

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 549 205**

51 Int. Cl.:

G06T 7/00 (2006.01)

G06T 7/20 (2006.01)

C12M 1/34 (2006.01)

C12M 1/36 (2006.01)

C12M 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.10.2006 E 06791469 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.07.2015 EP 1949297**

54 Título: **Determinación de un cambio en una población de células**

30 Prioridad:

14.10.2005 DK 200501438

14.10.2005 US 726795 P

16.06.2006 DK 200600821

16.06.2006 US 814115 P

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

26.10.2015

73 Titular/es:

UNISENSE FERTILITECH A/S (100.0%)

Tueager 1

8200 AARHUS N, DK

72 Inventor/es:

RAMSING, NIELS B. y

BERNTSEN, JØRGEN

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 549 205 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 de un cambio en una población de células

- 5 La presente invención se refiere a un método y un sistema para la determinación de un cambio en una población de células, como un método para el uso de dicho método y sistema para la estimación de una medida de la calidad de los embriones y para seleccionar embriones para fertilización *in vitro*.

Antecedentes

- 10 La infertilidad afecta a más de 80 millones de personas en todo el mundo. Se estima que un 10 % de todas las parejas experimentan infertilidad primaria o secundaria (Vayena *et al.* 2001). La fertilización *in vitro* (FIV) es un tratamiento médico opcional que puede proporcionar a una pareja, que de otro modo ha sido incapaz de concebir, una posibilidad para conseguir un embarazo. Es un proceso en el que se toman óvulos (ovocitos) de los ovarios de una mujer y a continuación se fertilizan con espermatozoides en el laboratorio. Los embriones creados en este proceso se colocan en el útero para la implantación potencial. Para evitar embarazos múltiples y partos múltiples solamente se transfieren unos pocos embriones (normalmente menos de cuatro y de forma ideal solamente uno (Bhattacharya *et al.* 2004)). La selección de embriones adecuados para la transferencia es una etapa crítica en cualquier tratamiento de IVF. Los procedimientos de selección actuales, en su mayoría, se basan en la evaluación morfológica del embrión en diferentes puntos de tiempo durante el desarrollo y en particular en una evaluación en el momento de la transferencia usando un microscopio estereoscópico convencional. Sin embargo, está ampliamente reconocido que el procedimiento de evaluación necesita mejoras cualitativas así como cuantitativas.

- 25 *División celular temprana.* Un nuevo enfoque prometedor es el uso de la 'división temprana' en la etapa de 2 células, (es decir, antes de 25-27 h después de la inseminación/inyección), como un indicador de calidad. En este enfoque, los embriones se inspeccionan visualmente 25-27 horas después de la fertilización para determinar si se ha completado la primera división celular. Varios estudios han demostrado una fuerte correlación entre la escisión temprana y el potencial de desarrollo posterior de los embriones individuales. (Shoukir *et al.*, 1997; Sakkas *et al.*, 1998, 2001; Bos-Mikich *et al.*, 2001; Lundin *et al.*, 2001; Petersen *et al.*, 2001; Fenwick *et al.*, 2002; Neuber *et al.*, 2003; Salumets *et al.*, 2003; Windt *et al.*, 2004). Varios observadores han señalado la necesidad de una observación más frecuente, sin embargo, las observaciones visuales frecuentes con transferencias asociadas desde la incubadora a un microscopio invertido inducen un estrés físico que puede impedir o incluso detener el desarrollo del embrión. También es un proceso lento y difícil de incorporar en la rutina diaria de las clínicas de IVF.

- 35 Varios investigadores han realizado adquisición de imágenes de intervalos de tiempo durante el desarrollo del embrión. Esto se ha realizado principalmente mediante la colocación de un microscopio de investigación dentro de una incubadora o construyendo una "plataforma de incubadora" en una platina de un microscopio con la adquisición automatizada de imágenes. La "incubadora" mantiene una temperatura aceptable (37 °C), humedad (> 90 %) y composición del gas (CO₂ al 5 % y en algunos casos concentración de oxígeno reducida). La evaluación manual de imágenes con intervalos de tiempo ha proporcionado una información importante sobre el calendario y la duración de las divisiones celulares (Grisart *et al.*, 1994, Holm *et al.*, 1998, Majerus *et al.*, 2000, Holm *et al.*, 2002, Holm *et al.*, 2003, Lequarre *et al.*, 2003, Motosugi *et al.*, 2005).

- 45 Una configuración experimental alternativa implica la colocación de un sistema de adquisición de imágenes dentro de una incubadora para observar los embriones durante el desarrollo sin producirles estrés moviéndolos fuera de las condiciones optimizadas dentro de la incubadora. Un sistema comercial, el EmbryoGuard, está siendo fabricado y comercializado por IMT international (véase la lista de la bibliografía). En esta configuración, es posible observar los embriones en línea dentro de la incubadora.

- 50 *Análisis de imágenes convencional.* La puntuación morfológica de imágenes de embriones y vídeos a intervalos de tiempo del desarrollo embrionario se ha basado en el análisis manual en el que el espectador proporciona calidades a la imagen y el ordenador solamente hace un seguimiento de esta clasificación, generando una línea de tiempo con anotaciones que muestran cuando se produjeron grandes cambios. Un ejemplo de este tipo de software es el software de anotación proporcionado con el sistema de adquisición de imágenes a intervalos de tiempo de EmbryoGuard. Algunos ejemplos de análisis manual de vídeos a intervalos de tiempo se pueden encontrar en Grisart *et al.* 1994, Holm *et al.* 1998, Majerus *et al.*, 2000, Holm *et al.*, 2002, Holm *et al.*, 2003, Lequarre *et al.*, 2003, Motosugi *et al.*, 2005.

- 60 El software actual para análisis cuantitativo de imágenes de fotografías de embriones usa un algoritmo semiautomático o asistido por ordenador. Se trata de una puntuación de imágenes asistida por ordenador en la que el usuario usa herramientas de dibujo para delinear estructuras embrionarias que posteriormente se cuantifican basándose en el esquema de las mismas generado por el usuario. En el mercado están disponibles varios programas para realizar análisis semiautomático de embriones (por ejemplo, FertiMorph de ImageHouse, Copenhague, Dinamarca). Se han realizado varios intentos para fabricar un sistema de análisis totalmente automatizado (por ejemplo, tesis PhD de Christina Hnida) para fotografías de embriones. Sin embargo, el uso general de imágenes de contraste de modulación de Hoffmann (HMC) en embriología y laboratorios de IVF ha hecho que la detección celular automática sea difícil.

Se ha desarrollado análisis de imágenes automatizado para otras aplicaciones tales como detección de células mitóticas (Eccles *et al.*, 1986, Klevecz *et al.*, 1988 documento de patentes de Estados Unidos N° US4724543, Belien *et al.*, 1997, y Curl *et al.*, 2004). Todos los algoritmos automáticos informados usan el esquema clásico para análisis cuantitativo de imágenes:

1. Adquirir imagen
2. Aumentar imagen
3. Segmentar imágenes en *regiones de interés* (de ROI) mediante formación de umbrales
4. Hacer recuento y caracterizar las ROI (tamaño, densidad, etc.)

Una descripción general de estas etapas y numerosas variantes de cada una se puede encontrar en artículos de revisión y libros de texto sobre análisis de imágenes (por ejemplo, la revisión del análisis de imágenes histológicas de Oberholzer *et al.*, 1996 o The Image Processing Handbook, 4ª Ed. 2002 de John Russ). Los mejores métodos para mejorar la presentación de estructuras de interés depende de la imagen a la mano (por ejemplo, fotografías en microscopio) y la representación de la estructura de interés (por ejemplo, núcleos), y se han usado muchas variantes diferentes. Sin embargo, siempre se han usado procedimientos de aumento para facilitar la segmentación de la imagen con el fin de identificar y definir regiones de interés. Una vez que estas regiones se han encontrado el identificado, se pueden caracterizar adicionalmente con respecto al área, tamaño, intensidad, posición, etc.

La segmentación en sí misma se consigue mediante la comparación de la intensidad de los píxeles (o una función derivada de la intensidad de los píxeles) hasta un umbral dado. Las áreas por encima del umbral pertenecen a la región de interés (ROI) que normalmente ser objeto (por ejemplo, núcleos) que se debe medir. Se usa en numerosos algoritmos diferentes para esta segmentación, pero siempre sirven para la misma finalidad, es decir, 1 segmentación de la imagen.

