invención se refiere a la determinación del estado de una célula que intercambia metabolitos con un medio fluido mediante el análisis de los metabolitos en el medio fluido, y a usos de la misma.

15 **ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN****Metabolómica**

[0003] Al completarse la secuenciación del genoma humano, se hizo apreciable que la información genética por sí misma es incapaz de proporcionar una caracterización integral del funcionamiento bioquímico y celular de sistemas biológicos complejos. Como resultado, el objetivo de muchas investigaciones de biología molecular está cambiando hacia la proteómica y la metabolómica, que se definen ampliamente como el análisis sistemático de proteínas y de moléculas pequeñas tales como polipéptidos, hormonas y neurotransmisores (y sus metabolitos) en un entorno fisiológico tal como una muestra biológica, una célula, un tejido o un organismo. Debido a que las proteínas y los metabolitos son mucho más numerosos, diversos y frágiles que los genes, las herramientas existentes para su descubrimiento, identificación y cuantificación no cubren las necesidades de los investigadores o de los profesionales clínicos.

[0004] Un aspecto importante de la proteómica es la identificación de las proteínas con mutaciones inherentes o niveles de expresión alterados. Las diferencias en los niveles de proteínas y de metabolitos con el tiempo o entre poblaciones pueden correlacionarse con estados patológicos, regímenes farmacológicos o alteraciones del metabolismo. Las especies moleculares identificadas pueden servir como marcadores biológicos (biomarcadores) de la enfermedad o el trastorno en cuestión, permitiendo así el desarrollo de nuevos procedimientos de diagnóstico, pronóstico y control de la enfermedad o ajustarse más adecuadamente para el paciente. Con objeto de descubrir dichos marcadores biológicos, resulta útil obtener unas mediciones precisas de las diferencias relativas en los niveles de proteínas y de metabolitos entre los diferentes tipos de muestras, un proceso denominado fenotipado diferencial.

**Tratamiento de fecundación *in vitro***

[0005] El ámbito de las tecnologías de reproducción asistida (TRA), incluyendo la FIV, tanto si se aplican en seres humanos como en animales, es de alguna forma una ciencia inexacta o un arte. La capacidad de valorar la viabilidad de los espermatozoides (células espermáticas), de los ovocitos (óvulos) y de los embriones se realiza esencialmente por su aspecto visual bajo el microscopio. En muchos casos, el aspecto visual de estas células no se correlaciona con su viabilidad. No hay disponible otra información sobre lo que se está produciendo las células para guiar en el proceso a los especialistas de las TRA disponibles. Todo el procedimiento se realiza con la esperanza de que se seleccionen los gametos viables y que estos gametos produzcan embriones viables que se implantarán con éxito en un útero y se desarrollarán para producir una descendencia sana. Aunque con las pruebas genéticas en embriones mediante la extracción de una célula es posible determinar al menos algunos factores de viabilidad, dicho procedimiento "invasivo" puede afectar negativamente al embrión. Actualmente no existe ninguna técnica que permita a los embriólogos y otros especialistas de las TRA valorar eficazmente la viabilidad de estas células para procedimientos de TRA.

[0006] La FIV ha demostrado ser la alternativa más viable disponible para parejas infértiles, y cada vez está siendo más reconocida como el procedimiento apropiado "de primera línea" sobre otras opciones de tratamiento.

[0007] Los procedimientos de FIV pueden subdividirse en seis amplias etapas de procedimiento: 1) estimulación de la hembra usando fármacos hormonales de fertilidad para producir una gran cohorte de población de ovocitos; 2) recuperación de los ovocitos; 3) recolección y preparación de los gametos masculinos, seguido de la fertilización del óvulo; 4) cultivo de los cigotos/embriones resultantes en medio de crecimiento; 5) selección de los embriones, y finalmente 6) transferencia de los embriones. Típicamente, los acontecimientos clave que comprenden la implantación del embrión y el embarazo no se consideran parte del proceso de FIV ya que están fuera del control del procedimiento *per se*. En la práctica actual de la FIV, se asume que los ovocitos y los embriones que se eligen para el procedimiento son viables o están sanos, basándose principalmente en criterios morfológicos subjetivos y en patrones de desarrollo (en el caso de los embriones); no hay disponibles mediciones biológicas que ayuden en este

proceso de selección tan crítico. Los embriones no usados típicamente son crioconservados.

**[0008]** Los servicios de las TRA ahora hacen posible ofrecer opciones de tratamiento también a pacientes que *a priori* no son infértiles, pero que desearían dar un empujón o controlar el "entorno biológico para mejorar y/o preservar su función reproductora (o fertilidad) (preservación de la fertilidad). La aplicación de los servicios de las TRA a una población por lo demás normal y fértil ha creado un nuevo paradigma terapéutico de Preservación de la Fertilidad. La necesidad de un retraso en la fertilidad controlada puede apreciarse adicionalmente, por ejemplo, si una paciente está bajo quimioterapia, con lo que la función reproductora puede verse alterada.

**[0009]** Actualmente no existen criterios biológicos prácticos ni procedimientos analíticos que permitan la selección de los ovocitos, del espermatozoides o de los embriones para asegurar la eficacia o la seguridad del procedimiento de FIV. Consecuentemente, sin unas metodologías analíticas disponibles para valorar de forma fiable la competencia de los ovocitos al inicio del procedimiento de FIV, los embriólogos han recurrido a unos criterios de desarrollo embrionarios subjetivos no estandarizados y a la embriología como indicadores de la calidad del embrión y, por inferencia, de la calidad del ovocito original.

**[0010]** El documento HUMAN REPRODUCTION, vol. 15 nº 8, páginas 1667 - 1671, 00-00-2000 THOMAS NON Y COL.: "Fourier transform infrared spectroscopy of follicular fluids from large and small antral follicles" desvela un procedimiento que usa (la absorción) de espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR) para obtener las "huellas biológicas" para la constitución de los fluidos foliculares a partir de folículos antrales luteinizados grandes y pequeños.

**[0011]** Los espectros son sometidos a un procesamiento numérico que comprende, por ejemplo, un análisis de función discriminadora de la primera derivada del espectro de FTIR, junto con un análisis del agregado jerárquico usado para construir un dendrograma que demuestra que el fluido procedente de los folículos grandes formaba un agregado homogéneo estrechamente relacionado, mientras que el procedente de folículos pequeños era distinto del de los grandes, y de naturaleza heterogénea. Se formó una red neural artificial, y tras su validación con un conjunto de ensayos independientes, distinguió con éxito los fluidos foliculares de los folículos grandes y pequeños. Las concentraciones de los esteroides sexuales en los fluidos de los folículos grandes y pequeños eran significativamente diferentes. Estos resultados demuestran que el fluido de los folículos grandes tiene una naturaleza y una bioquímica distintas a la de los folículos pequeños, pero el grado de homogeneidad implica que se han producido cambios específicos de tamaño. Esto puede tener consecuencias para el potencial de desarrollo del ovocito.

**[0012]** En la página 1671, párrafos 1 - 3, este documento desvela adicionalmente la etapa de determinación de los espectros de un metabolito en vista del hecho de que los espectros de FTIR mostrados en la Fig. 1 estarán determinados por los componentes del fluido folicular, que incluye metabolitos en forma de hormonas tales como estradiol y progesterona, es decir, esteroides sexuales, según se desvela en la página 1670, que variará considerablemente entre el fluido de los folículos grandes y el de los folículos pequeños, afectando, entre otros, a la heterogeneidad del fluido de los folículos más pequeños. Aunque la enseñanza central es que la etapa de desarrollo de un folículo (es decir, si es grande o pequeño) puede ser determinada mediante un análisis por FTIR del fluido folicular que produce (véanse los dos penúltimos párrafos de la página 1671), este pasaje también contiene la afirmación de que "un trabajo adicional investigará esta premisa (que la etapa de desarrollo de un folículo puede ser determinada a partir de una diferencia en la naturaleza y en la bioquímica de los fluidos debida, entre otros, a metabolitos tales como las hormonas) y relaciona los espectros de FTIR de un fluido folicular con la capacidad de desarrollo del ovocito que está contenido en el folículo". Este enunciado, junto con su desvelación en el contexto de "recuperación de ovocitos de pacientes que experimentan una FIV rutinaria (fecundación *in vitro*) y una ICSI (inyección intracitoplasmática de espermatozoides)" comprende una desvelación explícita del análisis del espectro (FTIR) de al menos un metabolito en un medio fluido y la generación de datos probabilísticos (la capacidad de desarrollo de un ovocito en el contexto de una FIV es una medición de las probabilidades de una conclusión con éxito de la FIV usando un ovocito dado) usando el espectro adquirido y la correlación establecida (la fase de prueba del análisis numérico discutido en la página 1670, col. 1, líneas 25 - 35).

## RESUMEN DE LA INVENCION

**[0013]** Se ha identificado una nueva plataforma tecnológica basada en la confluencia de dos disciplinas científicas: (1) la bioespectroscopía, la aplicación de diferentes formas de análisis espectroscópicos en la biología humana que puede usarse para identificar, cuantificar y validar biomarcadores proteómicos y moleculares diagnósticos; y (2) la metabolómica, la ciencia que examina e integra la interacción dinámica entre múltiples pequeños biomarcadores moleculares en una muestra biológica (tanto en fluidos como en tejidos sólidos) para comprender los complejos procesos y funciones biológicas. La metabolómica puede emplearse para investigar los cambios en los perfiles metabólicos en tejidos y/o en tipos celulares.

**[0014]** El término metabolómica basada en bioespectroscopía (BSM) se usa aquí para describir esta plataforma tecnológica. La plataforma de la BSM se usa en este documento para analizar las características

proteómicas y de los biomarcadores moleculares de una muestra, cuando los datos se convierten en un único "perfil metabolómico" usando la informática. Cada perfil se traduce en una única "huella" o "firma" que define el estado metabólico de la muestra objetivo, y por lo tanto, del paciente del que procede la muestra. Puede emplearse el "perfilado metabolómico" para distinguir sistemáticamente entre las a menudo sutiles diferencias que separan la fisiología normal de la aparición o la progresión de una enfermedad, o la respuesta de un individuo a la farmacoterapia.

**[0015]** Por lo tanto, sin limitar el ámbito de la invención, puede apreciarse que la BSM tiene una amplia aplicación en la salud humana y animal. Dicha amplia aplicación de la plataforma tecnológica de la BSM incluye, pero no se limita a: (1) valoración no invasiva, de diagnóstico molecular y de pronóstico, como por ejemplo, en la enfermedad de Alzheimer (AD), monitorización de la salud maternofetal y metodologías de fecundación *in vitro*, y (2) estrategias basadas en el farmacodiagnóstico para el descubrimiento y el desarrollo de fármacos usando el perfilado metabolómico para identificar marcadores alternativos de eficacia y seguridad. Estas aplicaciones emplean el perfilado metabolómico basado en biomarcadores usando la aplicación específica engendrada en la tecnología de la BSM.

**[0016]** Se ha demostrado que diversas formas de los análisis bioespectroscópicos son útiles para la monitorización no invasiva *in vivo* de diversos tejidos, órganos y fluidos. Los análisis *in vitro* de un tejido sólido, de células individuales y de fluidos biológicos también se realizan usando esta metodología. La bioespectroscopía tiene muchas ventajas, que incluyen simplicidad, precisión y especificidad, facilidad de uso, análisis rápido, bajo coste de la instrumentación, medición simultánea de múltiples analitos en una única muestra y la ventaja de una monitorización continua en tiempo real tanto en el centro de atención como en un análisis remoto. Usando la plataforma de la BSM, ahora se puede realizar un análisis metabolómico sofisticado a alta velocidad en menos de un minuto con muestras líquidas tan pequeñas como de 20 microlitros, usando un pequeño dispositivo.

**[0017]** La metabolómica es una valiosa extensión de la creciente comprensión de la interacción de los genes y las proteínas. Las comunidades médica y científica se están dando cuenta ahora de que la genómica, la transcriptómica y la proteómica son sólo una pequeña parte de la homeostasis. Mientras que el genoma es representativo de lo que podría ser, y el proteoma define lo que se ha expresado, es el metaboloma lo que representa el estado funcional en tiempo real de la célula, el tejido, el órgano o el individuo con respecto a la salud y la enfermedad. Los efectos acumulativos de todos los "episodios secuencia abajo" de las proteínas expresadas y las modificaciones en las proteínas están representados en un conjunto de pequeñas moléculas que reflejan el estado funcional de la célula. El perfilado de este inventario molecular (el metaboloma) proporciona una correlación entre la salud, la enfermedad, el envejecimiento y los efectos de los fármacos y los xenobióticos sobre una célula en su entorno. Por lo tanto, la capacidad para capturar esta información ofrece la ventaja tecnológica del diagnóstico molecular, el pronóstico y el descubrimiento de fármacos a través de muchas disciplinas científicas. Ofrece al médico la inestimable capacidad de tomar decisiones en múltiples contextos clínicos.

**[0018]** El ámbito de la salud reproductora incluye la función reproductora normal, así como el fracaso reproductor y la infertilidad. El perfil metabolómico de los biomarcadores en el campo de la salud reproductora, y más particularmente en las tecnologías de reproducción asistida (TRA) no se ha explorado. Se ha descubierto que puede usarse el perfilado de biomarcadores de forma fiable para identificar ovocitos, espermatozoides y embriones viables y biológicamente competentes, con objeto de mejorar el resultado del tratamiento (embarazo) en los procedimientos de fecundación *in vitro* (FIV), así como para reducir el riesgo de partos múltiples permitiendo una preselección racional de menos embriones para transferir, pero únicamente los viables.

**[0019]** Por lo tanto, sería una significativa contribución a la técnica proporcionar un procedimiento para determinar el perfil metabólico de una muestra útil para la determinación, por ejemplo, de la viabilidad de un ovocito, de un espermatozoide o de un embrión, y por lo tanto, la probabilidad de éxito de cualquier procedimiento adicional de fecundación *in vitro* y métodos relacionados mediante la medición óptica de los fluidos corporales y de los medios de cultivo de los gametos o de los embriones usados en los procedimientos de laboratorio relacionados con la FIV.