El análisis automatizado de imágenes de microscopía en intervalos de tiempo para detectar la división celular se presenta en un artículo de Eccles *et al.*, 1986. El artículo describe un método para la detección automatizada de la división celular en células de mamífero sincronizadas mediante análisis de imágenes en una serie de intervalos de tiempo. El algoritmo de análisis de imágenes que se describe y se usa en este artículo no usa diferencias de intensidad en fases consecutivas. En su lugar, analizar cada imagen mediante la extracción de componentes de la imagen de alta frecuencia, y a continuación formando umbrales y sondeando objetos anulares indicativos de supuestas células mitóticas. Esta operación constituye la segmentación de la imagen para detectar los contornos de la célula y su posición relativa. Las relaciones espaciales y temporales entre anillos en fases consecutivos se examinaron para discernir la aparición de mitosis.

Otro enfoque se presenta en el documento de patente US2003185450 para analizar la secuencia de imágenes mediante el uso de un método de matriz de autosimilitud. La matriz consiste en valores de similitud por pares normalizados. Este método se usa para analizar las similitudes a largo y a corto plazo entre fases.

Sumario de la invención

La presente invención, como se define en las reivindicaciones, se refiere a métodos y sistemas para determinación automatizada de un cambio en o calidad de una población de células, tal como una población de células agrupadas, tal como un embrión. Un cambio puede ser una reorganización celular, tal como movimiento celular o motilidad celular. Algunos cambios relevantes también incluyen división celular y muerte celular. El patrón temporal y la magnitud de los cambios indican la calidad de la población de células. Por lo tanto, la invención facilita la selección de los embriones óptimos al implantar después de la fertilización *in vitro* (IVF) o la invención también se puede usar para determinar el número de divisiones celulares que se producen en un cultivo celular confluyente por unidad de tiempo.

La calidad del embrión se puede derivar del patrón espacio-temporal observado de reorganización celular dentro de la zona pelúcida. La cantidad de reorganización celular en un intervalo de tiempo dado se puede calcular a partir de las diferencias entre imágenes adquiridas de forma secuencial. Como se describe a continuación, la desviación estándar (o varianza) es un parámetro no normalizado usado para cuantificar la cantidad de cambio en la imagen de diferencia resultante. A diferencia de la técnica anterior, se prefiere que el parámetro no se normalice, es decir, que sea una medida de la "diferencia" no de la similitud. Un aspecto novedoso de la invención es que los patrones temporales de reorganización celular dentro de un embrión pueden indicar la calidad del embrión. La reorganización celular corresponde al movimiento de al menos uno, preferentemente más de dos más y lo más preferentemente todas las células dentro del embrión. La reorganización celular se puede relacionar con la división celular, pero tiene la ventaja de ser mucho más rápida y fácilmente detectable ya que no es necesario que las células en particular que experimentan división se tengan que observar directamente, sino que se pueden medir indirectamente mediante la reorganización de las células adyacentes. Debido a los efectos secundarios, no es necesario que los inventores tengan que identificar los objetos que se dividen como "regiones de interés" en la imagen (de hecho, las células que

se dividen pueden incluso no está en la imagen). La reorganización celular surgirá como resultado de la división celular a medida que las células chocan entre sí y una fracción grande (a veces todas) las células cambian de posición después de cada división celular ya que las células embrionarias están limitadas por la zona pelúcida. Sin embargo, otros mecanismos pueden provocar el movimiento celular (y reorganización celular) independiente de la división celular o pueden hacer que el movimiento (y reorganización celular) persista después de que la división celular citoplasmática sea completa.

En particular, la presente invención se refiere al hallazgo de que los parámetros derivados directamente de una imagen de diferencia obtenida por comparación de al menos dos imágenes de la población de células agrupadas se relaciona con un cambio en la población de células agrupadas. Por lo tanto, la presente invención presenta un método mejorado en comparación con los métodos de la técnica anterior. En los métodos de la técnica anterior, que incluyen mejoras usadas para analizar imágenes secuenciales tales como imágenes a intervalos de tiempo, se usa un cálculo de la diferencia de intensidad entre bancos consecutivos para cada píxel en la imagen como punto de partida para el uso posterior de análisis de imagen convencional de aumento y segmentación antes de que se obtenga cualquier información de los embriones o las células.

Por consiguiente, en un primer aspecto, la invención se refiere a un método para determinar un cambio en una población de células que comprende al menos una célula, comprendiendo dicho método las etapas de

- a) adquirir secuencialmente al menos dos imágenes de la población de células
- b) comparar al menos una parte de las al menos dos imágenes obteniendo al menos una imagen de diferencia
- c) calcular un parámetro de la al menos una imagen de diferencia, y
- d) basándose en dicho parámetro calculado, determinar si se ha producido un cambio.

Además, en un segundo aspecto, la invención se refiere a un sistema para determinar un cambio en una población de células que comprende al menos una célula, comprendiendo dicho sistema

- a) medios para adquirir secuencialmente al menos dos imágenes de la población de células
- b) medios para comparar al menos una parte de las al menos dos imágenes obteniendo al menos una imagen de diferencia
- c) ordenador para calcular un parámetro de la al menos una imagen de diferencia, y
- d) medios para determinar si se ha producido un cambio basándose en dicho parámetro calculado.

En un tercer aspecto, la invención se refiere a un método para seleccionar un ovocito o embrión fertilizado adecuado para trasplante, conservación congelado o eliminación comprendiendo dicho método

- a) determinar los cambios en el ovocito o embrión mediante un método tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 - 89, y
- b) seleccionar el ovocito o embrión adecuado para trasplante, conservación congelado o eliminación

En un cuarto aspecto, la invención se refiere a un sistema para determinar la calidad de una población de células que comprende al menos una célula, comprendiendo dicho sistema

- a) medios para adquirir secuencialmente al menos dos imágenes de la población de células
- b) medios para comparar al menos una parte de las al menos dos imágenes obteniendo al menos una imagen de diferencia
- c) ordenador para calcular un parámetro de la al menos una imagen de diferencia, y
- d) medios para determinar si se ha producido un cambio basándose en dicho parámetro calculado.

En un quinto aspecto, la invención se refiere a un método para determinar la calidad de una población de células que comprende al menos una célula, comprendiendo dicho método las etapas de

- a) adquirir secuencialmente al menos dos imágenes de la población de células

- b) comparar al menos una parte de las al menos dos imágenes obteniendo al menos una imagen de diferencia
- c) calcular un parámetro de la al menos una imagen de diferencia, y
- 5 d) basándose en dicho parámetro calculado, determinar la calidad de la población de células.

Además, en una realización preferente, la población de células mencionada es un embrión u ovocito.

Figuras

- 10 Fig. 1 Análisis de imagen a intervalos de tiempo de embriones bovinos obtenido con intervalos de 20 min de 8 a 60 horas después de la fertilización. Las imágenes de diferencia se calcularon como diferencias entre fotogramas consecutivos. En la figura se muestra la intensidad media absoluta para todos los píxeles en la imagen de diferencia (círculos abiertos), la desviación estándar de la intensidad (cuadrados rellenos) y la intensidad máxima observada (triángulos rellenos). La última variable se muestra en la escala al lado derecho y las otras en la
- 15 escala al lado izquierdo. Se observó división celular después de 28 h, 38 h y 48 h.
- 20 Fig. 2 Análisis de imagen de series a intervalos de tiempo en el desarrollo de embrión bovino. Análisis de una serie de 167 imágenes obtenidas a intervalos de 20 min durante el desarrollo del embrión. La pila resultante muestra las imágenes de diferencia calculadas que se analizan para producir las curvas de movimiento que se muestran a continuación. Todos los parámetros del análisis se pueden exportar para procesamiento posterior como un archivo de texto definido con tabuladores.
- 25 Fig. 3 Imágenes del desarrollo de embrión bovino. 167 imágenes obtenidas a intervalos de 20 min comenzando a las 8 horas después de la fertilización
- 30 Fig. 4 Imágenes de diferencia calculadas a partir de las imágenes del embrión que se muestran en la Fig. 3. Se inserta el tiempo de adquisición para cada imagen, horas después de la fertilización.
- 35 Fig. 5 Salida gráfica de la macro de ImageJ mostrada en la Fig. 4. La línea de color Gris es la Desviación estándar y la línea de color Negro es la media absoluta de la intensidad de diferencia.
- 40 Fig. 6 Detección de divisiones celulares en una monocapa confluyente de células, (por ejemplo, células madre que crecen en una capa de células alimentadoras/de soporte). El análisis directo del área total se muestra con símbolos abiertos en la parte superior del gráfico. El análisis de cada uno de los cuatro cuartiles (indicados en la fotografía) se muestra a continuación. La interpretación del área total del gráfico es difícil mientras que las divisiones celulares individuales se pueden observar claramente en cada cuartil que se muestra a continuación. Todos los datos usados son teóricos para ilustrar el principio del método.
- 45 Fig. 7 Actividad de blastómeros de dos embriones bovinos representativos. "Bueno" se desarrolló hasta blastocito en eclosión, mientras que "Malo" nunca se desarrolló hasta blastocito.
- 50 Fig. 8 Actividad de blastómeros de 41 embriones bovinos de 24 a 175 horas después de la fertilización. La actividad de blastómeros se presenta como una pseudoimagen de gel en la que los picos de motilidad se indican mediante bandas oscuras y la inactividad es de color blanco y cada calle corresponde a un solo embrión y cada píxel corresponde a la diferencia obtenida a los 30 minutos.
- 55 Fig. 9 Actividad de blastómeros de trece embriones bovinos representativos. Los embriones "buenos" que se desarrollaron hasta un blastocito en eclosión se representan con curvas verdes. Los embriones "malos" que nunca se desarrollaron hasta blastocito se muestran en rojo. El eje X es el número de fotogramas, el eje y es la actividad de blastómeros. La adquisición de imágenes se inició 24 horas después de la fertilización y avanzó con 2 fotogramas por hora. Las curvas verdes se han desplazado sobre el eje y añadiendo 30 al valor de la actividad de blastómeros.
- 60 Fig. 10 Actividad de blastómeros promedio para todos los fotogramas adquiridos (Zona clara = alta actividad de blastómeros, zona oscura = baja actividad de blastómeros).
- 65 Fig. 11 Actividad de blastómeros de 21 embriones bovinos que no se desarrollaron hasta blastocitos de alta calidad. Se indican las tres partes de las curvas que se usan para clasificar el patrón de actividad de blastómeros.
- Fig. 12 Actividad de blastómeros de 18 embriones bovinos que no se desarrollaron hasta blastocitos de alta calidad. Se indican las tres partes de las curvas que se usan para clasificar el patrón de actividad de blastómeros.

Fig. 13 Aplicación de los criterios de selección basándose en A) $R1$ = relación entre la actividad de blastocitos promedio en la parte 1 y en la parte 3 del patrón de actividad de blastocitos. B) $R2$ = relación entre la desviación estándar de la actividad de blastocitos en la parte 2 y en la parte 3 del patrón de actividad de blastocitos.

5 Fig. 14 Correlación entre las divisiones celulares detectadas manual y automáticamente para 13 embriones representativos. No se detectó aproximadamente un 10 % de las divisiones celulares con este algoritmo, pero por lo demás la correspondencia es excelente.

Fig. 15 Divisiones celulares detectadas manualmente para embriones buenos y malos.

10

Descripción detallada de la invención

Definiciones

15 Periodo de división celular: el periodo de tiempo desde la primera observación de indentaciones en la membrana celular (lo que indica el comienzo de la división citoplasmática) hasta que la división celular citoplasmática se completa de manera que se segrega el citoplasma de las consiguientes células hijas en dos células separadas.

20 Periodo entre divisiones: el periodo de tiempo desde el final de un periodo de división celular hasta el comienzo del periodo de división celular posterior.

Ciclo de división: El intervalo de tiempo entre el comienzo de divisiones celulares consecutivas, es decir, desde el inicio de un periodo de división celular hasta el inicio de la división celular posterior.

25 Movimiento celular: Movimiento del centro de la célula y de la membrana celular externa. El movimiento interno de los orgánulos dentro de la célula NO es movimiento celular. La membrana celular externa es una estructura dinámica, de modo que el límite celular cambiará continuamente su posición ligeramente. Sin embargo, estas ligeras fluctuaciones no se consideran movimiento celular. El movimiento celular se produce cuando el centro de gravedad para la célula y su posición con respecto a otras células cambian así como cuando se dividen las células. El movimiento celular se puede cuantificar calculando la diferencia entre dos imágenes digitales consecutivas de la célula en movimiento.

30 Movimiento de orgánulos: Movimiento de orgánulos internos y membranas de orgánulos dentro del embrión que puede ser visible mediante microscopía. El movimiento de orgánulos no es movimiento celular en el contexto de la presente solicitud.

35 Reordenación celular: Un desplazamiento en la posición de dos o más células en la población. La reorganización celular implica movimiento celular de dos, o preferentemente más, lo más preferentemente todos los blastómeros en el embrión.

40 Imagen: Un conjunto de datos transformados o sin transformar que corresponden a una distribución espacial dividida en píxeles espaciales (2D) o vóxeles (3D) registrados a partir de la población de células. Se entiende que los píxeles en la descripción de la invención se pueden reemplazar con vóxeles sin apartarse del alcance de la invención.

45 Imagen de diferencia: Un conjunto de datos transformados o sin transformar que corresponden a una distribución espacial dividida en píxeles espaciales (2D) o vóxeles (3D) a partir del conjunto de datos de dos imágenes mediante un cálculo de píxel a píxel.

Método y sistema para determinar la reorganización celular

50

La presente invención es un método y un sistema para determinar cambios en una población de células, tal como una población de células agrupadas, tal como embriones en desarrollo, mediante el análisis de imágenes a intervalos de tiempo de la población de células agrupadas para determinar cuándo se ha producido un cambio en una célula así como el nivel de actividad general de la población de células.

55

60 En el presente contexto, la expresión "población de células agrupadas" se refiere a una población de dos o más células, en particular una población de una o más células en la que una celular en la población de células conduce a un cambio de 3 dimensiones en la posición relativa de una o más células en la población de células. Por lo tanto, la población de células agrupadas es preferentemente una población de células que crece en una agrupación en oposición a una población de células que crece solamente en una o dos dimensiones. Algunos ejemplos de poblaciones celulares agrupadas son un embrión en desarrollo o un grupo de células madre que crecen en una capa alimentadora o una capa celular confluyente en la que los límites de las células individuales son difíciles de discernir.

Embrión

5 Un embrión es aproximadamente esférico y está formado por una o más células (blastómeros) rodeadas por una envuelta similar a gelatina, una matriz celular conocida como zona pelúcida. La zona pelúcida realiza una variedad de funciones hasta que el embrión eclosiona, y es un buen punto de referencia para la evaluación del embrión. La zona es esférica y traslúcida, y se debe poder distinguir claramente de los residuos celulares.

10 Un embrión se forma cuando se fertiliza un ovocito mediante fusión o inyección de un espermatozoide (espermatozoos). El término se usa tradicionalmente también después de la eclosión (es decir, la ruptura de la zona pelúcida) y la consiguiente implantación. Para los seres humanos, el ovocito fertilizado se denomina tradicionalmente embrión durante las primeras 8 semanas. Después de esto (es decir, tras ocho semanas y cuando se han formado todos los órganos principales) se denomina feto. Sin embargo, la distinción entre embrión y feto por lo general no está bien definida.

15 Durante el desarrollo embrionario, los números de blastómeros aumentan geoméricamente (1-2-4-8-16- etc.). La división celular sincrónica se mantiene generalmente hasta la fase de 16 células en los embriones. Después de esto, la división celular se vuelve asincrónica y por último las células individuales poseen su propio ciclo celular. Para las células de bovino: las células que componen el embrión se deberían identificar fácilmente hasta las fases de 16 células como células esféricas. Después de la fase de 32 células (fase de mórula), los embriones experimentan compactación. Como resultado, las células individuales en el embrión son difíciles de evaluar más allá de esta fase.
 20 Para los embriones humanos, la compactación se produce un poco antes y no se puede hacer el recuento de los blastómeros individuales fácilmente en la fase de 16 células. Los embriones humanos producidos durante el tratamiento de infertilidad se transfieren habitualmente al receptor antes de la fase de mórula, mientras que a menudo otros embriones de mamíferos se cultivan experimentalmente hasta una fase de desarrollo adicional (blastocitos expandidos) antes de su transferencia al receptor o su eliminación. En algunos casos, los embriones humanos también se cultivan hasta la fase de blastocito antes de su transferencia. Esto se realiza preferentemente cuando hay disponibilidad de muchos embriones de buena calidad o es necesaria una incubación prolongada para esperar el resultado de un diagnóstico genético preimplantación (PGD). Por consiguiente, el término embrión se usa de la forma convencional para indicar cada una de las fases de ovocito fertilizado, cigoto, 2 células, 4 células, 8
 25 células, 16 células, mórula, blastocito, blastocito expandido y blastocito eclosionado.
 30

Capa de células confluentes y otros ejemplos de aplicación de la presente invención

35 La presente invención también se puede usar para detectar divisiones celulares en otros cultivos celulares que desarrollan embriones. Son de interés en particular los casos en los que los límites de las células individuales son difíciles de determinar exactamente, y el análisis de imágenes clásico que implica segmentación e identificación de objetos celulares son difíciles de realizar. Estos casos incluyen investigaciones de división celular en grupos de cultivo; divisiones celulares en o sobre capas de células confluentes tales como bicapas o muestras de tejido. También pueden incluir divisiones celulares de células que crecen por encima de las capas de células alimentadoras tales como células madre, o células que crecen por encima de otras estructuras que hacen que la segmentación tradicional sea difícil.
 40

Adquisición de una imagen

45 El término "imagen" se usa para describir una representación de la región a examinar, es decir el término imagen incluye representaciones en 1 dimensión, representaciones en 2 dimensiones, representaciones en 3 dimensiones así como representaciones en n dimensiones. Por lo tanto, el término imagen incluye un volumen de la región, una matriz de la región así como una matriz de información de la región.