**[0020]** Sería altamente deseable disponer de un procedimiento para determinar el estado de una célula que intercambia metabolitos con un medio fluido mediante el análisis de los metabolitos del medio fluido. Las células pueden ser células que están creciendo en un medio de cultivo adecuado, tal como un embrión o células madre. Las células pueden ser de la pared uterina, y el medio fluido puede ser el fluido endometrial.

**[0021]** En el texto subsiguiente, siempre que se usen las palabras "aspecto" "forma de realización" o "ejemplo" no debe entenderse como que están de acuerdo con la presente invención excepto cuando esto se indique explícitamente.

**[0022]** La presente desvelación proporciona un procedimiento para determinar el estado de una célula que intercambia metabolitos con un medio fluido mediante el análisis de los metabolitos del medio fluido.

**[0023]** La presente desvelación también proporciona un sistema y un procedimiento para determinar el perfil

metabólico de una muestra, útil para la determinación, por ejemplo, de la probabilidad de éxito de procedimientos de fecundación *in vitro* y procedimiento relacionados, mediante la medición óptica de los fluidos corporales y del medio de cultivo de gametos o de embriones usado en los procedimientos relacionados del laboratorio de FIV.

5 **[0024]** También se desvela un procedimiento y un aparato para correlacionar los espectros, tales como una longitud de onda individual que incluye fluorescencia, absorción óptica de múltiples longitudes de onda, espectros de dispersión de Raman o espectros de resonancia magnética de metabolitos en fluidos, tales como fluidos corporales, medios de cultivo de gametos o de embriones, en los que dichos espectros con el estado de al menos una célula, incluyendo un gameto o una pluralidad de células en un embrión.

10 **[0025]** En algunas formas de realización se proporciona un procedimiento de tecnologías de reproducción asistida (TRA). Este procedimiento combina el crecimiento *in vitro* de al menos un embrión en un medio de cultivo, el ensayo analítico del medio de cultivo del al menos un embrión para determinar el estado del embrión, y el uso del estado del embrión para determinar al menos uno de:

15 un momento para transferir el embrión al útero;  
 un momento para someter al embrión a un almacenamiento a corto plazo para futuras transferencias a un útero;  
 un momento para someter el embrión a una crioconservación para futuras transferencias a un útero;  
 un ajuste al medio de cultivo para continuar el crecimiento del embrión; y  
 20 un momento para transferir el embrión a un medio de cultivo diferente para continuar el crecimiento del embrión.

**[0026]** En algunas formas de realización, este procedimiento comprende adicionalmente la determinación de la viabilidad del ovocito, del espermatozoide y del útero mediante el ensayo analítico de los respectivos fluido folicular, plasma seminal y fluido de revestimiento uterino, en las que el embrión individual es transferido cuando la  
 25 viabilidad del ovocito, del espermatozoide, y del útero indica una buena probabilidad implantación o de embarazo para la transferencia del embrión.

**[0027]** El embrión puede obtenerse mediante una fecundación *in vitro* fertilizando al menos un ovocito usando espermatozoides.

30 **[0028]** En alguna forma de realización, el ajuste al medio de cultivo se determina repetidamente según crece el embrión.

**[0029]** En la FIV convencional, no hay disponible información fiable sobre la viabilidad de un embrión, y por  
 35 ello la transferencia a menudo se retrasa dado que es probable que un embrión que sobrevive hasta el día 3, 4 ó 5 sea más viable. Sin embargo, es deseable transferir un embrión del que se sabe que es (o que tiene una indicación de una buena probabilidad de ser) viable, tan pronto como sea posible. El estado de viabilidad del embrión puede aumentar según se desarrolla el embrión hasta cierto punto de madurez, tal como el día 2, sin embargo, en algunos embriones, la viabilidad puede no aumentar significativamente más según madura el embrión *in vitro*. Por lo tanto,  
 40 en algunas formas de realización, se determina el momento de transferencia del embrión como el momento más temprano en el que el embrión alcanza un buen umbral de probabilidad de implantación.

**[0030]** Se apreciará que la presente invención puede aplicarse, sin limitación, a mamíferos, por ejemplo a seres humanos, bovinos, equinos, felinos, caninos, caprinos y cetáceos.

45 **[0031]** Cuando se fecundan varios ovocitos y crecen varios embriones, pueden seleccionarse los embriones para su transferencia usando al menos el estado determinado.

**[0032]** El ensayo analítico puede comprender la obtención de un espectro del medio de cultivo. En algunas formas de realización, el espectro se calibra determinando una correlación efectiva entre el espectro registrado del medio de cultivo de varios embriones y el éxito de embarazo registrado usando varios de los embriones, y el estado se determina a partir de la realización de la correlación del espectro. En algunas formas de realización, el espectro es un espectro óptico. El espectro puede contener información relacionada con los componentes de estrés oxidativo del medio de cultivo.

55 **[0033]** Cuando el embrión es crioconservado, puede obtenerse periódicamente un espectro del medio de cultivo crioconservado, y puede determinarse el estado a partir del espectro óptico del medio de cultivo crioconservado para monitorizar al embrión crioconservado durante la crioconservación.

60 **[0034]** En algunas formas de realización, se proporciona un procedimiento de tecnología de reproducción asistida (TRA). Este procedimiento comprende la extracción de varios ovocitos en su propio fluido folicular, el ensayo analítico del fluido folicular de cada uno de los ovocitos para determinar el estado del ovocito, y la selección de los ovocitos, usando el estado para uno de crioconservación y fertilización. El ensayo analítico del fluido folicular es esencialmente el mismo que el de un medio de cultivo.

65

- 5 **[0035]** Según la invención, se proporciona un procedimiento para generar datos probabilísticos del resultado exitoso de un procedimiento de salud reproductora en un paciente. Este procedimiento comprende adquirir, para al menos un embrión que intercambia metabolitos con un medio de cultivo, un espectro de al menos un metabolito del medio de cultivo usando una modalidad analítica elegida, y generar datos probabilísticos para el al menos un embrión usando el espectro adquirido y una correlación establecida entre el resultado exitoso de un procedimiento de salud reproductora y el espectro de un metabolito del medio de cultivo obtenido usando la modalidad analítica elegida para una población de pacientes. El ensayo analítico de estos medios fluidos es esencialmente el mismo.
- 10 **[0036]** La modalidad analítica puede ser la absorción óptica de una o de múltiples longitudes de onda, la dispersión de Raman o la fluorescencia óptica. El espectro óptico puede estar en el intervalo de longitud de onda corta del infrarrojo cercano. La modalidad analítica elegida también puede ser RMN.
- 15 **[0037]** El procedimiento de salud reproductora puede estar relacionado con preeclampsia, IAI o inflamación intraamniótica, parto/nacimiento prematuro, aborto natural/provocado recurrente, implantación de embriones, determinación del sexo, contaminación medioambiental/infección, embarazo ectópico, embarazo normal o endometriosis.
- 20 **[0038]** En otras formas de realización, la desvelación proporciona un procedimiento de tecnología de reproducción asistida (TRA). Este procedimiento comprende proporcionar una muestra de uno o más espermatozoides en plasma seminal, ensayar analíticamente el plasma de los espermatozoides para determinar el estado de los espermatozoides y seleccionar los espermatozoides usando el estado para uno de crioconservación y fertilización.
- 25 **[0039]** En otras formas de realización, la desvelación proporciona un procedimiento de tecnología de reproducción asistida (TRA). Este procedimiento comprende el ensayo analítico del fluido endometrial de una paciente para determinar la viabilidad del útero para la implantación de un embrión, y la determinación de un momento de implantación usando la viabilidad. Por ejemplo, si la viabilidad es baja, se repite el ensayo, y se determina el momento de implantación cuando la viabilidad sea mayor. Por ejemplo, puede proporcionarse al menos uno de dieta, reposo/ejercicio e intervención medicinal a la paciente para mejorar la viabilidad.
- 30 **[0040]** El fluido endometrial puede medirse ópticamente *in situ*, y el ensayo analítico implica entonces la obtención de un espectro óptico.
- 35 **[0041]** En algunas formas de realización, se proporciona un procedimiento para determinar el estado de una célula que intercambia metabolitos con un medio fluido. Este procedimiento combina la adquisición de un espectro para al menos una célula de al menos un metabolito del medio fluido usando una modalidad analítica elegida, y generar datos probabilísticos para la al menos una célula usando el espectro adquirido y una correlación establecida entre el estado de al menos una célula y el espectro de un metabolito en un medio fluido obtenido usando la modalidad analítica elegida para una población de células.
- 40 **[0042]** En algunas formas de realización, la modalidad analítica es espectroscopía óptica, tal como dispersión óptica de Raman, absorción óptica o fluorescencia óptica. En algunas formas de realización, el espectro óptico proporciona información sobre el estrés oxidativo del medio fluido.
- 45 **[0043]** En otras formas de realización, se proporciona un procedimiento para mantener o hacer crecer una o más células en un medio de cultivo. Este procedimiento comprende ajustar el medio de cultivo usando un estado de las células determinado a partir de un espectro del medio de cultivo obtenido usando una modalidad analítica elegida.
- 50 **[0044]** En algunas formas de realización, se proporciona un aparato para controlar el cultivo de una o más células que crecen *in vitro* en un medio de cultivo. Este aparato combina un dispositivo de adquisición de espectros para adquirir un espectro del medio de cultivo, una base de datos de datos de correlación que relaciona los datos espectrales con un estado de las células, un procesador de determinación del estado que genera datos que representan el estado usando los datos de correlación del espectro, un controlador del medio de cultivo que genera señales de control para efectuar un ajuste en el medio de cultivo en respuesta a los datos que representan el estado. El controlador puede estar totalmente automatizado, y por lo tanto controlar las válvulas y los interruptores para cambiar los parámetros del medio de cultivo, o puede proporcionar un informe a un técnico para que realice el ajuste requerido. En algunas formas de realización, el espectro contiene información relativa al estrés oxidativo de al menos un componente del medio de cultivo.
- 55 **[0045]** Como ejemplo, el ajuste al medio de cultivo puede ser de la temperatura ambiental o de la composición gaseosa, tal como el oxígeno disuelto. Asimismo, el ajuste puede ser una adición de una sustancia al medio de cultivo, por ejemplo, para modificar el pH o añadir proteínas. En otros casos, es apropiado que el ajuste sea una sustitución del medio de cultivo.
- 60 **[0045]**
- 65

- 5 [0046] El aparato puede operar para realizar cambios en el medio de cultivo usando el estado como información. El momento para que un ajuste rinda un cambio mensurable en el estado determinará típicamente la duración del ciclo del bucle de información. Por supuesto, cuando un ajuste afecta inmediatamente al espectro del medio de cultivo, el espectro se adquiere de nuevo después del ajuste, y entonces se usa el cambio en el estado según se determinó inmediatamente después del ajuste y en algún momento subsiguiente para valorar si el ajuste ha sido beneficioso para el mantenimiento o el crecimiento de las células.
- 10 [0047] Para el propósito de la presente invención, a continuación se definen los siguientes términos.
- [0048] Se pretende que el término "fluido corporal" signifique sangre completa, plasma sanguíneo, suero sanguíneo, orina, saliva, líquido lagrimal, líquido amniótico, líquido cefalorraquídeo (LCR), leche materna, fluido vaginal, fluido uterino, líquido seminal.
- 15 [0049] Se pretende que el término "medio de cultivo" signifique cualquier mezcla de nutrientes y disoluciones salinas que puede usarse para mantener células viables en un cultivo *in vitro* en el laboratorio, incluyendo gametos y embriones. Con algunas modalidades analíticas, tales como la espectroscopía óptica, el medio de cultivo puede estar congelado sin que esto afecte a la capacidad para obtener espectros útiles.
- 20 [0050] Se pretende que el término "paciente" signifique un sujeto que va a ser investigado, observado, monitorizado o estudiado, ya sea humano o animal.
- [0051] Se pretende que el término "no invasivo" incluya la espectroscopía transdérmica o transcutánea, que se realiza *in situ*, o *in vivo* a un paciente, y es mínimamente invasiva, tal como la extracción de un pequeño volumen de un fluido corporal.
- 25 [0052] Se pretende que el término "enfermedad relacionada con el estrés oxidativo" signifique un trastorno que causa estrés oxidativo o está causado por, o depende, del estrés oxidativo.
- [0053] Se pretende que el término "componente de estrés oxidativo" signifique la alteración en el equilibrio prooxidante/antioxidante de un componente bioquímico de un medio de cultivo de fluido corporal o de otra muestra en investigación, a favor del primero, dando lugar a un posible daño celular. Asimismo, se entiende que "componentes de estrés oxidativo" significa dicha alteración en el equilibrio prooxidante/antioxidante de una pluralidad de componentes bioquímicos del medio de cultivo de fluido corporal o de otra muestra en investigación a favor del primero, dando lugar a un posible daño celular. Se entiende que el término "huella *redox*" significa un agregado de componentes de estrés oxidativo o subproductos biológicos del EO derivados de una espectroscopía de absorción óptica de múltiples longitudes de onda o de una espectroscopía de RMN.
- 30 [0054] El término "anticuerpo" se refiere a un polipéptido codificado sustancialmente por un gen de una inmunoglobulina o por genes de inmunoglobulinas, o a fragmentos de los mismos. Los genes de inmunoglobulinas reconocidos incluyen los genes de las regiones constantes kappa, lambda, alfa, gamma, delta, epsilon y mu, así como una infinidad de genes de las regiones variables de inmunoglobulinas. Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o epsilon, que a su vez definen las clases de inmunoglobulinas, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente.
- 40 [0055] El término "biomarcadores" o "biomarcadores objetivo" se refiere al perfil de proteínas, enzimas, péptidos, moléculas pequeñas, compuestos de estrés oxidativo u otros compuestos biológicos que están asociados con el procedimiento específico o el trastorno médico o enfermedad que se está estudiando, tal como una fecundación *in vitro* o una enfermedad de Alzheimer. Los datos relacionados con los componentes de un biomarcador específico se convierten en un nuevo "perfil metabólico" o "huella". Cada perfil se analiza típicamente usando programas informáticos patentados que correlacionan los datos con un trastorno clínico o un resultado. El perfil metabólico se usa para distinguir sistemáticamente entre las a menudo sutiles diferencias entre la fisiología normal y la aparición o la progresión de una enfermedad, o la respuesta de un individuo a un compuesto terapéutico. Esta tecnología es aplicable en numerosas disciplinas científicas y ámbitos de uso.
- 50 [0056] El término "calidad del embrión" se define como una calidad indicativa de los embriones que son competentes para su uso en subsiguientes procedimientos, y reflejan la viabilidad del embrión, para su uso en procedimientos de selección y transferencia de embriones, tales como la fecundación *in vitro* y la implantación para conseguir un embarazo, y un almacenamiento a corto plazo, y un almacenamiento a largo plazo que incluye la crioconservación. El almacenamiento a corto plazo puede definirse como un almacenamiento de desde aproximadamente 3 días hasta aproximadamente 5 años. El almacenamiento a largo plazo puede definirse adicionalmente como el almacenamiento durante más de aproximadamente 5 años hasta el almacenamiento durante un periodo de tiempo indefinido.
- 60 [0057] El término "calidad del ovocito" se define como una calidad indicativa de los ovocitos que son competentes para su uso en subsiguientes procedimientos y reflejan la viabilidad del ovocito, para su uso en
- 65

procedimientos que implican la selección y la transferencia de ovocitos, tales como la fecundación *in vitro* y la implantación para conseguir un embarazo, y un almacenamiento a corto plazo, y un almacenamiento a largo plazo que incluye la criopreservación. El almacenamiento a corto plazo puede definirse como un almacenamiento de desde aproximadamente 3 días hasta aproximadamente 5 años. El almacenamiento a largo plazo puede definirse adicionalmente como el almacenamiento durante más de aproximadamente 5 años hasta el almacenamiento durante un periodo de tiempo indefinido.