50 La imagen de la población de células agrupadas puede estar formada por cualquier tipo de imagen, tal como fotografías, películas fotográficas, e imágenes digitales en términos de una imagen generada y presentada en un chip de CCD, chip de CMOS, cámara de vidrio, cámara fija, escáner de lecho plano, escáner de tambor, escáner láser, fotomultiplicador, matriz digitalizada o cualquier otro dispositivo de adquisición de imágenes similar, sin embargo es preferente que la imagen se digitalice con el fin de facilitar la posterior comparación de imágenes.
 55

En particular, la imagen puede ser imágenes de contraste de fase, imágenes de campo oscuro, imagen de campo brillante usando óptica de Köhler, imagen de contraste de modulación de Hoffmann, imagen de contraste de modulación de la interferencia, imagen de polarización, una imagen de fluorescencia, una imagen infrarroja, o una imagen cercana al infrarrojo, una imagen ultravioleta o una combinación de las mismas o cualquier otro tipo de
 60 óptica que visualiza los límites de las células individuales y/o los orgánulos celulares tales como el núcleo. Normalmente, las imágenes de 8 bits (es decir, 256 niveles de gris diferentes) son adecuadas, sin embargo también se pueden usar imágenes de alta resolución (12 o 16 bits). Las imágenes en color se pueden convertir a imágenes en escala de grises antes del análisis, pero también se pueden analizar en espacios de color diferentes o de color separado ya que puede ser útil para imágenes de fluorescencia compuestas. Por otra parte, los píxeles pueden
 65 tomar valores positivos así como negativos.

Sin embargo, las imágenes en cuestión son imágenes de células vivas, por lo que los medios de producción de las

imágenes no debería perjudicar preferentemente a las propias células.

5 Por lo tanto, dentro de la expresión "adquisición de una imagen" se incluye tanto que las imágenes se puedan adquirir a partir de una cámara, como también desde un medio de almacenamiento digital, CPU del ordenador, disco duro, CDROM, libro, impresión, fotografía tradicional e imágenes escaneadas así como otras fuentes. Sin embargo, en la mayoría de los casos, las imágenes serán adquiridas con una cámara digital.

10 Normalmente, la imagen se adquiere usando un microscopio, tal como una cámara digital montada en un microscopio o un sistema de lente equivalente. El nivel de aumento y resolución de la imagen generalmente no es crítico, siempre y cuando el embrión incluía preferentemente al menos 25 píxeles en la imagen, tal, al menos cien píxeles en la imagen. En una aplicación habitual, el embrión ocupará varios miles de píxeles. En general, se deberían usar el contraste y el aumento posible más elevados, aunque las fotografías se pueden reducir a escala posteriormente durante el análisis (véase a continuación). sin embargo, en los casos en los que las fotografías son de muy alta resolución (>> 1 millón de píxeles), puede ser necesario hacer una escala de la fotografía para reducir su tamaño (véase a continuación).

20 Preferentemente, la resolución eficaz de las al menos dos imágenes mencionadas se selecciona de modo que la dimensión mayor de la población de células mencionada ocupa de 1 píxel a 10 mega píxeles, preferentemente de 10 píxeles a 1 mega píxel, preferentemente 50-1000 píxeles, preferentemente 100-1000 píxeles, preferentemente 200-1000 píxeles, preferentemente 500-1000 píxeles, preferentemente 200-500 píxeles.

25 En una realización, la resolución eficaz de las al menos dos imágenes mencionadas se selecciona de modo que la dimensión mayor de la población de células mencionada ocupa básicamente 1-10 píxeles, o 10-50 píxeles, o 50-100 píxeles, o 100-200 píxeles, o 200-500 píxeles, o 500-1000 píxeles, o 1000 píxeles -1 mega píxeles, o 1-10 mega píxeles, o más de 10 mega píxeles.

30 Preferentemente, una secuencia de imágenes consecutivas se adquiere a partir de la población de células que tiene un número de imágenes, tal como al menos 2 imágenes, tal como al menos 3 imágenes, tal como al menos 4 imágenes, tal como al menos 5 imágenes, tal como al menos 6 imágenes, tal como al menos 7 imágenes, tal como al menos 8 imágenes, tal como al menos 9 imágenes, tal como al menos 10 imágenes, tal como al menos 25 imágenes, tal como al menos 50 imágenes, tal como al menos 100 imágenes, tal como al menos 200 imágenes, tal como al menos 1000 imágenes, tal como al menos 10000 imágenes, tal como al menos 100000 imágenes, tal como al menos 1 millón de imágenes, tal como al menos 50 millón de imágenes.

35 El tiempo entre dos adquisiciones consecutivas es preferentemente como máximo el que corresponde al periodo de tiempo de una división celular, y, por otro lado, es preferente adquirir un número mínimo de imágenes con el fin de facilitar el procesamiento.

40 Preferentemente, el tiempo entre dos adquisiciones consecutivas es al menos 1/100 de un segundo, preferentemente al menos 1/50 de un segundo, preferentemente al menos 1/10 de un segundo, preferentemente al menos 1 segundo, preferentemente al menos 10 segundos, preferentemente al menos 1 minuto, preferentemente al menos 2 minutos, preferentemente al menos 10 minutos, preferentemente al menos 30 minutos, tal como aproximadamente de 30 minutos a 1 hora.

45 Además, el tiempo entre dos adquisiciones consecutivas es preferentemente como máximo de 2 horas, tal como, como máximo de 1,5 horas, tal como, como máximo de 1 hora, tal como, como máximo de 30 minutos, tal como, como máximo de 20 minutos, tal como, como máximo de 10 minutos, tal como, como máximo de 5 minutos, tal como, como máximo de 2 minutos, tal como, como máximo de 1 minuto.

50 Imagen de diferencia

55 Los intentos anteriores para detectar la división celular en los embriones han intentado segmentar la imagen para hacer el recuento del número de blastómeros (= células) presentes y para determinar cuando aumenta ese número. Este método funciona bien para cultivos de células básicamente planas tal como se describe en Eccles para detectar la división celular en líneas celulares de mamífero (Eccles *et al.* 1986). Sin embargo, se hace mucho más difícil hacer esto para embriones en tres dimensiones en los que se tienen que analizar y comparar múltiples imágenes a partir de diferentes planos focales para saber qué secciones son parte del mismo blastómero. Se hace prácticamente imposible, ya que la segmentación de la imagen se realizaron más a menudo en imágenes de contraste de modulación de Hoffmann (HMC) que se interpretan fácilmente con el sistema visual humano, pero no son muy adecuados para análisis de imágenes basadas en ordenador.

65 La presente no se basa en la segmentación de la imagen para identificar regiones de interés tales como el contorno de blastómeros individuales. En cambio, la presente invención estima la reorganización celular en la secuencia de imágenes. Esto se obtiene mediante al menos una y preferentemente una serie de imágenes de diferencia a partir de al menos dos imágenes de la población de células agrupadas. En algunas realizaciones, la imagen o imágenes de diferencia se podría obtener mediante la comparación de la imagen más reciente con una combinación lineal u otra relación funcional de las imágenes anteriores. Al menos un parámetro de dichas imágenes de diferencia se

evalúa para determinar un cambio en la población de células agrupadas. En una realización preferente, la imagen o imágenes de diferencia se obtiene a partir de imágenes consecutivas/posteriores de la población de células.