**[0058]** El término "calidad del esperma" se define como una calidad indicativa del esperma que es competente para su uso en subsiguientes procedimientos, y refleja la viabilidad del esperma, para su uso en procedimientos que implican la selección y la transferencia de esperma, tales como la fecundación *in vitro* y la implantación para conseguir un embarazo, y un almacenamiento a corto plazo, y un almacenamiento a largo plazo que incluye la criopreservación. El almacenamiento a corto plazo puede definirse como un almacenamiento de desde aproximadamente 3 días hasta aproximadamente 5 años. El almacenamiento a largo plazo puede definirse adicionalmente como el almacenamiento durante más de aproximadamente 5 años hasta el almacenamiento durante un periodo de tiempo indefinido.

**[0059]** El término "HLA-G" se refiere al antígeno G de leucocitos humanos y, salvo que se indique de otro modo, incluye tanto la forma soluble como la insoluble. El término puede referirse, en el contexto apropiado, tanto al antígeno como al locus genético.

**[0060]** Los términos "integrinas, ubiquitina, selectinas, factores de crecimiento, inhibinas y otras hormonas, otras enzimas, moléculas pequeñas y péptidos son biomarcadores típicos que tienen sus diversos significados científicos reconocidos.

**[0061]** El término "inmunoensayo" es un análisis o una metodología que utiliza un anticuerpo para que se una específicamente a un analito. El inmunoensayo se caracteriza por el uso de unas propiedades de unión específicas de al menos un anticuerpo en particular para aislar, marcar o cuantificar el analito.

**[0062]** Los términos "aislado", "purificado" o "biológicamente puro" se refieren a un material que está sustancialmente o esencialmente exento de componentes que normalmente lo acompañan según se encuentra en su estado natural.

**[0063]** El término "marcador" se usa en referencia a una composición detectable mediante un medio espectroscópico, fotoquímico, bioquímico, inmunoquímico o químico. Por ejemplo, algunos marcadores útiles incluyen pigmentos fluorescentes, reactivos densos en electrones, calorimétricos, enzimas, por ejemplo, según se usan habitualmente en ELISA, biotina, dioxigenina o haptenos y proteínas para las cuales hay disponibles antisueros o anticuerpos monoclonales que pueden hacerse detectables.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

**[0064]** Las características y ventajas adicionales de la presente invención serán apreciables a partir de la siguiente descripción detallada, tomada en combinación con los dibujos anexos, en los que:

La Figura 1 es un dibujo esquemático de un dispositivo óptico de medición del estrés oxidativo con una celda de muestra de 50  $\mu$ l con un camino de 1 cm de longitud provisto con luz procedente de una lámpara halógena de tungsteno de banda ancha a través de una primera fibra óptica, un espectrofotómetro de infrarrojo cercano de longitud de onda corta (SWNIR) acoplado a un extremo opuesto de la celda de muestra a través de una segunda fibra óptica para detectar la intensidad de CW en el intervalo de los 600 nm hasta los 1.100 nm, y un ordenador conectado al espectrofotómetro para registrar y analizar los espectros.

La Figura 2 es un gráfico que muestra los niveles de absorción de varias especies moleculares en el intervalo de longitud de onda de 600 a 1.000 nm.

La Figura 3 muestra un espectro de Raman de 20 muestras de medio de cultivo de embriones para FIV.

La Figura 4 muestra un espectro medio de Raman con la desviación estándar.

La Figura 5 muestra el espectro de muestras viables.

La Figura 6 muestra una validación cruzada.

La Figura 7 es un gráfico de huellas metabólicas de los constituyentes del estrés oxidativo en el embrión en desarrollo obtenido usando una electroforesis capilar con una detección óptica de ultravioleta que identifica las fracciones nutrientes y de metabolitos del medio.

**[0065]** Puede apreciarse que, en los dibujos anexos, las características similares están identificadas por números de referencia similares.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS FORMAS DE REALIZACIÓN PREFERIDAS

5 **[0066]** La presente desvelación proporciona un procedimiento y un aparato para correlacionar espectros, tal como absorción óptica de longitudes de onda múltiples, espectros de dispersión de Raman o espectros de resonancia magnética de medios de cultivo o de fluidos corporales, tales como fluidos corporales procedentes de un paciente con una enfermedad dependiente del estrés oxidativo.

10 **[0067]** La medición del estrés oxidativo no se ha empleado en un entorno clínico como una herramienta para el diagnóstico o la predicción de la aparición de un trastorno. La presente desvelación proporciona una herramienta que permite una rápida medición del estrés oxidativo, adecuada para su uso en un contexto clínico.

15 **[0068]** Previamente no se ha medido longitudinalmente (con el tiempo) el estrés oxidativo con vistas a un mejor estudio de la evolución temporal de un trastorno, mediante lo cual se pueda intervenir y corregir el nivel de estrés oxidativo. La presente desvelación proporciona un dispositivo que es capaz de medir rápidamente y de forma no invasiva el estrés oxidativo de una forma adecuada para su uso con cualquier paciente.

20 **[0069]** Como un ejemplo, la presente desvelación proporciona una herramienta para medir uno o más componentes de estrés oxidativo en fluidos corporales usando un análisis óptico. El fluido corporal analizado según la desvelación puede ser cualquiera, o una combinación de, sangre completa, plasma sanguíneo, suero sanguíneo, orina, saliva, líquido lagrimal y líquido cefalorraquídeo (LCR), líquido amniótico, leche materna, fluido vaginal o uterino. Otro aspecto de la presente desvelación proporciona una herramienta para medir uno o más componentes de estrés oxidativo en un medio de cultivo para determinar la calidad de los ovocitos, la calidad de los embriones, la calidad del esperma etc. El análisis óptico puede realizarse con unas longitudes de onda del espectro óptico en varios intervalos, tales como los intervalos de NIR, SWNIR y THz. Además de los espectros de absorción, también pueden analizarse los espectros Raman y los espectros de fluorescencia.

30 **[0070]** También se proporciona un procedimiento y un aparato para determinar los datos probabilísticos de la presencia de un trastorno dependiente del estrés oxidativo en un paciente o en una muestra. Se establece una correlación entre un trastorno dependiente del estrés oxidativo y el espectro de un fluido corporal obtenido usando una modalidad analítica elegida para una población de pacientes o de muestras. Para el paciente cuyos datos probabilísticos se van a determinar, se obtiene un espectro del fluido corporal obtenido usando la modalidad analítica elegida. Los datos probabilísticos del paciente se generan usando el espectro adquirido y la correlación establecida.

35 **[0071]** La presente desvelación también proporciona procedimientos para determinar la calidad de los embriones para su uso en subsiguientes procedimientos, que incluyen la viabilidad de los embriones. Estos procedimientos incluyen la transferencia del embrión al útero con una fecundación *in vitro* y la transferencia de embriones (FIV/ET) y la transferencia tubárica de embriones (TET), mediante la valoración de los perfiles metabolómicos de los biomarcadores de la viabilidad del embrión.

40 **[0072]** La plataforma tecnológica de la BSM puede aplicarse en muchas indicaciones diagnósticas, pronósticas y de monitorización diferentes, incluyendo procedimientos de fecundación *in vitro* (FIV). Los estudios han indicado que la BSM puede realizarse fácilmente de forma no invasiva y con un alto grado de sensibilidad y especificidad. Pueden adaptarse fácilmente pequeños dispositivos prototipo para la producción a gran escala de unidades comerciales.

45 **[0073]** La mayoría de los procedimientos dirigidos a la metabolómica se basan en tecnologías tales como la espectroscopía de masas, la RMN, la HPLC, la electroforesis y varios ensayos analíticos basados en la proteómica, que incluyen micromatrices de inmunoensayos, y similares, así como sus tecnologías de núcleo. Mientras que estas metodologías son útiles en algunas aplicaciones, tales como en investigación, en laboratorios de servicio o clínicos de referencia, son costosas y complejas. Por el contrario, la BSM se realiza usando un pequeño dispositivo de centro de atención portátil y fácil de usar, que puede usarse incluso con propósitos de cribado.

50 **[0074]** Puede obtenerse una información cuantitativa relativa sobre los componentes de las muestras químicas o biológicas a partir de los espectros normalizando el espectro para que produzca unos valores de intensidad de pico que reflejen de forma precisa las concentraciones de las especies químicas responsables. Se calcula un factor de normalización a partir de las intensidades de pico de aquellos componentes inherentes cuya concentración permanece constante a lo largo de una serie de muestras. Pueden estimarse las concentraciones relativas de un componente que aparece en muestras diferentes a partir de las intensidades de pico normalizadas. Al contrario que los procedimientos convencionales, nos se requieren estándares internos ni reactivos adicionales. Los procedimientos son particularmente útiles para el fenotipado diferencial en investigación proteínómica y metabolómica, en los que se identifican moléculas cuya concentración varía entre una muestra y otra. Estas

especies identificadas pueden servir como marcadores biológicos de una enfermedad o de respuesta a una terapia.

**[0075]** Los radicales libres son átomos o moléculas que contienen electrones desapareados en sus orbitales externos. Sus configuraciones electrónicas hacen que estas especies químicas sean muy reactivas con los lípidos de la membrana, las proteínas, los ácidos nucleicos y otros sustratos celulares. Los radicales libres pueden derivar de fuentes medioambientales o pueden ser generados *de novo* dentro de los tejidos. El anión superóxido ( $O_2^-$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el oxígeno singlete, el ácido hipocloroso (HOCl), el peroxinitrito (ONOO-) y el radical hidroxilo ( $OH^*$ ) son ejemplos de especies reactivas de oxígeno habituales producidas de forma endógena (ROS). Los metales de transición, tales como el hierro ferroso ( $Fe^{2+}$ ) o el cobre cuproso ( $Cu^{1+}$ ), juegan un papel vital en la química *redox* celular reduciendo el  $H_2O_2$  al altamente citotóxico radical  $OH^*$  (catálisis de Fenton). En los tejidos de los mamíferos, unas enzimas antioxidantes evolutivamente conservadas (por ejemplo, las dismutasas de superóxido, la catalasa, las peroxidasas de glutatión y varias reductasas) operan conjuntamente con una serie de compuestos antioxidantes de bajo peso molecular no enzimáticos (por ejemplo, GSH, tiorredoxina, ascorbato, los tocoferoles, ácido úrico, melatonina, bilirrubina) para mantener la homeostasis *redox*. Manteniendo los metales de transición en un estado *redox* relativamente bajo, las proteínas de unión a metales, tales como ferritina, transferrina, lactoferrina, las metalotioneínas y la ceruloplasmina, se contribuye sustancialmente a la protección antioxidante de los tejidos y de los fluidos corporales.

**[0076]** El estrés oxidativo (Os) se ha definido como "una alteración en el equilibrio prooxidante/antioxidante a favor del primero, dando lugar a un posible daño [tisular]". Este equilibrio puede estar relacionado con uno o más componentes bioquímicos del fluido corporal. El estrés oxidativo se ha implicado como una vía clave común de disfunción y muerte celular, y un potencial agente terapéutico en un amplio espectro de trastornos médicos humanos que incluyen cáncer, diabetes, enfermedad obstructiva pulmonar, enfermedad inflamatoria del intestino, isquemia cardíaca, glomerulonefritis, degeneración macular y varios trastornos neurodegenerativos.

**[0077]** Se conoce por tanto la medición del estrés oxidativo en plasma sanguíneo y en líquido cefalorraquídeo (LCR) usando técnicas cromatográficas y espectrometría de masas. Dichas técnicas analíticas requieren mucho tiempo y típicamente implican la obtención de una cantidad significativa de un fluido corporal para obtener una medición del estrés oxidativo.

**[0078]** Los marcadores biológicos utilizan marcadores inflamatorios, marcadores de estrés oxidativo y marcadores de daño celular, o combinaciones de los mismos. Algunos marcadores inflamatorios incluyen, pero no se limitan a, citocinas u otros mediadores inflamatorios que promueven la atracción de leucocitos o de células inflamatorias. Los marcadores inflamatorios pueden ser, aunque no necesariamente, liberados desde células inflamatorias. Algunos marcadores inflamatorios incluyen, pero no se limitan a, 8-isoprostano, mieloperoxidasa, IL-6, y proteína C reactiva. Los marcadores de estrés oxidativo indican un daño celular provocado por oxidantes y por radicales libres. Algunos marcadores oxidativos incluyen los radicales y los oxidantes que alcanzan sus respectivos objetivos, tales como lípidos, proteínas como ADN, así como marcadores indirectos del daño causado por radicales y oxidantes. Algunos marcadores de estrés oxidativo incluyen, pero no se limitan a, hierro libre, 8-isoprostano, dismutasa de superóxido, peroxidasa de glutatión, hidroperoxidasa de lípidos, ditirosina y 8-hidroxi guanina. Los marcadores de daño celular incluyen moléculas biológicas (por ejemplo, enzimas) cuya liberación está asociada con células necróticas o dañadas. Algunos marcadores de daño celular incluyen, pero no se limitan a, cinasa de creatina y deshidrogenasa de lactato. Algunos marcadores biológicos pueden clasificarse en más de un tipo de marcador. Por ejemplo, el 8-isoprostano puede clasificarse como marcador inflamatorio y como marcador de estrés oxidativo.

**[0079]** La presente desvelación proporciona un procedimiento para procesar los datos espectrales que contienen picos con intensidades de pico. Se obtiene un conjunto de espectros a partir de una pluralidad de muestras químicas, tales como muestras biológicas que contienen metabolitos, proteínas o péptidos. Los espectros pueden ser espectros de masas obtenidos mediante, por ejemplo, ionización por electrospray (EST), desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI) o ionización por impacto electrónico (EI). Las intensidades de pico de cada espectro pueden escalarse con un factor de normalización para proporcionar intensidades de pico que sean proporcionales a la concentración del componente responsable. Basándose en las intensidades de pico escaladas pueden estimarse las concentraciones relativas de un componente particular de la muestra. El factor de normalización se calcula dependiendo de los componentes de la muestra química cuyas concentraciones son sustancialmente constantes en las muestras químicas. En una forma de realización, estos componentes no están predeterminados y son componentes inherentes a las muestras químicas. En otra forma de realización, el factor de normalización se calcula a partir de las proporciones de las intensidades de picos entre dos (por ejemplo, el primero y el segundo) espectros de un conjunto, y es una medición no paramétrica de las intensidades de pico, tal como una media.

Tecnologías de reproducción asistida (TRA) incluyendo la fecundación *in vitro*

**[0080]** Los procedimientos de la actual invención pueden usarse para determinar el momento exitoso de los procedimientos de fecundación *in vitro*.

**[0081]** Actualmente, los laboratorios de fecundación *in vitro* (FIV) son capaces de seleccionar pre-embiones únicamente sobre la base de su morfología y velocidad de escisión *in vitro* durante las primeras 48 a 72 horas después de la fecundación. Estos criterios son útiles, pero no son siempre buenos indicadores de un potencial desarrollo. En la mayoría de los casos se eligen 3 o 4 embriones basándose en estos indicadores relativamente bastos y después se transfieren a la cavidad uterina. Si hubiera disponibles unos criterios adicionales más rigurosos de selección de pre-embiones, basándose en parámetros bioquímicos, genéticos o de desarrollo, sería posible transferir uno o dos pre-embiones sanos que tendrían la mayor probabilidad de supervivencia sin exponer a las pacientes al trauma fisiológico causado por el fracaso recurrente en la implantación de embriones, abortos espontáneos, múltiples FIV o el riesgo de un embarazo múltiple. Por lo tanto, existe una necesidad médica de una prueba más predictiva para una implantación exitosa.

**[0082]** Salud reproductora (FIV). No hay disponibles comercialmente pruebas diagnósticas para valorar la competencia del ovocito, del espermatozoides o del embrión. Actualmente los embriones se seleccionan basándose en una escala de valoración morfológica que es muy subjetiva. El diagnóstico genético preimplantacional (DGP) es un procedimiento que analiza un número limitado de condiciones genéticas pero que no puede usarse para predecir la competencia del embrión. El DPG es un procedimiento no estandarizado muy invasivo que sólo está disponible en unos pocos laboratorios especializados de los Estados Unidos. Además es caro, largo de realizar y muy controvertido. Simplemente no hay pruebas disponibles para valorar la calidad del ovocito, del espermatozoides o del embrión. Otras aplicaciones de esta tecnología en la salud reproductora y en la obstetricia incluyen la valoración de: preeclampsia, **IAI** o inflamación intraamniótica, parto prematuro, aborto natural/provocado recurrente, implantación, determinación del sexo, contaminación medioambiental, infección, embarazo ectópico, embarazo normal, endometriosis, y similares.

#### **El ovocito**

**[0083]** Hasta hace poco se asumía que los ovocitos eran generalmente "normales" o competentes. No se contemplaban como una fuente de potenciales complicaciones en la FIV excepto en los casos obvios en los que se observaban variantes morfológicas graves, o si el óvulo era inmaduro (siendo el tamaño el indicador principal). En dichos casos, los óvulos defectuosos eran, y continúan siendo, descartados. Sin embargo, algunas pruebas científicas de apoyo están cambiando este paradigma de pensamiento, ya que numerosos nuevos informes (muy recientemente, el congreso anual de 2005 de la ASRM) han demostrado que entre el 50% y tanto como el 75%, de todos los ovocitos son anormales (aneuploídicos) en mujeres jóvenes (21 - 31 y/o), y esta cifra aumenta drásticamente con la edad. Hablando de forma general, se ha producido una escasez de investigación sobre la viabilidad de los ovocitos humanos a cualquier nivel, genómico, proteómico o metabólico. Como resultado, no hay procedimientos aceptables para la selección de ovocitos.

#### **Pruebas genómicas**

**[0084]** Sólo recientemente se han adaptado algunas técnicas de pruebas genómicas (<2 años) en un intento de valorar la competencia de los ovocitos (por ejemplo, hibridación genómica comparativa). Estas técnicas están en su infancia, no han sido estandarizadas ni validadas, y están lejos de llegar a ser unos procedimientos prácticos y habituales en el laboratorio de FIV. Actualmente estos procedimientos son muy caros, laboriosos y altamente invasivos para el ovocito, dado que se requiere una biopsia de los cuerpos polares del óvulo. El impacto de dichas biopsias, si lo hubiera, es desconocido.

**[0085]** Más recientemente se ha utilizado el diagnóstico genético preimplantacional (DGP) para estudiar indirectamente la calidad del ovocito mediante la valoración de la incidencia de aneuploidía en embriones por lo demás sanos y morfológicamente competentes. En estos estudios se encontró que incluso los ovocitos de mujeres jóvenes tenían una elevada incidencia de anomalías cromosómicas; por inferencia, los embriones anormales derivaban de ovocitos anormales. De una forma convincente, la incidencia de aneuploidía detectada en los ovocitos es muy similar usando los procedimientos de HGC o DGP y es del orden de aproximadamente el 50%.

#### **El embrión**

**[0086]** Históricamente, el embrión ha recibido más atención como objetivo de intervención para la monitorización y la predicción del éxito de la FIV. El "santo grial" de la FIV es conocer qué embriones son viables y competentes y cuáles no lo son. La hipótesis se basa en que si hubiera un procedimiento para identificar de forma coherente y seleccionar únicamente embriones de alta calidad - aquellos con la mayor probabilidad de producir un embarazo - dichos embriones podrían seleccionarse rutinariamente para su transferencia. Esto a su vez conlleva la expectativa de una mejora en las tasas de embarazo reduciendo los nacimientos múltiples, ya que tendrían que transferirse menos embriones si se supiera que son potencialmente viables.

#### **Valoración morfológica**

**[0087]** Hoy en día, la valoración morfológica de los embriones, basada en un sistema de clasificación de +1 a

+4, ese el principal determinante de la viabilidad en el laboratorio de FIV. Los embriones se evalúan típicamente usando la puntuación graduada de embriones (GES). El sistema de GES evalúa los embriones durante las primeras 72 horas posteriores a la fecundación. Cada embrión se puntúa sobre un máximo de 100 puntos. Los embriones con una puntuación GES de > 70 tiene la mayor probabilidad de desarrollarse en blastocitos viables que, tras la transferencia del embrión (TE), se implantarán subsiguientemente en el revestimiento uterino (o endometrio) y producirán un embarazo viable. La GES establece por tanto una base juiciosa para aconsejar a los pacientes con respecto a la selección de embriones para la TE.

**[0088]** También se evalúa el patrón de desarrollo del embrión durante el proceso de cultivo (por ejemplo, velocidad de escisión, fragmentación, cuerpos de inclusión, masas celulares internas, etc.), pero hay un acuerdo incluso menor entre los embriólogos relativo al uso de estos indicadores. La valoración morfológica se complica con la obvia dificultad debida a la ausencia de estándares nacionales o internacionales. La inherente variabilidad inter e intra-observadores asociada con un sistema de graduación subjetivo, y la ausencia de cualquier indicador biológico correlativo en el que apoyar el proceso. Además, la tara científica fundamental de este sistema de graduación es el axioma de que el análisis morfológico no puede ser aceptado como una medida de la funcionalidad biológica. Las limitaciones de este proceso se sometieron de nuevo a un intenso interés en la reciente conferencia anual de la ASRM. No obstante, los embriólogos han tenido que basarse en este sistema de graduación, dado que no habían aparecido procedimientos alternativos.

**[0089]** Mediante el análisis de los perfiles espectrales metabolómicos de las células y de los embriones en crecimiento se valora el ajuste de nutrientes, complementos, pH y metabolitos. Esto permite una monitorización continua y una optimización del crecimiento de las células y los embriones. Por ejemplo, puede medirse la determinación del nivel de estrés oxidativo y contrarrestarse complementando con entidades químicas tales como un antioxidante. Más específicamente, un embrión más débil puede ser complementado con más oxígeno o puede modificarse el medio de crecimiento para mejorar la viabilidad de ese embrión, tal como modificando el pH del medio, eliminando los metabolitos o complementando el medio con nutrientes, basándose en la monitorización del medio. Un embrión débil que crece en un medio de 3 días puede ser transferido para que crezca en un medio de 5 días basándose en la monitorización del medio de la presente desvelación.

### 30 **Valoración uterina**

**[0090]** La viabilidad del útero para la implantación del embrión puede ser correlacionada con los componentes espectrales analíticos del fluido endometrial, es decir, el fluido que reviste la pared del útero.

**[0091]** La metodología puede aplicarse para determinar el perfil metabolómico del moco cervical y endometrial del revestimiento uterino para determinar la receptividad biológica del endometrio frente a la implantación del embrión. El moco cervical, como fluido biológico, puede ser analizado mediante diversos procedimientos espectroscópicos para determinar los perfiles metabolómicos indicativos de un endometrio receptivo, mientras que el revestimiento endometrial de los diversos úteros puede examinarse mediante varios procedimientos espectroscópicos de forma no invasiva empleando fibra óptica, que puede insertarse a través del cuello uterino directamente en el útero. La determinación metabolómica del endometrio conducirá a un aumento de las tasas de implantación del embrión, y por lo tanto, de embarazo.

### 45 **Diagnóstico genético preimplantacional y pruebas genómicas**

**[0092]** La prueba genómica (es decir, CGR) de los embriones está sometida a las mismas limitaciones mencionadas anteriormente para el ovocito, y hasta la fecha, la CGR de embriones no ha recibido una atención fiable por parte de la comunidad científica. Sin embargo, el ámbito de la TRA se beneficia actualmente del procedimiento del diagnóstico genético preimplantacional, que puede usarse para cribar, en embriones en desarrollo, un número limitado de enfermedades genéticas específicas y aneuploidías que afectan a 9 de los posibles 23 pares de cromosomas. El DGP es un laborioso procedimiento usado en combinación con otro procedimiento denominado hibridación fluorescente *in situ* (FISH). Desafortunadamente, los DGP/FISH carecen de sensibilidad y de especificidad cuando se trata de identificar la viabilidad global de ovocitos globales y de embriones para una FIV. Aunque el DGP es útil para detectar aneuploidías que podrían afectar a la viabilidad del embrión, no ha demostrado ser útil para la valoración global de la calidad del embrión.

**[0093]** El DGP es contemplado como un procedimiento controvertido dado que requiere una única biopsia celular de embrión temprano y los riesgos de salud inherentes al proceso son desconocidos. Aunque las biopsias se realizan en el laboratorio de FIV, deben ser enviadas a otro laboratorio genético remoto para el análisis cromosómico. El PDG también es contemplado como un procedimiento experimental por la FDA y la ASRM, y han surgido cuestiones bioéticas debido la naturaleza de la información genética obtenida a partir de la prueba. El DGP también tiene un coste prohibitivo como una prueba rutinaria prevaleciente para la FIV. Hasta hace muy poco, la preocupación por el DGP en el ámbito ha evitado probablemente que los científicos busquen otras metodologías genómicas o proteómicas y metabolómicas.

**[0094]** En comparación con el perfilado metabólico de esta desvelación, el DGP es un procedimiento muy costoso e invasivo para el embrión, y por lo tanto conlleva un alto grado de riesgo desconocido; está limitado a las pruebas de las condiciones genéticas; y requiere tiempo. Además, no se ha probado que el DGP sea una herramienta útil para determinar la viabilidad del embrión excepto en la valoración genómica de la aneuploidía. Dado que es un procedimiento complejo y caro, no es probable que se convierta en una opción prevalente para la valoración rutinaria de embriones. Por muchas razones científicas y sociopolíticas, el DGP todavía se considera un procedimiento experimental. Consecuentemente, la introducción del perfilado metabólico como una prueba de la competencia global de ovocitos y embriones es un importante avance en la técnica.