5 El método implica el cálculo de una imagen de diferencia basándose en fotogramas de imágenes adquiridas. Cualquier imagen de diferencia adecuada se puede aplicar de acuerdo con la invención, tal como una imagen de diferencia obtenida restando dos imágenes, o una imagen de diferencia obtenida mediante el establecimiento de una relación de las dos imágenes. La imagen de diferencia se puede obtener a partir de las imágenes originales como tal o a partir de cualquier imagen de transformación de las dos imágenes. Un ejemplo de esto último es una imagen de diferencia que es la transformación del logaritmo de la relación de intensidades de los píxeles en las dos imágenes
10 originales. (Esto es equivalente a una imagen de diferencia de intensidad entre imágenes transformadas de forma logarítmica). En una realización preferente, la imagen de diferencia puede ser una imagen de diferencia de intensidad.

15 Por lo general, los valores de los píxeles correspondientes en las imágenes están correlacionadas con la intensidad de la luz encontrada en la posición correspondiente a los momentos en los que se adquirieron las imágenes. Sin embargo, otros tipos de valores incluyen valores de fase, tales como de contraste de fase, o características espectrales tales como la relación de la energía en dos bandas espectrales, el centro de gravedad en una distribución espectral o similar. Por consiguiente, en una realización preferente diferente, la imagen de diferencia es una imagen de diferencia de fase o una imagen de diferencia espectral. Además, la primera puede ser adecuada
20 para aplicar el método de la presente invención a las imágenes obtenidas con un microscopio de contraste de fase mientras que la segunda puede ser adecuada para aplicar el método de la presente invención para imágenes en color y/o espectroscopía distribuida espacialmente más avanzada.

25 Por lo tanto, en una realización, las imágenes de diferencia se obtienen restando los valores de intensidad de los píxeles correspondientes en dos imágenes consecutivas, es decir,

$$D_n(i,j) = I_n(i,j) - I_{n-1}(i,j)$$

30 En la que $D_n(i,j)$ es la diferencia de intensidad en la posición i, j en el tiempo n
 $I_n(i,j)$ es la intensidad en la posición i, j en el tiempo n
 $I_{n-1}(i,j)$ es la intensidad en la posición i, j en el tiempo $n - 1$

35 La imagen de diferencia a menudo se presenta como una imagen. Esto requiere una escala apropiada como diferencia calculada que puede ser positiva o negativa. Sin embargo, para el fin de la presente invención no es necesario establecer una representación gráfica de la diferencia, ya que la presente invención no se basa en la segmentación de la imagen de diferencia, sino simplemente en un análisis numérico de todos los valores de los píxeles en la imagen de diferencia $D_n(x,y)$. No es necesaria una representación gráfica que representa la imagen de diferencia. Si se establece una representación gráfica, es ventajoso evitar el redondeo o escala que puede ser
40 indeseado o incluso perjudicial para el algoritmo.

45 En otra realización, la imagen de diferencia se obtiene como la relación de intensidad entre las intensidades de las imágenes para píxeles en imágenes consecutivas. En una realización puede ser ventajoso, para reducir el ruido, transformar las imágenes originales y/o la relación. En una realización, la imagen de diferencia se establece como el logaritmo con respecto a la relación de intensidad (ya sea logaritmo natural o base 10), por ejemplo,

$$Relación_{ij} = \text{Log} \left(\frac{I_n(i,j)}{I_{n-1}(i,j)} \right)$$

50 Una imagen relación logarítmica calculada de esta manera se comportaría de manera muy similar a la imagen de diferencia que se ha descrito anteriormente y se puede analizar para producir una información similar con respecto a la división celular, etc, mediante el cálculo de cualquiera de los parámetros generales que se mencionan a continuación.

55 En una realización preferente, las imágenes de diferencia se obtienen mencionadas a partir de dos imágenes consecutivas en una secuencia de imágenes consecutivas y la recogida de los parámetros calculados a partir de dichas imágenes de diferencia forman una serie de tiempo. Más preferentemente, esta serie de tiempo incluye un patrón temporal de reorganización celular, que se puede interpretar en conjunto con la magnitud de los picos, valles y/o nivel de base para obtener la calidad, estado y/o estado de la población de células.

En una realización preferente, la serie de tiempo mencionada se analiza usando un modelo derivado con herramientas de aprendizaje automático, tales como análisis de PCA, SVD, GPCA, Máquina de Vector de Apoyo, modelo de clasificación de n-tuplos, red neuronal, red neuronal unidireccional.

5 La ventaja de las imágenes obtenidas a intervalos de tiempo regulares es evidente. Sin embargo, se debería indicar que también son posibles el análisis de imágenes de película no regulares. En este caso, se puede aplicar una ponderación para compensar las diferencias en intervalos de tiempo entre fotogramas. Las diferencias entre las imágenes que se obtienen con intervalos de tiempo cortos se aumentan en escala, mientras que las diferencias entre las imágenes con intervalos de tiempo largos se reducen. Incluso puede ser posible adquirir imágenes con una
10 diferencia constante y por lo tanto usar el intervalo de tiempo entre imágenes adquiridas como indicador de división celular.

Una vez que se obtiene la imagen de diferencia, entonces el cambio de una imagen a la siguiente se puede describir mediante el cálculo de un parámetro, preferentemente un parámetro de básicamente todos los píxeles en la imagen de diferencia. Estos parámetros se calculan sobre la base de una lista de los valores de diferencia encontrados en la imagen de diferencia, preferentemente de todos los valores de diferencia encontrados.

Parámetro

20 Cualquier parámetro calculado adecuado se puede usar como indicador de cambio, tal como un parámetro calculado a partir de la imagen de diferencia o parte de la misma, en la que dicha parte se determina de forma no adaptativa, y se selecciona entre el grupo que consiste en: Varianza del valor para los píxeles en la imagen de diferencia; Desviación estándar del valor para los píxeles de la imagen de diferencia; o cualquier otro parámetro derivado de una combinación de uno o más de estos parámetros.

25 En una realización preferente, el parámetro o parámetros se calculan sin segmentación adaptativa de la imagen en regiones de interés, y las regiones que no tienen interés para cada fotograma individual en una serie. Sin embargo, se puede seleccionar una subsección de una imagen original de forma no adaptativa (por ejemplo, recortando la imagen original para centrarse en la parte que contiene el embrión). La subsección se fija preferentemente entre las imágenes de misma serie de intervalos de tiempo de una población de células. La subsección analizado (por ejemplo, que contiene el embrión) se puede comparar con otras áreas de la imagen de referencia para calibrar los parámetros derivados. Un ejemplo podría ser comparar la desviación estándar de la imagen de diferencia para el área que contiene el embrión con una desviación estándar calculada de manera similar en un área vacía de la imagen de diferencia.

35 En algunas realizaciones el parámetro se calcula a partir de un subconjunto de la imagen de diferencia.

En una realización el parámetro calculado a partir de la imagen de diferencia se selecciona entre el grupo de Suma de valores absolutos paralelos para píxeles en la imagen de diferencia; y Varianza de valores para píxeles en la imagen de diferencia. En algunas realizaciones, se podrían usar otras funciones aplicadas a la imagen de diferencia para calcular el parámetro.

40 Cada uno de estos parámetros es un número que cambiará después de un cambio en la población de células agrupadas, tal como división celular, para reflejar cambios en la posición en el límite de la célula en la serie de imágenes investigadas.

En una realización preferente, dicho parámetro se calcula a partir de la al menos una imagen de diferencia basándose en toda la imagen de diferencia.

50 Como se ha descrito anteriormente, el parámetro se puede calcular a partir de todos los valores de píxeles en la imagen de diferencia, tales como varianza de valores para todos los píxeles en la imagen de diferencia.

La invención se basa en la observación de que las posiciones en la célula por lo general son relativamente estacionarias entre divisiones celulares, texto durante un breve intervalo de tiempo alrededor de cada división celular, en el que la división de una célula en dos causa una reorganización considerable de las células en división, así como de las células circundantes. Esta reorganización se refleja en la imagen de diferencia, en la que las posiciones cambiantes de los límites de la célula (es decir, las membranas celulares) hace que todos los parámetros derivados anteriormente para la imagen de diferencia aumenten temporalmente, tal como un aumento en la varianza. Por lo tanto, se pueden detectar divisiones celulares mediante el cambio temporal, un aumento o una
60 disminución, en valor medio absoluto para todos los píxeles en la imagen de diferencia o cualquier otro de los parámetros derivados que se han enumerado anteriormente.

La invención se basa en el análisis de los cambios temporales en los parámetros derivados. Es de interés en particular el comienzo, magnitud y duración de extremos, picos o valles pronunciados, en los valores del parámetro. Estos extremos, picos o valles, indican frecuentemente sucesos de división celular y el tiempo y duración de estos sucesos se puede usar para caracterizar una población de células dada, tal como un embrión, y para evaluar su potencial de desarrollo. La forma de cada pico también puede proporcionar información adicional al igual que lo

puede hacer el tamaño del pico en general. Un pico también podía indicar un colapso brusco de un blastómero y la muerte celular simultánea. Sin embargo, puede ser posible separar sucesos de división celular y sucesos de muerte celular mediante la forma del pico y cambiar los valores en base antes y después del suceso.