#### **Biomarcadores embrionarios**

**[0095]** Se ha examinado al menos un biomarcador molecular de la viabilidad de embriones con un cierto rigor, una molécula denominada antígeno leucocitario humano soluble (sHLAG). Esta proteína se mide mediante un inmunoensayo, y por lo tanto es más engorroso, requiere mucho tiempo para la obtención de un resultado (horas) y es caro de realizar. Debido a limitaciones de volumen (de las muestras de medio), el ensayo no puede realizarse por duplicado, por lo que se compromete la precisión estadística. Recientemente se han postulado otros biomarcadores proteómicos (por ejemplo, integrina beta, ubiquitina, HCG, otros), para el embrión; sin embargo, estos marcadores no se han estudiado ampliamente, y su papel como indicadores de la viabilidad del embrión, si lo tienen, requiere una investigación adicional.

#### **Posibilitando la transferencia de un único embrión (SET)**

**[0096]** Establecer confianza en un proceso de transferencia de un único embrión como medio para reducir los partos múltiples sin comprometer las tasas de embarazo es el objetivo de los médicos de FIV, de la ASRM así como de las compañías aseguradoras. Desafortunadamente, esto ha resultado ser hasta ahora un objetivo escurridizo. Se espera que la disponibilidad del perfilado proporcione al médico la elección de una transferencia de múltiples embriones o de una transferencia de un único embrión en la práctica clínica de la FIV. Por lo tanto, pueden apreciarse los beneficios de las pruebas metabólicas, e incluyen: (i) mejores resultados del tratamiento (es decir, tasas de embarazo) y una reducción concomitante en la incidencia de nacimientos múltiples (triples o mayores); (ii) una reducción del riesgo médico para la madre y la prole; (iii) unos costes médicos reducidos asociados con la prestación de cuidados médicos para múltiples bebés prematuros; (iv) una cobertura de seguro más amplia para la FIV; (v) una mayor confianza para aquellos que buscan un tratamiento para la infertilidad.

**[0097]** También se espera que el perfilado metabólico permita desarrollar otros beneficios para la comunidad de TRA que incluyen: 1) bancos de óvulos de donantes congelados que ofrecen únicamente óvulos viables precibados para posibles receptoras, y 2) "un rescate de ovocitos", que es la recolección de un número adicional de óvulos competentes para su crioconservación, seguido de la fertilización en una fecha futura en un subsiguiente ciclo de FIV.

#### **Ensayo del biomarcador sHLAG**

**[0098]** Este ensayo de un único biomarcador para el sHLAG se está empleando actualmente en los procedimientos de FIV. Los kits contienen adicionalmente instrucciones para la realización de los procedimientos de la actual desvelación.

**[0099]** La presente invención se comprenderá más fácilmente mediante referencia a los siguientes ejemplos, que se proporcionan para ilustrar la desvelación.

#### **Células madre**

**[0100]** La desvelación puede aplicarse asimismo para determinar la viabilidad de una o más células madre en un medio de cultivo mediante el análisis del medio de cultivo. Según la presente desvelación, es necesaria una valoración del medio de crecimiento de las células madre para determinar el estrés oxidativo de estas células madre, para maximizar la diferenciación de las células madre en células  $\beta$  o en un tipo celular diferenciado. Puede identificarse un factor de diferenciación con un espectro de monitorización del medio de crecimiento de la célula madre, tal como proteínas y otros metabolitos.

#### **EJEMPLO 1**

#### **Medición del EO a partir de la espectroscopía de infrarrojo cercano de longitud de onda corta (SWNIR) del plasma sanguíneo**

#### **Metodología de la toma de muestras**

**[0101]** Antes del análisis se descongelaron las muestras durante una hora hasta alcanzar la temperatura

ambiente, y después se centrifugaron durante 30 min. Para la limpieza y el reacondicionamiento, la celda de muestras se lavó en primer lugar con 200  $\mu\text{l}$  de NaOH 0,1 M, seguido de 3 x 200  $\mu\text{l}$  de agua Millipore.

### Espectroscopía de infrarrojo cercano de longitud de onda corta (SWMIR)

5 **[0102]** Se registró un espectro de SWNIR del tercer aclarado con agua para que sirviera como control. A continuación se inyectaron 75  $\mu\text{l}$  de muestra en la celda de muestras y se registró el espectro de la muestra usando el aparato según se muestra en la Fig. 1.

10 **[0103]** Se obtuvieron espectros del infrarrojo cercano de longitud de onda corta a partir de las muestras preparadas usando el siguiente protocolo. Para las mediciones se usó un espectrofotómetro de infrarrojo cercano American Holographic. El espectrofotómetro está equipado con un puerto de entrada de dos canales, de forma que podía obtenerse simultáneamente una referencia con la muestra de la medición. Los espectros adquiridos cubrían la región de 580 a 1.100 nm. El tiempo de integración del detector era de 100 milisegundos. Todas las muestras se midieron 50 veces y los resultados se promediaron para reducir el ruido espectral. Las muestras se introdujeron en una celda de muestras con 10 mm de longitud del camino interno, usando una pipeta eppendorff. Se usaron aproximadamente 75 microlitros de muestra. Una vez obtenidos los datos espectrales, la celda de muestras se lavó usando 200 microlitros de NaOH 0,1 M seguido de 3 volúmenes de 200 microlitros de agua Millipore. Después de cada muestra se tomó un espectro de referencia individual de la tercera disolución de lavado con agua. Esto permitió monitorizar la contaminación de la celda de muestra son los cambios en la alineación del sistema óptico. Cada espectro de la muestra se referenció a la muestra de agua consecutiva para su procesamiento posterior.

20 **[0104]** Toma de muestras para la FIV. Ovocito: en el momento de la recolección de los ovocitos se extrae una alícuota consistente en aproximadamente 100  $\mu\text{l}$  del fluido folicular, que normalmente se desecha, a partir de la placa de Petri una vez que el ovocito ha sido identificado y extraído, para mantener el medio nutricional.

25 **[0105]** Embrión: el medio de cultivo gastado, que normalmente se desecha, se recoge el final de cada etapa de cultivo de la FIV (desde la fertilización hasta la escisión del blastocito) para su análisis mediante BSM. El cultivo individual de embriones es el procedimiento preferido para preparar embriones para este procedimiento, pero no es obligatorio. Alternativamente, también puede analizarse el medio de cultivo desechado del DGP, de la eclosión asistida y de otros procedimientos relacionados de las TRA de una forma similar. Las muestras pueden ser analizadas mediante BSM inmediatamente o almacenarse congeladas para un análisis futuro. La selección de ovocitos y de embriones se determina basándose en el perfil metabolómico único de los biomarcadores de las respectivas muestras.

30 **[0106]** Las muestras fluidas pueden congelarse y usarse como tales para obtener un espectro, o pueden descongelarse subsiguientemente antes de la obtención del espectro.

### METODOLOGÍA DEL ANÁLISIS

#### 40 Selección de la longitud de onda *a priori*

**[0107]** El espectro de SWNIR contiene absorciones procedentes de varias especies moleculares. Para seleccionar la principal especie molecular presente en el plasma sanguíneo se identificaron las regiones de longitud de onda (15 nm de ancho) asociadas con Hemo (700 nm), CH (830 nm), ROH (940 nm), H<sub>2</sub>O (960 nm), OH (980 nm) y NH (1020 nm), según se muestra en la Figura 2. Las absorciones integradas de estas seis regiones se usaron entonces para el modelo de regresión descrito a continuación.

#### 50 Transformada *wavelet* de Haar

**[0108]** La transformada de Haar (HT) es la transformada *wavelet* más antigua y más simple. De forma similar a la transformada de Fourier, proyecta los datos - por ejemplo, un espectro de NIR - sobre un conjunto de bases dado. Al contrario que la transformada de Fourier, que usa funciones de senos y cosenos como conjunto de base, la HT usa *wavelets* de Haar. En este estudio se eligió una transformada discreta de *wavelet* (DWT) sobre una transformada continua de *wavelet* o una transformada *wavelet packet* para maximizar la simplicidad y la velocidad de los cálculos. Para los datos definidos sobre el intervalo  $0 < x < 1$ , la familia de *wavelets* de Haar para una DWT se viene dada por:

$$\phi(x) = \begin{cases} 1 & \text{si } 0 \leq x < 1 \\ 0 & \text{de otra forma} \end{cases} \quad (1)$$

$$\phi(x) = \begin{cases} 1 & \text{si } 0 \leq x < 1/2 \\ -1 & \text{si } 1/2 \leq x < 1 \\ 0 & \text{de otra forma} \end{cases} \quad (2)$$

$$\psi_{n,k}(x) = \psi(2^n x - k), \quad 0 \leq k \leq 2^n - 1 \quad (3)$$

5 **[0109]** Llevar a cabo una HT consiste en descomponer un espectro en una suma ponderada de  $\phi$ ,  $\Psi$  y  $\psi_{n,k}$ , en las que las ponderaciones se conocen como "coeficientes de *wavelet*". Para obtener el coeficiente del *wavelet* padre,  $\phi$ , se integra la señal de toda la ventana de datos. La ponderación del *wavelet* madre,  $\Psi$ , se obtiene integrando la primera mitad de los puntos de datos, y restando la suma de la segunda mitad de los datos. Los *wavelets* hijos se reducen y son versiones convertidas del *wavelet* madre. En la notación  $\psi_{n,k}$ , representa la  
10 reducción, y  $k$  indica la conversión. Por lo tanto, se suman incluso las regiones más pequeñas de los datos para encontrar los coeficientes de los *wavelets* hijos, hasta el elemento de mínimo tamaño de los datos. Por lo tanto, los *wavelets* hijos se comportan como filtros de paso alto, mientras que el *wavelet* padre funciona como un filtro de paso bajo. Globalmente, el número de coeficientes *wavelet* obtenido es el mismo que el número de puntos del conjunto de datos original.

15 **[0110]** A partir de la descripción anterior, se hace apreciable que los *wavelets* de Haar son estructuras simples, dado que únicamente tienen tres niveles distintivos: +1, -1 o 0. Sin embargo, es posible simplificarlos incluso aún más introduciendo versiones reducidas y convertidas del *wavelet* padre denominadas funciones de escalado o *wavelets* "hijo":  
20

$$\phi_{n,k}(x) = \phi(2^n x - k), \quad 0 \leq k \leq 2^n - 1 \quad \text{y} \quad 0 \leq x < 1 \quad (4)$$

**[0111]** El *wavelet* madre puede entonces reescribirse como

$$\Psi = \phi_{1,0} - \phi_{1,1}$$

25 Por lo tanto puede llevarse a cabo una HT "hijo" sobre un espectro con  $z$  puntos usando  $2z-1$  *wavelets* que se construyen únicamente con unos y ceros. La base establecida para esta transformación del *wavelet* no es ortogonal, dado que las generaciones superiores de *wavelets* hijo son subconjuntos de generaciones inferiores. Sin embargo,  
30 los *wavelets* hijo tienen la ventaja de ser monodireccionales, es decir, sólo van positivos. Por lo tanto, al contrario que los *wavelets* hija, los *wavelets* hijo no realizan inherentemente una primera derivada en el procesado de los datos.

35 **[0112]** En el contexto del análisis espectral, la HT es particularmente adecuada. Los coeficientes *wavelet* obtenidos contienen información tanto de la frecuencia como de la longitud de onda (donde "frecuencia" no se usa en el sentido habitual, sino que se refiere a si los *wavelets* describen características a pequeña y a gran escala). Debido a la retención de la información de la longitud de onda, es más fácil comprender el significado espectral de los resultados de la HT que los resultados de la FT. Adicionalmente, se hace posible no sólo investigar la importancia de las longitudes de onda por separado, sino también las características espectrales de diferentes  
40 tamaños. Una aplicación común de esta propiedad es suavizar los datos eliminando los coeficientes *wavelet* de alta frecuencia. Alternativamente, pueden corregirse grandes tendencias en los conjuntos de datos tales como líneas de base inclinadas eliminando los *wavelets* de baja frecuencia.

45 **[0113]** Otro rasgo importante de la HT es su capacidad para comprimir una gran cantidad de información en un número de variables muy pequeño. Los *wavelets* hija son eficaces en la compresión de datos, y esta propiedad es explotada en el presente estudio para encontrar el modelo más parsimonioso para estimar las propiedades de la muestra. En comparación, la HT hijo no se comporta tan bien para la compresión de datos, dado que es

parcialmente redundante, pero permite un desacoplamiento completo de longitudes de onda adyacentes. Por lo tanto, este conjunto de base debería permitir más libertad en la selección de características. Adicionalmente, los modelos construidos con *wavelets* hijo son más fáciles de interpretar. Dado que  $\varphi_{n,k}$  sólo tiene dos niveles discretos, una región de longitud de onda se elige o no se elige mediante la optimización del algoritmo. Basándose en los *wavelets* hijo elegidos debería ser posible construir un instrumento simplificado que use hendiduras o filtros para el análisis de muestras.

**[0114]** Se calcularon las HT tanto hija como hijo usando programas creados en Matlab (The Mathworks Inc., Natick, MA). Para la HT hija, un rápido programa de HT basado en el algoritmo piramidal de Mallat determinó los coeficientes *wavelet* llevando a cabo una serie de sumas y restas recurrentes. Para la HT hijo se usaron sumas simples. Dado que los algoritmos requieren que la longitud de los datos de entrada tenga una potencia de 2, en los espectros experimentales se introdujeron los últimos valores de datos para alcanzar el  $2n$  más próximo. Se determinaron los coeficientes *wavelet* y se ordenaron desde *wavelets* más anchos hasta más compactos ( $\phi, \psi, \psi_{1,0}, \dots, \psi_{n,k}$  o  $\phi, \phi_{1,0}, \dots, \phi_{nk}$ ).