5 La Fig. 1 muestra que cada división celular está marcada por un pico pronunciado en cada una de las variables derivadas. Por lo tanto, la división celular se puede detectar mediante un aumento marcado en cada una de las numerosas variables derivadas, por ejemplo la varianza de intensidad o desviación estándar tal como se representa en la Fig. 1.

10 En una realización preferente, el parámetro mencionado es una representación de la diferencia entre las imágenes comparadas. En una primera realización preferente, el parámetro se mantiene sin normalizar con respecto a otro u otros parámetros, derivados a partir de un cálculo idéntico, a partir de otras imágenes de diferencia obtenidas a partir de la misma población de células. Esto permite una comparación cuantitativa entre los valores de parámetros obtenidos a partir de dos una población de células y los valores obtenidos a partir de una población de células diferente. En una segunda realización preferente, el parámetro mencionado no se calcula ni se ajusta a un valor normalizado entre 0 y 1. En una tercera realización preferente, el parámetro calculado no se correlaciona con el cálculo de valores en una matriz de autosimilitud.

20 Por lo tanto, la presente invención proporciona un método mediante el que es posible determinar la división celular directamente y es posible determinar el tiempo exacto de las primeras divisiones celulares.

Forma del cambio en la imagen de diferencia

25 Como se ha descrito anteriormente, la invención proporciona un método para determinar el comienzo de un cambio en la población de células. Sin embargo, en una realización la invención también se proporciona un método para determinar la calidad y/o cantidad de información sobre el cambio, en el que también se considera que la forma del pico es importante. Un pico estrecho intenso debería reflejar una división celular rápida con fragmentación mínima. Mientras que los picos menos pronunciados más anchos deberían reflejar divisiones más lentas posiblemente con más fragmentación. Esto se hace incluso más importante con picos que corresponden a divisiones celulares posteriores ya que un segundo pico intenso podría indicar división celular sincronizada de 2 células a 4 células, un pico más ancho o incluso bimodal indicaría que las divisiones eran asincrónicas (es decir, de 2 a 3 células y a continuación de 3 a 4 células). En definitiva, un análisis detallado de la posición del pico, altura, ancho y forma proporciona información importante sobre el suceso división particular. En este contexto se entiende como sincronizadas todas las divisiones celulares que se producen dentro de un intervalo de tiempo de 5 horas, más preferentemente dentro de 3 horas, más preferentemente dentro de 1 hora.

40 En lo anterior, alto se considera como mayor que 2 veces la desviación estándar del parámetro calculado, preferentemente mayor que 3 veces la desviación estándar del parámetro calculado, más preferentemente mayor que 5 veces la desviación estándar del parámetro calculado. Además, intenso se considera que es un pico con una duración de menos de 3 horas, más preferentemente con una duración de menos de 2 horas, lo más preferentemente con una duración de 1 hora o menos. En cambio, se entiende que un pico ancho tiene una duración de más de 3 horas, más preferentemente más de 5 horas, más preferentemente con una duración de más de 10 horas.

45 Nivel de base

Una vez que se han identificado los picos, es posible evaluar el nivel de base de la actividad entre los picos. El nivel de base se entiende como un valor casi estable o que cambia lentamente. A menudo este valor se define como un valor que cambia en menos de un 10 % por hora, preferentemente menos de un 5 % por hora, más preferentemente menos de un 3 % por hora. El nivel de base para cada parámetro entre las divisiones también contiene información útil. El metabolismo celular se asocia con el movimiento de los orgánulos (por ejemplo, ciclación de las mitocondrias en el citoplasma). Este movimiento se refleja en el nivel de base de varios de los parámetros mencionados anteriormente. Este nivel de fondo proporciona información esencial acerca de la extensión del movimiento de los orgánulos en la población celular, un movimiento que se detendrá después de la muerte celular. Por lo tanto, una reducción parcial en el movimiento del orgánulo observado que corresponde a un cambio en el nivel base podría implicar problemas tales como el deterioro de una o más células. A menudo este cambio se observa como un cambio brusco en la línea de base de dicho parámetro calculado indicativo de muerte de al menos una célula. Además, el cambio mencionado se produce a menudo de manera que dicho cambio es un aumento marcado seguido de una reducción brusca del valor medio de la línea de base. En este contexto, por brusco se entiende el cambio en menos de 5 horas, preferentemente en menos de 2 horas, más preferentemente en menos de 1 hora y un aumento marcado se entiende como un aumento notable preferentemente en más de un 5 % en menos de 1 hora, más preferentemente en más de un 10 % en menos de 1 hora, más preferentemente en más de un 30 % en menos de una hora. Por último, la reducción es más a menudo un ligero aumento seguido por una reducción sustancial a m/N del valor original en el que N es el número de células, n la población de células y m es un número entero de 0 a $N-1$.

65 En una realización, la intensidad absoluta media se usa como una medida de la actividad global, y el nivel de base de este parámetro entre los picos se puede observar como un indicador del desarrollo del embrión y posiblemente

de desarrollo potencial.

Para aprovechar totalmente el nivel de base, puede ser necesario limitar el área de evaluación para el contorno general de la población de células y comparar los valores obtenidos para esta región con una región de control fuera del embrión. Por lo tanto, con el fin de establecer el nivel de base, puede ser necesario seleccionar el contorno del embrión con los procedimientos de análisis de imagen convencionales como se describe en la bibliografía. Un ejemplo de esto incluye la comparación del movimiento de las células en el interior del embrión con respecto al "movimiento" fuera de los embriones debido a problemas de movimiento Browniano, etc. Esto se consigue principalmente mediante la definición del embrión y comparando las imágenes de diferencia en el interior del embrión con las diferencias calculadas en un área similar fuera del embrión. La definición del embrión se puede hacer de forma manual o automática mediante formación de umbrales de una imagen que contiene la suma de todas las diferencias absolutas en toda la serie del intervalo de tiempo. El área exterior se puede elegir simplemente como los píxeles restantes o (preferentemente) omitiendo píxeles limítrofes que rodean al embrión exagerando el área del embrión antes de seleccionar el área inversa.

Alineamiento

Una ligera imprecisión en el sistema de posicionamiento de modo que las imágenes consecutivas en una serie temporal no se toman en el mismo lugar debido al movimiento escénico inexacto entre las adquisiciones de imágenes en el intervalo de tiempo puede dar lugar a imágenes de diferencia subóptimas. Estos ligeros desplazamientos en la posición tendrán un efecto sobre las imágenes de diferencia ya que todas las estructuras bien definidas producirán un efecto de halo y sombra en la imagen de diferencia, incluso si no se ha producido cierto movimiento. En una realización, las imágenes consecutivas en un intervalo de tiempo están por lo tanto alineadas, por ejemplo usando algoritmos preexistentes para conseguir esto en combinación con la invención para mejorar los parámetros derivados. Se han descrito varios algoritmos establecidos para alinear imágenes (John Russ, 2002). Una forma muy sencilla de alinear imágenes es comparar la imagen original de una imagen de diferencia con una imagen de diferencia calculada después de desplazar un solo píxel de una de las imágenes originales en una dirección dada. Si la varianza de la imagen de diferencia calculada después de desplazamiento es menor que la varianza de la imagen de diferencia de los originales, entonces el desplazamiento produce una alineación mejorada. Al tratar sistemáticamente todas las posibles direcciones de desplazamiento y todas las magnitudes de desplazamiento relevantes es posible obtener una serie de tiempos alineados. En particular, con respecto a los embriones, la alineación se puede realizar con respecto a la zona pelúcida, es decir, con el objetivo de reducir de la varianza del área que corresponde a la zona pelúcida.

Mejora de la calidad de la imagen y la eliminación de artefactos

En una realización más, se prefiere mejorar la calidad de imagen y eliminar los artefactos. Los artefactos pueden estar relacionados con la ruta óptica y/o electrónica de adquisición de la imagen, por ejemplo, suciedad/manchas colocadas en la lente de la cámara, manchas debidas a artefactos de la cámara, errores de píxel debido a la cámara o errores de CCD, reflexiones que pueden surgir de la población de células y conducir a zonas brillantes.

Por lo tanto, los artefactos son cualquier presentación en la imagen, que no forman parte de la escena de la imagen. Por lo tanto, los artefactos pueden ser, por ejemplo, uno o más de los siguientes: objetos no deseados proyectados sobre la imagen, dispersión, difracción y/o de reflexión del sistema óptico.