Algoritmo genético

**[0115]** Se determinó el subconjunto más parsimonioso de variables (ya sea longitudes de onda del procedimiento 1 o *wavelets* del procedimiento 2) para estimar una clase de interés mediante una regresión inversa por mínimos cuadrados (ILS). Cuando había implicadas pocas longitudes de onda, como en el procedimiento 1, se modelaron todas las combinaciones posibles. Cuando se incluían muchos *wavelets* en la clasificación (es decir, procedimiento 2) se usó una optimización con un algoritmo genético (GA) para determinar la mejor elección de *wavelets*. Usando principios tales como emparejamiento, entrecruzamiento y mutación se evaluaron muchos modelos. Para cada combinación de variables se estimó la clase de muestra según

$$Y = \alpha_0 + \alpha_1 X_1 + \alpha_2 X_2 + \dots + \alpha_n X_n \quad (6)$$

en la que Y es la variable dependiente (clase neurológica, es decir, 0-normal, 1-AD),  $X_1, X_2, \dots, X_n$  son variables independientes (es decir, la intensidad de una longitud de onda dada o de los coeficientes *wavelet*), y  $\alpha_0, \alpha_1, \dots, \alpha_n$  son los coeficientes determinados a partir de un conjunto de calibración X's. Las descripciones completas de la optimización del GA han sido proporcionadas previamente en otro sitio, por lo que aquí sólo se proporcionará un resumen del procedimiento.

**[0116]** Se recurrió a los modelos de mejor ajuste (óptimo) que contenían entre 1 y 15 variables usando el método de GA. Se creó una población de individuos (es decir, modelos A) codificando las variables elegidas en binario y ordenándolas lexicográficamente. Para los espectros preprocesados de variables 2", el binario de codificación usaba n bits. El tamaño de la población se estableció en 1.000. Se usó cada individuo como un conjunto de calibración para construir un modelo según la Ecuación 6. El cálculo del correspondiente error estándar de calibración (SEC) se basó en un conjunto de prueba. Los dos individuos de mayor ajuste se identificaron basándose en su SEC, y se mantuvieron sin mutaciones para la siguiente generación. El resto de la nueva población se completó emparejando aleatoriamente individuos con una probabilidad de entrecruzamiento de 1 y una tasa de mutación de 0,02. Después de seguir la población a través de 2.000 generaciones, el algoritmo convergió a una solución estable.

**[0117]** Se llevó a cabo la misma búsqueda para los modelos construidos con entre 1 y 15 variables, y se usaron sus SEC para obtener la representación de la suma de cuadrados del error de predicción residual (PRESS). Sea h la designación del número de *wavelets* en el modelo con el mínimo valor de PRESS. El modelo más parsimonioso era aquel con el menor número de *wavelets*, de forma que la PRESS para ese modelo no era significativamente mayor que la PRESS para el modelo con h *wavelets* (prueba f, 99% de nivel de confianza).

**[0118]** Los valores de clase estimados eran 0 ó 1. Sin embargo, la regresión superior determinó valores reales continuos. La separación de clase se determinó usando valores mayores de 0,5 que derivan de la clase 1 y valores menores de 0,5 de la clase 0. Para cada modelo se determinó la sensibilidad y la especificidad, y su uso como el criterio para la selección del modelo.

**[0119]** Se apreciará que la presente desvelación puede trabajar bien con longitudes de onda procedentes del espectro óptico en varios intervalos, tales como los intervalos NIR, SWNIR y THz, como será apreciable por el experto en la técnica. Además de los espectros de absorción, también pueden analizarse de forma similar los espectros Raman y de fluorescencia. En el caso de la RMN, la técnica de análisis sería modificada, cómo sería apreciable por el experto en la técnica, para identificar los componentes de estrés oxidativo deseados y/o realizar la correlación con la enfermedad o el trastorno deseado.

**[0120]** También se apreciará que la presente desvelación puede usarse para correlacionar espectros con una enfermedad o un estado patológico, además de proporcionar uno o más valores de estrés oxidativo. En el último

caso, la presente desvelación permite que un procesador pueda generar un valor que representa una media ponderada de una pluralidad de valores para componentes de estrés oxidativo, de forma que la media ponderada proporcione un valor indicativo de un grado de estrés oxidativo en el paciente.

## 5 EJEMPLO 2

[0121] Los procedimientos ejemplares del Ejemplo 1 pueden emplearse en procedimientos de FIV, y en la monitorización de la salud maternofetal. Los procedimientos también son aplicables en la recogida de ovocitos, de esperma y de embriones, así como en la crioconservación de los mismos. También se contemplan programas de fecundación *in vitro* que emplean estos procedimientos.

## EJEMPLO 3

[0122] Las firmas metabolómicas de los constituyentes del estrés oxidativo en el embrión en desarrollo también se obtienen usando técnicas de separación analítica que identifican las fracciones de nutrientes y de metabolitos del medio. Un ejemplo de una separación usando una electroforesis capilar con una detección óptica de ultravioleta se proporciona en la Figura 7. Se identifican los constituyentes asociados con el desarrollo del embrión y que tienen correlaciones tanto positivas como negativas con la viabilidad del embrión. En particular, una fracción nutriente a los 900 segundos se correlaciona negativamente con la viabilidad del embrión, mientras que dos fracciones de metabolitos (1000 - 1.100 s) se correlacionan positivamente. Combinando la información de ambos grupos constituyentes, se consigue la separación de los embriones que darán como resultado un embarazo y aquellos que no, con una sensibilidad del 80% y una especificidad del 100%. Usando la misma metodología desarrollada aquí, también pueden usarse técnicas de separación tales como otras técnicas de separación electromotriz, cromatografía de líquidos y de gases, para la separación de estas firmas metabólicas a partir de células en desarrollo, para una valoración de la viabilidad.

[0123] Aunque la invención se ha descrito en relación con formas de realización específicas de la misma, se entenderá que es susceptible de modificaciones adicionales, y se entiende que esta solicitud cubre cualquier variación, uso o adaptaciones de la invención que sigan, en general, los principios de la invención, incluyendo dichas desviaciones de la presente desvelación según surgen de la práctica conocida o habitual en la técnica a la que pertenece la invención, y según puede aplicarse a las características esenciales establecidas anteriormente en este documento, y como sigue en el ámbito de las reivindicaciones anexas.

## REFERENCIAS

### [0124]

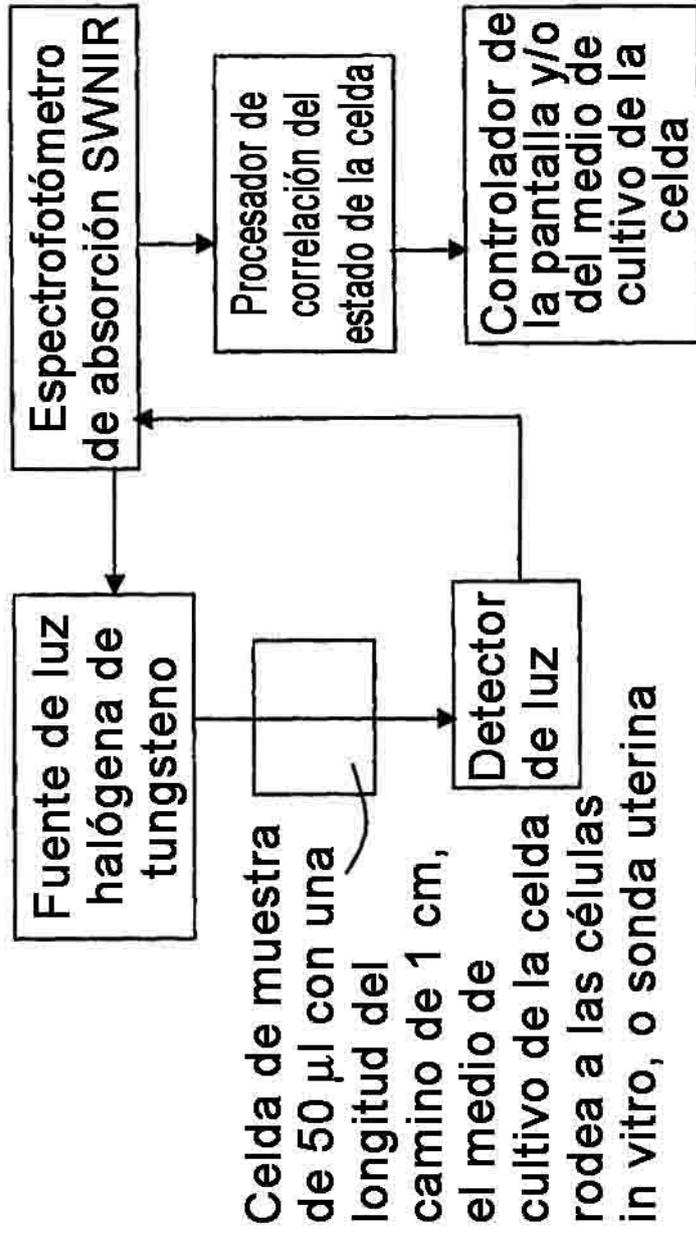
- Sies, H., Oxidative Stress. Oxidants and Antioxidants. 1991, Nueva York: Elsevier. 507.
- Hailiwell, B. y J. M. C. Gutteridge, Free Radicals in Biology and Medicine. 3ª ed. 1999, Oxford: Oxford University Press Inc. 736.
- Albuszies, G. y U. B. Bruckner, Antioxidant therapy in sepsis. Intensive Care Med, 2003. 29 (10): págs. 1632 - 6.
- Abu-Zidan, F. M., L. D. Plank, y J. A. Windsor, Proteolysis in severe sepsis is related to oxidation of plasma protein. Eur J Surg, 2002. 168 (2): págs. 19 - 23.
- C. E. W. Gributs, D. H. Bums, Applied Optics, 2003, 42116. págs. 2923 - 2930
- M. J. McShane, B. D. Cameron, G. L. Cote, C. H. Spiegelman, Applied Spectroscopy 1999, 53, págs. 1575 - 1581
- Alikani, M, Calderon G, Tornkin G, Garrisi J, Kokott M, Cohen J. Cleavage anomalies in early human embryos and survival after prolonged culture *in vitro*. Hum. Reprod. 2000; 15:2634 - 43.
- Almagor M, Bejar C, Kafka I, Yaffe H. Pregnancy rates after the communal growth of preimplantation embryos *in vitro*. Fertil Steril 1996; 66: 394 - 97.
- Balaban B, Urman B, Isiklar A, Alatas C, Aksoy S, Mercan R, y col. The effect of pronuclear morphology on embryo quality parameters and blastocyst transfer outcome. Hum Reprod 2001; 16: 2357 - 61.
- Blake D, Proctor M, Johnson N, Olive D. Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted reproduction (Cochrane Review). Cochrane Database Syst Rev 2002; (2): CD002 1 18.
- Bos-Miluch A, Mattos AL, Ferrari AN. Early cleavage of human embryos: an effective method for predicting successful FIV/ICSI outcome. Hum Reprod 2001; 16: 2658 - 6 1.

- Fenwick J, Platteau P, Murdoch A P, Herbert M. Time from insemination to first cleavage predicts developmental competence of human preimplantation embryos in vitro. *Hum Reprod* 2002; 17: 407 - 12.
- 5 Fisch J D, Rodriguez H, Ross R, Overby G, Sher G. The Graduated Embryo Score (GES) predicts blastocyst formation and pregnancy rate from cleavage-stage embryos. *Hum Reprod* 2001; 16: 1970 - 5.
- Foumel S, Huc X, Aguerre-Gin M, Solier C, Legros M, Proud-Brethenou C, Moussa M, Chaouat G, Berrebi A, Bensussan A, Lenfant F, Le Bouteiller P: Comparative reactivity of different HLA-G monoclonal antibodies to soluble HLA-G molecules. *Tissue Antigens* 55: 510, 2000.
- 10 Fuzzi B, Rizzo R, Criscuoli L, Noci I, Melchioni L, Scarselli B, Bencini E, Menicucci A, Baricordi O: HLA-G expression in early embryos is a fundamental prerequisite for the obtainment of pregnancy. *Eur J Immunol* 32: 3 1 1, 2002.
- 15 Gardner DK, Phil D, Vella P, Lane M, Wagley L, Schlenker T, Schoolcraft W. Culture and transfer of human blastocysts increases implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfers. *Fertil Steril* 1998; 69: 84 - 8.
- Gianaroli L, Magli M C. Fenaretti AP, Fiorentino A, Garrisi J, Munne S.; Preimplantation genetic diagnosis increases the implantation rate in human in vitro fertilization by avoiding the transfer of chromosomally abnormal embryos. *Fertil Steril* 1997; 68; 1 128 - 3 1.
- 20 Hunt JS: HLA and maternal-fetal relationship. Austin, TX RG Landes Co, 1996.
- 25 Le Bouteiller P, Blaschitz A: The functionality of HLA-G is emerging. *Immunol Rev* 1999.
- Levron J, Shulman A, Bider D, Seidman D, Levin T, Dor J. A prospective randomized study comparing day 3 with blastocyst-stage embryo transfer. *Fertil Steril* 2002; 77: 1300 - 01.
- 30 Loke Y W, King A: Human Implantation: Cell Biology and Immunology. Cambridge, Cambridge University Press, 1995.
- Lonergan P, Khatir H, Piurni F, Rieger D, Humblot P, Boland M P. Effect of time interval from insemination to first cleavage on developmental characteristics, sex ratio and pregnancy rate after transfer of bovine embryos. *J Reprod Fertil* 1999; 1 17: 159 - 67.
- 35 Ludwig M, Schopper B, Al-Hasano S, Diedrich K. Clinical use of a pronuclear stage score following intracytoplasmic sperm injection: impact on pregnancy rates under the conditions of the German embryo protection law. *Hum Reprod* 2000; 15: 325 - 9.
- 40 Lundin K, Bergh C, Hardarson T. Early embryo cleavage is a strong indicator of embryo quality in human VF. *Hum Reprod* 2001; 16: 2652 - 7.
- Magali M C, Jones G M, Gras L, Gianaroli L, Korman I, Trounson A. Chromosome mosaicism in day 3 aneuploid embryos that develop to morphologically normal blastocysts in vitro. *Hum Reprod* 2000; 15: 178 1 - 86.
- 45 McMaster M, Zhou Y, Shorter S, Kapasi K, Geraghty D, Lim K; Fisher S: HLA-G isoforms produced by placental cytotrophoblast and found in amniotic fluid are due to unusual glycosylation. *J Immunol* 160: 5922, 1998.
- Menicucci A, Noci I, Fuzzi B, Criscuoli L, Baricordi O, Mattiuz PI: Non-classic sHLA class I in human oocyte culture medium. *Hum Immuno*, 160: 1057, 1999.
- 50 Milki A A, Hinckley M D, Gebhart J, Dasig D, Westphal L, Behr B. Accuracy of day 3 criteria for selecting the best embryos. *Fertil Steril* 2002; 77: 1191 - 5.
- 55 Milki A A, Hinckley M D, Fisch J D, Dasig D, Behr B. Comparison of Day 3-ET to Blastocyst-ET in a Similar Patient Population: *Fertil Steril* 2000; 73 (1): 126 - 9.
- Milki A A, Fisch J D, Behr B.; Two blastocyst transfer has similar pregnancy rates and a decreased multiple gestation rate compared to three blastocyst transfer. *Fertil Steril* 1999 ;72: 225 - 8.
- 60 Puissant F, Van Rysselberge M, Barlow P, Deweze J, Leroy F. Embryo scoring as a prognostic tool in FIV treatment. *Hum Reprod* 1987; 2: 705 - 8.
- 65 Rijnders P M, Jansen C A. The predictive value of day 3 embryo morphology regarding blastocyst formation, pregnancy and implantation rate after day 5 transfer following in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998; 13: 2869 - 73.