Los desplazamientos para compensar el movimiento inexacto normalmente desplazarán la posición de toda la imagen, incluyendo los artefactos de posición fijos mencionados anteriormente. Por lo tanto, las diferencias posteriores incluirán una falsa contribución de los artefactos de posición fija. Por lo tanto, es importante eliminar los artefactos de posición fija antes del desplazamiento. Están disponibles diferentes técnicas convencionales para eliminar los artefactos fijos (véase John Russ, 2002) una versión sencilla es obtener una imagen de referencia desenfocada y restar esta imagen de los objetos de cada imagen de la serie. Un efecto similar se puede obtener restando una imagen promedio de varios fotogramas no relacionados de diferentes embriones. Un promedio de varias imágenes desenfocadas es óptimo.

Además, ligeras inexactitudes en movimiento escénico que tienen menos de un píxel son difíciles de eliminar o compensar mediante una alineación general de fotogramas consecutivos por translación. Sin embargo, incluso desplazamientos ligeros (menos de un píxel) pueden dar una contribución significativa a la imagen de diferencia. Otro problema encontrado normalmente con imágenes de alta calidad son los orgánulos celulares como vacuolas y mitocondrias que pueden ser parcialmente visibles y dar a las células un aspecto granuloso. El movimiento de los orgánulos puede contribuir hasta un punto tal para la imagen de diferencia que la división celular se hace oscura y menos visible en el ruido del movimiento de los orgánulos. Ambos problemas no mencionados se pueden solucionar o incluso eliminar mediante la reducción del tamaño de la imagen (reducción de la escala de la imagen) o desenfocando / suavizando ligeramente la imagen: por ejemplo, una reducción del tamaño de la imagen de todas las imágenes de la serie de tiempo para que cada embrión tenga un diámetro de 100 a 200 píxeles es preferente, ya que se tiende a reducir los problemas con la alineación y poner enfoque adecuado en la división celular en oposición al movimiento de los orgánulos. La graduación óptima puede depender de la calidad general de la serie de tiempos adquiridos. Es importante que esta escala se realice después de la eliminación de artefactos de posición fija y la

compensación del desplazamiento, etc.

5 En una realización preferente, la escala o la reducción mencionadas de la resolución se realiza mediante un método que pertenece al grupo: remuestreo, cálculo de promedios, suavizado, tiempo medio de funcionamiento, interpolación bicúbica, interpolación con segmentos b, y reducción sencilla de la matriz de la imagen u otros métodos evidentes para una persona experta en la materia.

10 Muchos sistemas de cámaras usan una función de ganancia automática que gradúa la intensidad de la imagen de forma dinámica entre los fotogramas. Preferentemente, esto se evita. Preferentemente, también se evita el cálculo de la diferencia imágenes restando imágenes consecutivas en un intervalo de tiempo y luego graduar estas imágenes de diferencia individualmente para usar todo el intervalo de intensidad de modo que la imagen de diferencia se evalúa más fácilmente con el ojo humano, un cálculo que usa normalmente programas de análisis de imagen. Esta graduación se debe desactivar en la configuración de las preferencias del programa de análisis de imágenes. Si esto no es posible, entonces el análisis cuantitativo debe usar varianza y desviación estándar que se ven menos afectadas por este artefacto. Una escala generalizada de todas las imágenes de diferencia calculada a partir de una serie de tiempo con el mismo factor no es un problema e incluso se puede recomendar para visualizar mejor las imágenes de diferencia. En casos raros con iluminación desigual entre imágenes consecutivas en los intervalos de tiempo, puede ser necesario reducir la intensidad de la imagen de fotogramas individuales antes del cálculo de las diferencias de intensidad. En estos casos, el análisis cuantitativo debería usar la varianza y la desviación estándar que se ven menos afectadas por artefactos de graduación de la intensidad.

Medio de cultivo

25 En una realización preferente, la adquisición de imágenes se realiza durante el cultivo de la población de células, tal como en el que la población de células se coloca en un medio de cultivo. Algunos medios para cultivo de la población de células se conocen en la técnica. Un ejemplo de cultivo de un embrión se describe en la solicitud de PCT N° WO 2004/056265.

Selección o identificación de embriones

30 La presente invención también proporciona un método para seleccionar un embrión para su trasplante, conservación congelado o eliminación. El método implica que el embrión se ha monitorizado con el método para determinar un cambio en el embrión tal como se ha descrito anteriormente con el fin de determinar cuándo se han producido divisiones celulares y opcionalmente si se ha producido muerte celular así como la calidad de las divisiones celulares y la calidad global del embrión. Es preferente seleccionar un embrión que tenga una división celular básicamente sincrónica que de lugar a extremos derivados definidos para las imágenes de diferencias, y es más precedente seleccionar un embrión que no tenga muerte celular.

40 El método de selección o identificación se puede combinar con otras medidas tal como se describe a continuación con el fin de evaluar la calidad del embrión. Los criterios importantes en una evaluación morfológica de los embriones son: (1) forma del embrión incluyendo el número de blastómeros y el grado de fragmentación; (2) presencia y calidad de una zona pelúcida; (3) tamaño; (4) color y textura; (5) conocimiento de la edad del embrión con respecto a su fase de desarrollo, e (6) integridad de la membrana del blastómero.

45 El trasplante, conservación congelado para embriones de alta calidad o eliminación para embriones de mala calidad se puede realizar a continuación mediante cualquier método adecuado conocido por la persona experta.

Determinación de la calidad

50 Las posiciones cambiantes de los límites de la célula (es decir, las membranas celulares) hace que todos los parámetros derivados anteriormente para la imagen de diferencia se eleve temporalmente, tales como un aumento en la intensidad absoluta media o varianza. Por lo tanto, se pueden detectar las divisiones celulares y su duración y la reorganización celular relacionada, tal como motilidad celular, por lo que se pueden detectar por el cambio temporal, un aumento o una disminución en la desviación estándar para todos los píxeles de la imagen de diferencia o cualquier otro de los parámetros derivados calculados a partir de la imagen de diferencia. En la solicitud de la presente invención para la evaluación de embriones, tales parámetros se consideran principalmente para reflejar la "actividad de blastómero". Esto se basa en la observación de que las posiciones de las células por lo general son relativamente estacionarias entre divisiones celulares, a excepción de un breve intervalo de tiempo alrededor de cada división celular, en el que la división de una célula en dos conduce a una breve pero considerable reorganización de las células en división, así como de las células circundantes.

65 Por consiguiente, la presente invención puede proporcionar una medida de la calidad del embrión que se basa en una o más determinaciones del embrión, tales como la determinación de la duración del al menos un periodo de división celular y/o determinar el movimiento celular durante el periodo entre divisiones y/o determinar la duración del periodo de tiempo de movimiento celular durante un periodo entre divisiones. Esta medida se puede usar para determinar si un embrión tiene calidad suficiente para trasplante o conservación congelado o está por debajo de la calidad, por lo que se elimina. En una realización precedente, el ovocito o embrión seleccionados para el trasplante o

la conservación congelado es el ovocito o embrión que tiene la medida más alta de la calidad del embrión y/o el ovocito o embrión mencionado seleccionado para la eliminación es el ovocito o embrión que tiene la medida más baja de la calidad del embrión.

5 De particular interés es el comienzo, la magnitud y la duración de las divisiones celulares que se pueden cuantificar como picos o valles, en valores de parámetros. Estos extremos, picos o valles, con frecuencia indican sucesos de división celular y el momento y la duración de estos sucesos se usan para caracterizar una población celular dada, tal como un embrión, y para evaluar su potencial de desarrollo. La forma de cada pico también proporciona información adicional como puede ser el tamaño del pico en general. Un pico también puede indicar un colapso brusco de un blastómero y muerte celular simultánea. Sin embargo, puede ser posible separar los sucesos de división celular y sucesos de muerte celular por la forma y el cambio del pico en valores de base antes y después del suceso.

10
15 Por lo tanto, la medida de la calidad del embrión comprende información del periodo de tiempo de la división celular para al menos una división celular, periodo de tiempo del periodo de tiempo entre divisiones, período de tiempo del movimiento celular en el periodo entre divisiones, y/o el grado de movimiento celular en el periodo entre divisiones. En una realización preferente, la medida de la calidad del embrión comprende información de dos o más de las determinaciones descritas en el presente documento. En una realización más preferente, la medida de la calidad del embrión comprende información de todas las determinaciones descritas en el presente documento.