- Shoukir Y, Carnpana A, Farley T, Sakkas D. Early cleavage of in vitro fertilized human embryos to the 2-cell stage: a novel indicator of embryo quality and viability. *Hum Reprod* 1997; 12: 153 1 - 6.
- 5 Scott LA, Smith S. The successful use of pronuclear embryo transfers the day following oocyte retrieval. *Hum Reprod* 1998; 13: 1003 - 13.
- Scott L, Alvero R, Leondires M, Miller B. The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation. *Hum Reprod* 2000; 15: 2394 - 403.
- 10 Spyropoulou I, Karanalegos C, Bolton V N. A prospective randomized study comparing the outcome of in vitro fertilization and embryo transfer following culture of human embryos individually or in groups before embryo transfer on day 2. *Hum Reprod* 1999; 14: 76 - 9.
- 15 Tesarik J, Junca A M, Hazout A, Aubriot F X, Nathan C, Cohen-Bacrie P, Dumont-Hassan M. Embryos with high implantation potential after intracytoplasmic sperm injection can be recognized by a simple, non-invasive examination of pronuclear morphology. *Hum Reprod* 2000; 15: 1396 - 99.
- 20 Tsai Y C, Chung M T, Sung Y H, Tsai F, Tsai Y T, Lin L Y. Clinical value of early cleavage embryo. *Int J Gynaecol Obstet* 2002; 76: 293 - 7.
- Van Lierop M, Wijnands F, Loke Y, Emmer P, Lukassen H, Braat D, Van der Meer A, Mosselman S, Josten I: Detection of HLA-G by specific sandwich ELISA using monoclonal antibodies G233 and 56B. *Mol Hum Reprod* 776, 20 de agosto de 2002.
- 25 Ziebe S, Petersen K, Lindenberg S, Andersen A G, Gabrielsen A, Andersen A N. Embryo morphology or cleavage stage: how to select the best embryos for transfer after in vitro fertilization. *Hum Reprod* 1997; 12: 1545 - 9.
- 30 Zollner U, Zollner K P, Hart1 G, Diet1 J, Steck T. The use of a detailed zygote score after NF/ICSI to obtain good quality blastocysts: the German experience. *Hum Reprod*. 2002; 17: 1327 - 33.

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento para generar datos probabilísticos para el resultado exitoso de un procedimiento de salud reproductora en un paciente que comprende:
- 5 adquirir, para al menos un embrión que intercambia metabolitos con un medio de cultivo, un espectro de al menos un metabolito de dicho medio de cultivo usando una modalidad analítica elegida;
- 10 generar datos probabilísticos para el al menos un embrión usando el espectro adquirido y una correlación establecida entre el resultado exitoso de un procedimiento de salud reproductora y el espectro obtenido de un metabolito de un medio de cultivo y el metabolito usando la modalidad analítica elegida para una población de pacientes.
- 15 2. El procedimiento de la reivindicación 19 en el que dicha modalidad analítica es una absorción óptica de varias longitudes de onda.
3. El procedimiento de la reivindicación 19 en el que dicha modalidad analítica es una de dispersión óptica de Raman y fluorescencia óptica.
- 20 4. El procedimiento de la reivindicación 20, en el que dicho espectro óptico es el infrarrojo cercano de longitud de onda corta.
5. El procedimiento de la reivindicación 21, en el que dicho espectro óptico es el infrarrojo cercano.
- 25 6. El procedimiento de la reivindicación 19, en el que dicha modalidad analítica elegida es una RMN.
7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 24, en el que dicho procedimiento de salud reproductora es una fecundación *in vitro*.
- 30 8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 24, en el que dicho procedimiento de salud reproductora se refiere a la implantación de un embrión
9. El procedimiento de las reivindicaciones 1 a 46, en el que dicho medio de cultivo está congelado.
- 35



**Figura 1**

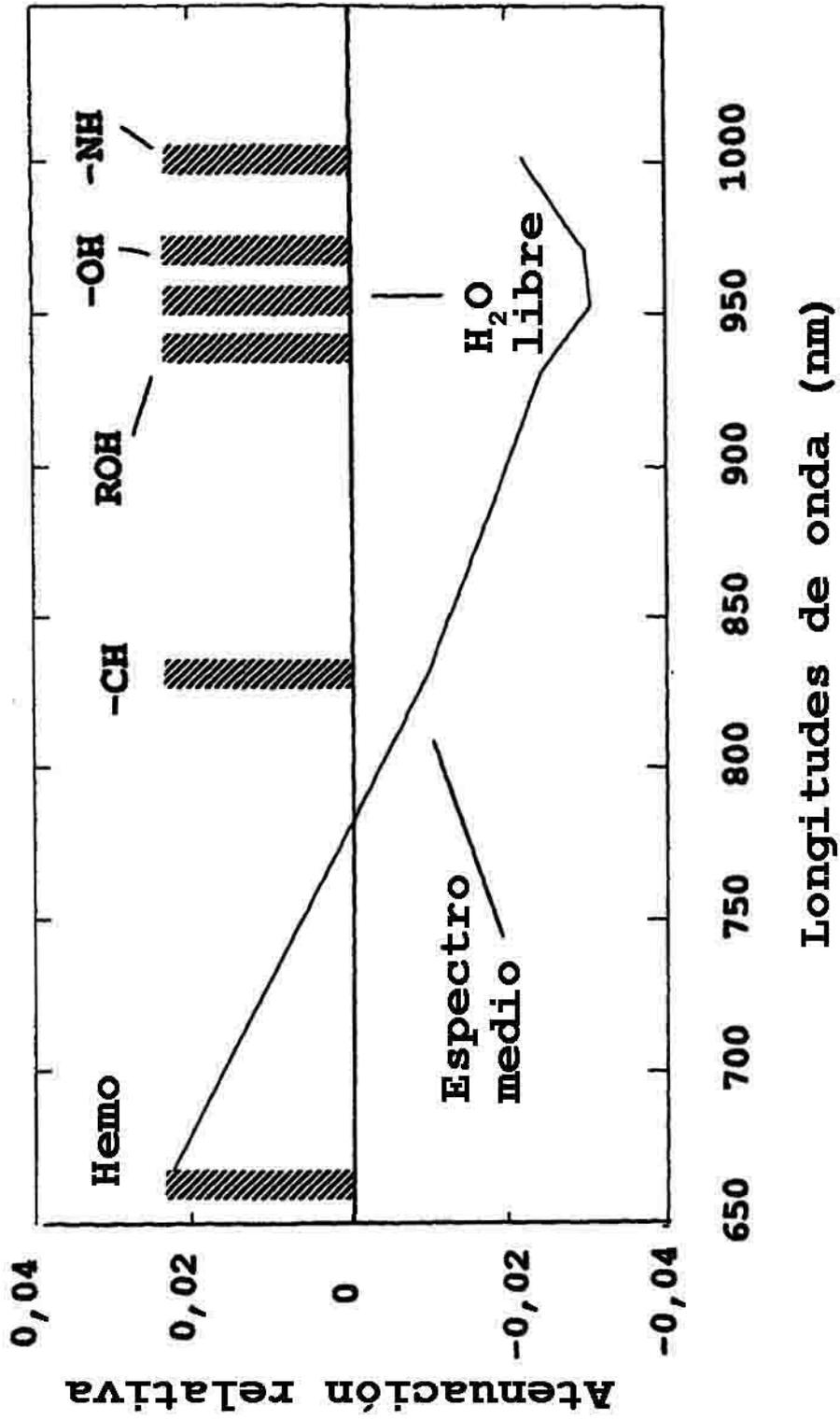


Figura 2

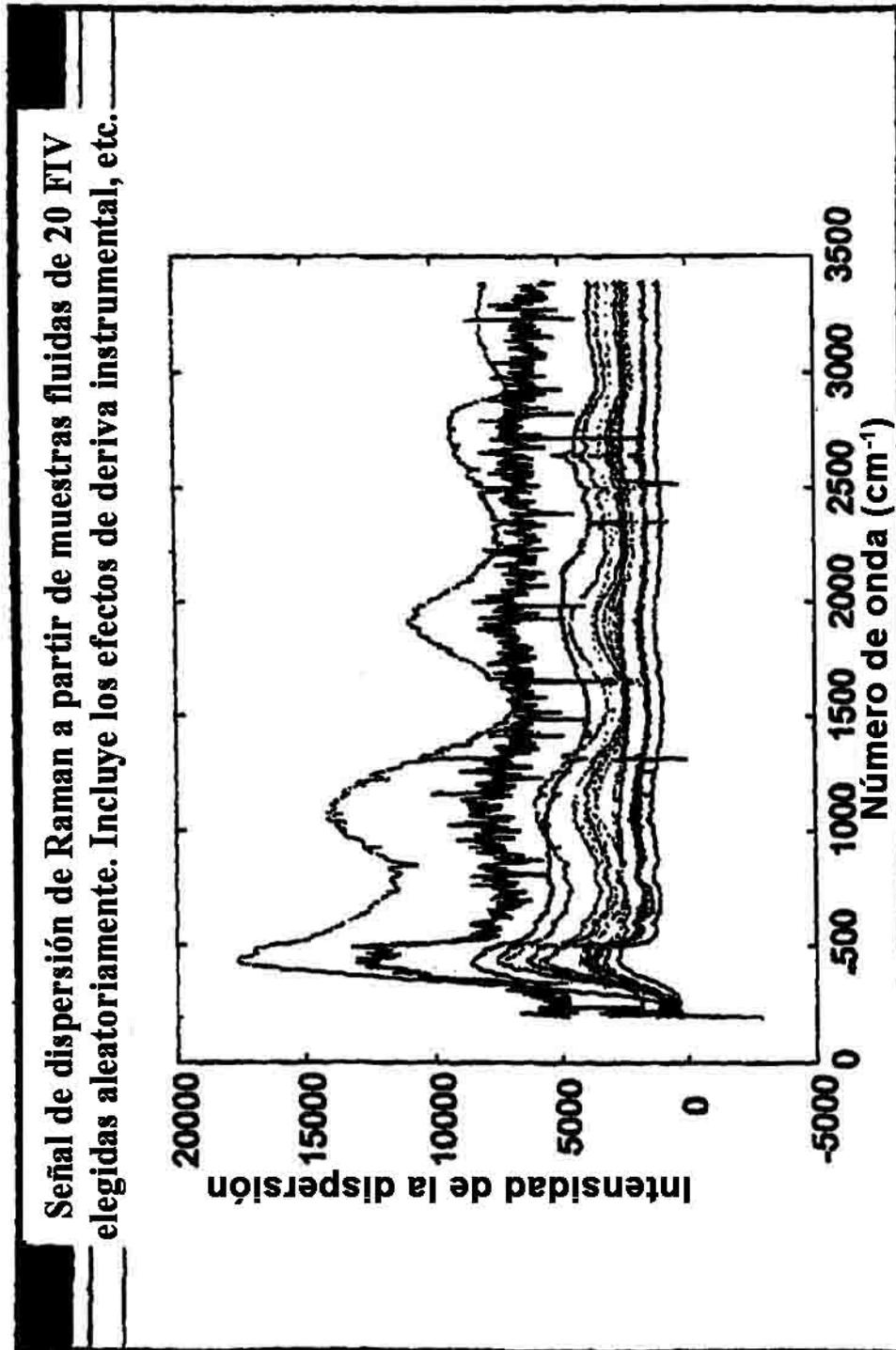
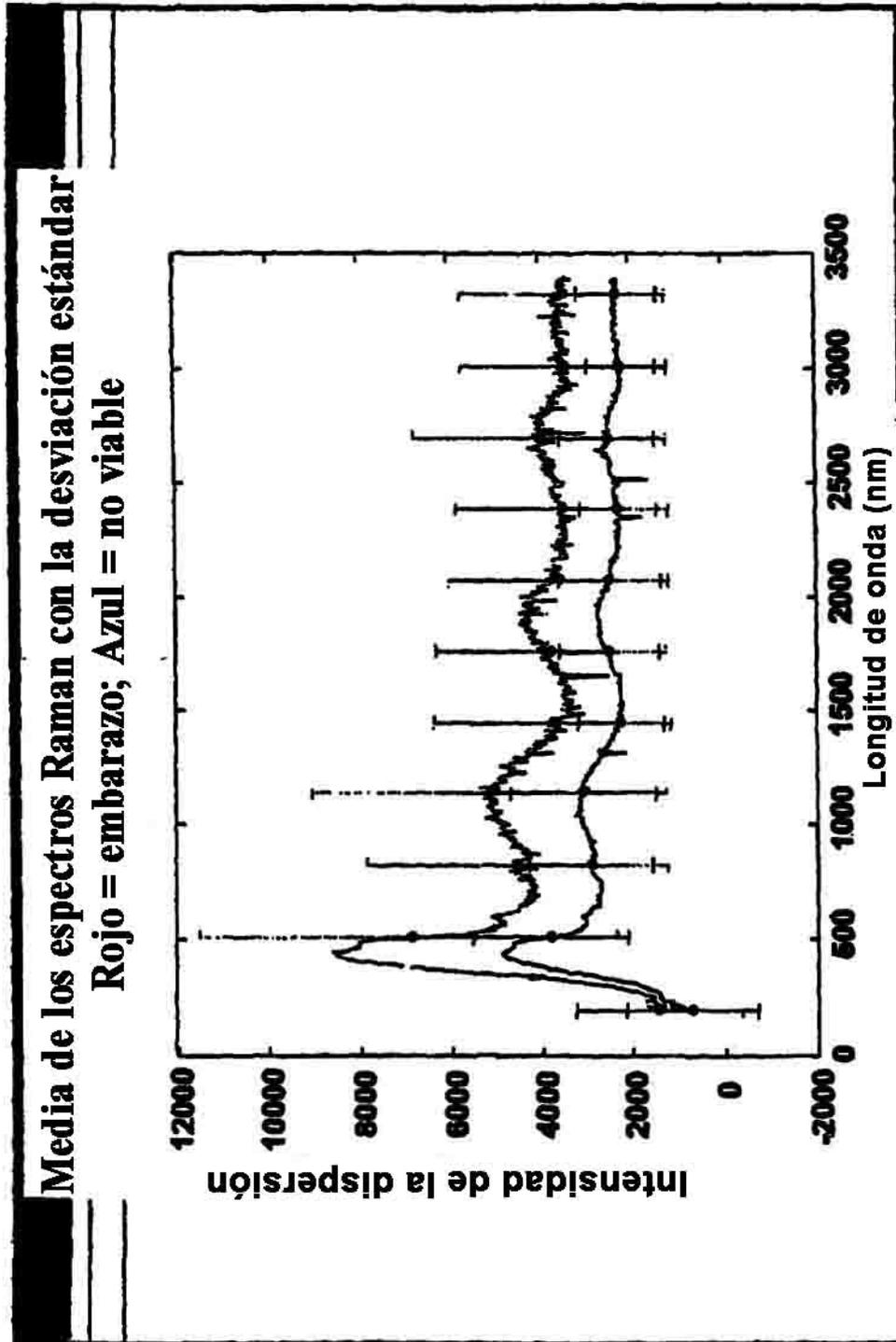
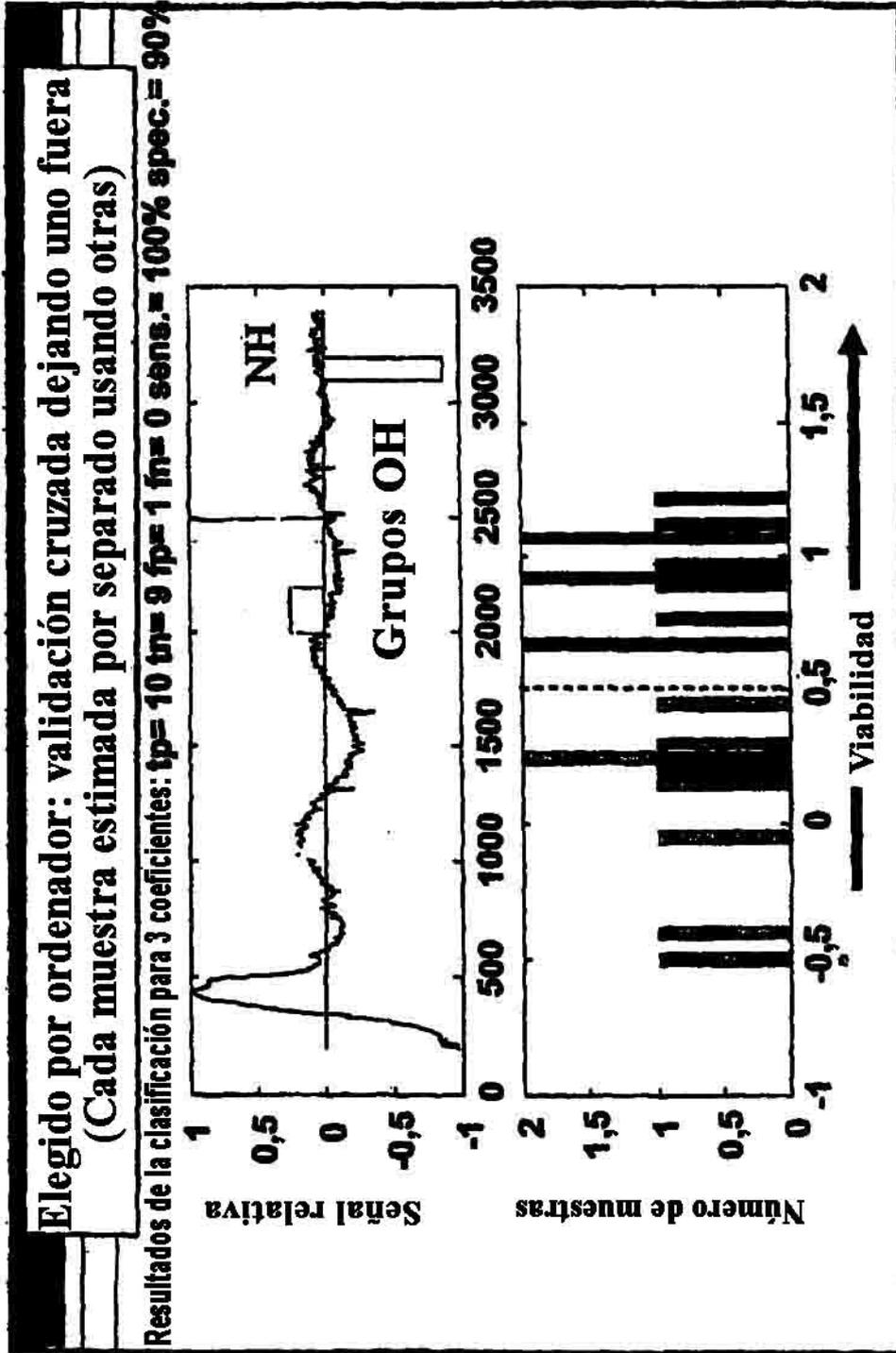


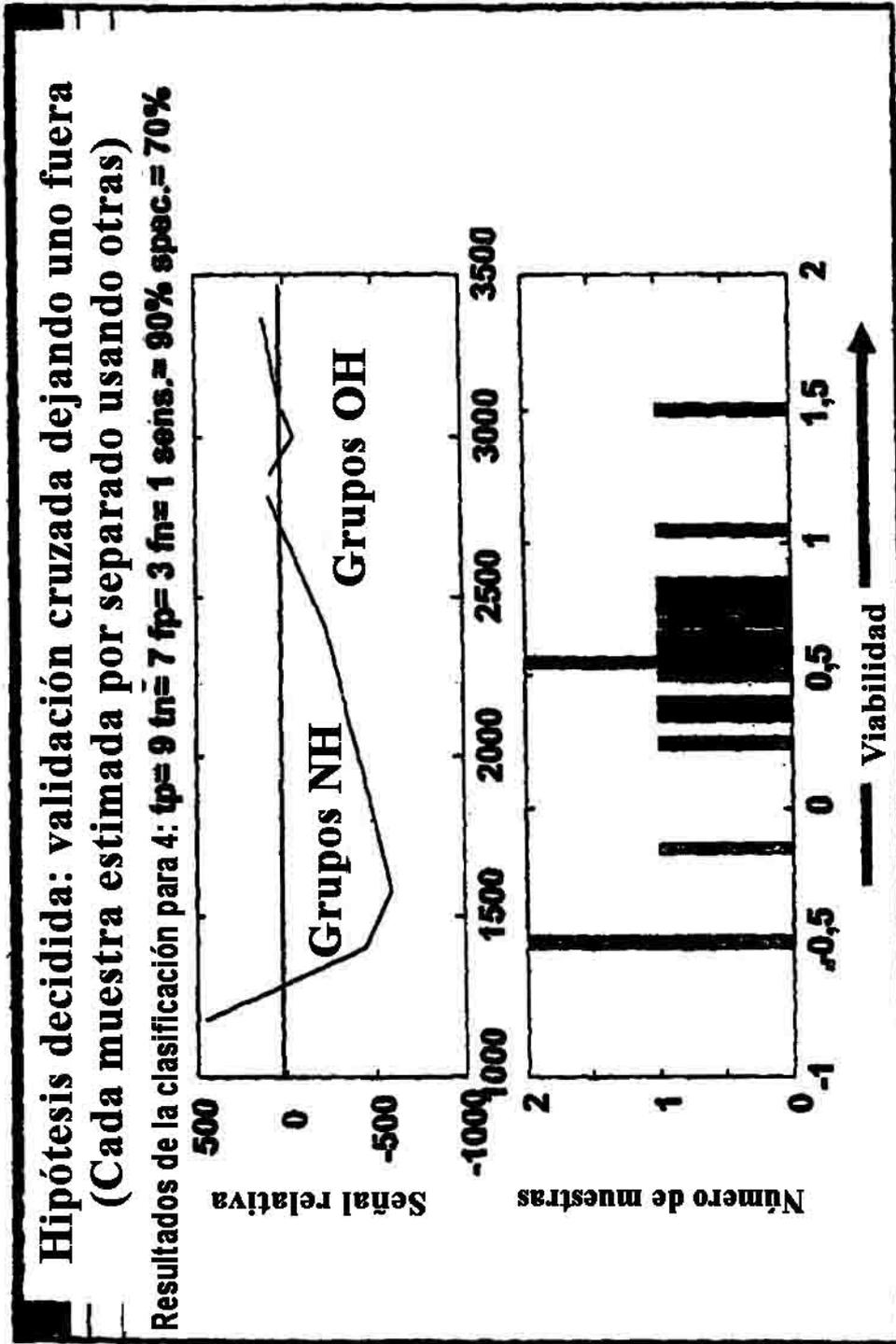
Figura 3



**Figura 4**



**Figura 5**



**Figura 6**

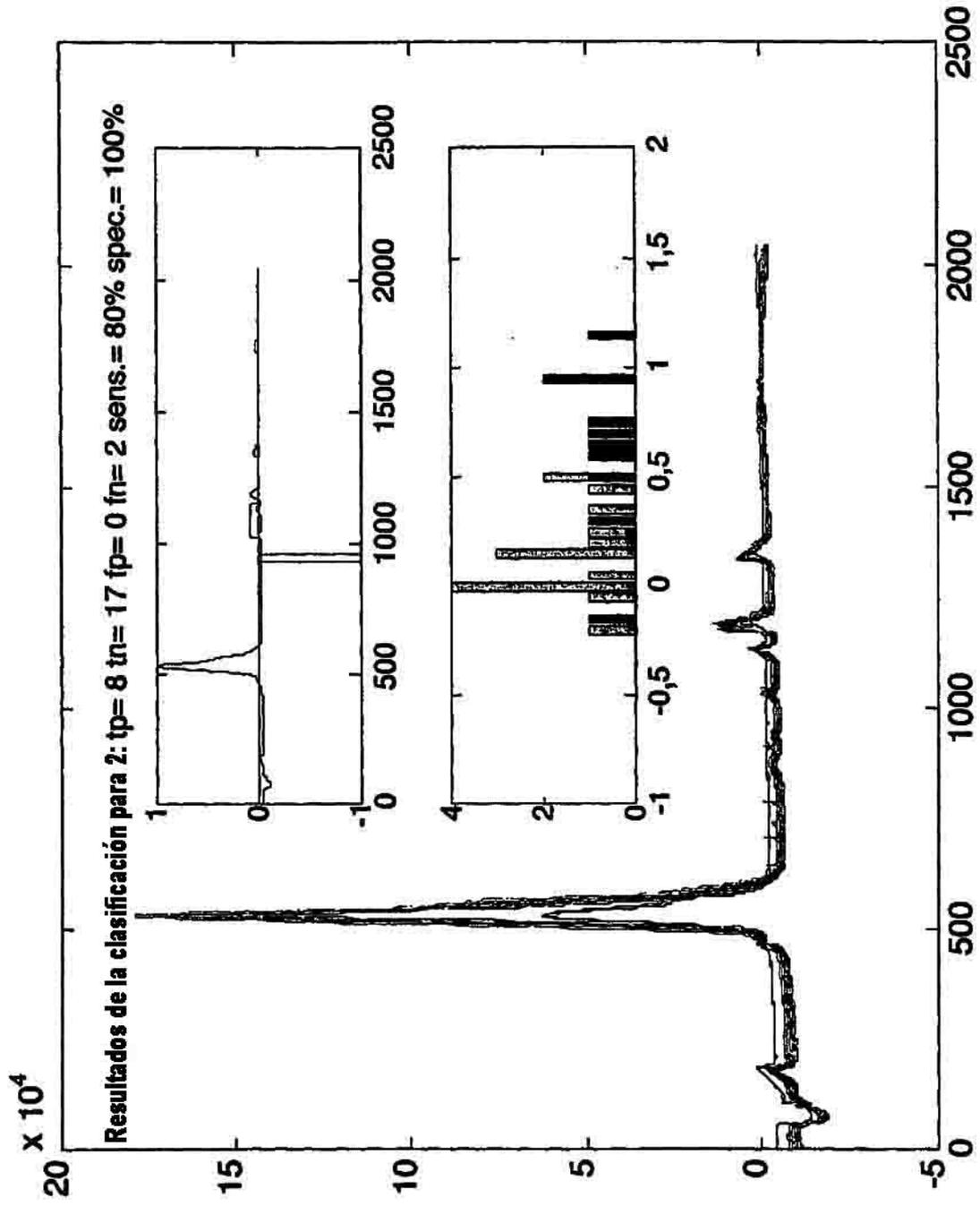


Figura 7