20 La medida de la calidad del embrión se basa en las siguientes observaciones:

25 a) Las divisiones celulares bruscas en las que la división real del citoplasma avanza rápidamente y la consiguiente reorganización de las posiciones de los otros blastómeros se produce rápidamente (por ejemplo, picos de actividad de blastómeros intensos) son indicativas de un embrión de alta calidad. La duración prolongada de la división citoplasmática y la reorganización espacial extensa de los otros blastómeros a continuación indican un embrión de mala calidad (por ejemplo, picos de actividad de blastómeros anchos). (Ejemplo 3a)

30 b) La reorganización muy pequeña de la posición de blastómeros entre divisiones celulares indica un embrión de alta calidad mientras que el movimiento entre divisiones celulares visibles a menudo indica un embrión de mala calidad. (Ejemplo 3a)

35 c) La reorganización prolongada de la posición celular entre la división celular (por ejemplo, picos de actividad de blastómeros anchos) a menudo se asocia con una mala calidad del embrión, división celular asincrónica y fragmentación extensa. (Ejemplo 3a)

40 d) Se observa un periodo de muy poco movimiento celular para la mayoría de los mamíferos cuando se activa el genoma embrionario y la síntesis de proteínas cambia de transcritos maternos a embrionarios. Si este periodo tiene: i) comienzo temprano, ii) actividad muy baja (= poco movimiento celular = reposo) y iii) terminación temprana, entonces es una fuerte indicación de un embrión de alta calidad. El comienzo del periodo de reposo a menudo se retrasa, y a veces el periodo se ve interrumpido por el movimiento celular en embriones de mala calidad. (Ejemplo 3b). En este contexto, por temprano se entiende preferentemente antes de 30 horas después de la fertilización, más preferentemente antes de 27 horas después de la fertilización, lo más preferentemente antes de 25 horas después de la fertilización.

45 e) En embriones de mala calidad que posteriormente cesan su desarrollo en particular y a menudo se observan regiones persistentemente inmóviles que persisten y en última instancia conducen a la para la del desarrollo. Tales regiones inmóviles se pueden asociar con una fragmentación extensa o muerte y lisis de blastómeros. Si estas regiones son más grandes que un porcentaje dado en una fase del desarrollo dada, entonces el embrión tiene muy baja probabilidad de sobrevivir. En un caso, este porcentaje podría ser de al menos un 15 %, en otro caso de al menos un 35 %, en los que se espera que estos porcentajes sean específicos de la especie. En embriones de alta calidad, la motilidad celular que sigue brevemente después de cada suceso de división citoplasmática se distribuye inicialmente sobre toda la superficie del embrión (es decir, todos los blastómeros se mueven ligeramente), solamente después de la compactación en la fase de mórula se observa movimiento localizado (Ejemplo 3c).

50 f) La cantidad of movimiento celular en diferentes intervalos de tiempo es un buen indicador de la calidad del embrión, en el que se espera que los intervalos de tiempo adecuado sean específicos de la especie. Un parámetro relacionado con la calidad se debe calcular a partir de una relación de movimiento medio en segmentos temporales diferentes y/o una proporción de desviaciones estándar en segmentos temporales diferentes. Se pueden establecer procedimientos de selección de embriones basándose en el valor de estos parámetros. (Ejemplo 3d).

55 g) Un comienzo muy temprano de la primera división celular es una indicación de una alta calidad del embrión. El comienzo muy tardío de la primera (y divisiones celulares posteriores) indica embriones de mala calidad. Sin embargo, para la mayoría de los embriones, el comienzo exacto de la primera división celular solo no

proporciona una indicación clara de la calidad del embrión (Ejemplo 3d)

h) La división celular sincronizada en las fases posteriores (por ejemplo, 2→4, 4→8) se encuentra principalmente en embriones de alta calidad mientras que la división celular asincrónica a menudo se observa para embriones de mala calidad (por ejemplo, 2→3→4→5→6→7→8) (Ejemplo 3a)

Las siguientes determinaciones conducen a la medida de la calidad del embrión más elevada:

- Periodos de división celular cortos, en los que corto se define como inferior a 1 hora.
- Poco movimiento celular en los periodos entre divisiones, en el que poco se define como prácticamente sin cambios en la posición celular más allá de las oscilaciones habituales y los movimientos de orgánulos que siempre contribuyen a la imagen de diferencia. Poco movimiento celular implica que el centro de gravedad celular es estacionario (movimiento < 3µm) y las membranas citoplasmáticas están en gran parte inmóviles (< 3 µm).
- Comienzo temprano del primer periodo de división celular, es decir, antes de 25 horas después de la fertilización para embriones humanos (antes de 30 horas después de la fertilización para embriones bovinos).
- Periodos breves de movimientos celulares en periodos entre divisiones, en los que corto se define como inferior a 3 horas.
- Distribución uniforme del movimiento celular dentro del embrión en el tiempo, es decir, ausencia de áreas/zonas/volumenes inactivos del embrión en los que no se observa movimiento celular durante un periodo de tiempo más largo (es decir, > 24 horas). Tales zonas inmóviles se podrían deber a blastómeros y fragmentos muertos o en proceso de muerte, que pueden impedir el desarrollo adicional.

Se puede usar una red neuronal u otros algoritmos de reconocimiento de patrones cuantitativos para evaluar los patrones complejos de motilidad celular que se han descrito anteriormente. Una red de este tipo se puede usar para encontrar los embriones de mejor calidad para su transferencia en tratamientos de IVF.

Otras medidas

Una etapa de análisis final cuando se determina la calidad de un embrión podría incluir una comparación de las observaciones realizadas con observaciones similares de embriones de diferente calidad y capacidad de desarrollo, así como la comparación de valores de parámetros para un embrión dado con otras medidas cuantitativas realizadas en el mismo embrión. Esto puede incluir una comparación con medidas en línea tales como motilidad de blastómeros, tasa respiratoria, captación de aminoácidos, etc. Es probable que un conjunto de datos combinados del análisis de la motilidad de blastómeros, tasas respiratorias y otros parámetros cuantitativos mejore la selección del embrión y permita de manera fiable a los embriólogos elijan los mejores embriones para su transferencia.

Por lo tanto, en una realización el método de acuerdo con la invención se puede combinar con otras medidas con el fin de evaluar el embrión en cuestión, y se puede usar para la selección de embriones competentes para su transferencia al receptor.

Otras mediciones de este tipo se pueden seleccionar a partir del grupo de tasa respiratoria, captación de aminoácidos, análisis de motilidad, motilidad de blastómeros, morfología, tamaño de blastómeros, granulación de blastómeros, fragmentación, color de blastómeros, orientación de cuerpos polares, nucleación, formación e integridad del huso y otras numerosas medidas cualitativas. La medición de la respiración se puede realizar tal como se describe en la solicitud de PCT N° WO 2004/056265.

Soporte de datos

La invención también se refiere a un soporte de datos que comprende un programa informático que se puede cargar directamente en la memoria de un dispositivo de procesamiento digital y que comprende partes de códigos informáticos que constituyen medios para ejecutar el método de la invención tal como se ha descrito anteriormente.

El soporte de datos puede ser un disco óptico o magnético o estar en forma de una tarjeta electrónica del tipo EEPROM o Flash, y se puede diseñar para su carga en medios de procesamiento digital existentes.

Ejemplo 1

Programa básico implementado en ImageJ.

El algoritmo básico que se ha expuesto anteriormente se ha implementado en el programa de imagen ImageJ usando la macro de lenguaje de este programa. ImageJ es un programa gratuito de dominio público desarrollado por Wayne Rasband del Instituto Nacional de Salud, MD, USA. Se puede obtener libremente de la página web: <http://rsb.info.nih.gov/ij/>.

La Fig. 2 es un ejemplo de la salida gráfica del programa durante los cálculos, es decir como un listado del código fuente de la macro de ImageJ usado para analizar estas imágenes de acuerdo con el algoritmo inventado.

```

macro "1-Open image series" {

    // Check conditions
    requires("1.33r");

    // Open image and make selection
    run("Image Sequence...");
    makeRectangle(100, 100, 150, 150);

    //print experiment parameters to log
    print("-----");
    print(" Experiment parameters");
    print("-----");
    print('');
    print('nImages: '+nImages);
    print('nSlices: '+nSlices);
}

//-----

macro "2-Crop" {

    // Check conditions
    requires("1.33r");
    if (nSlices==1)
        exit("Stack required");
    if (selectionType==1)
        exit("Make selection first");

    doCommand('Crop');
}

//-----

macro "3-Difference stack" {

    // Check conditions
    requires("1.33r");
    saveSettings();
    if (nSlices==1)
        exit("Stack required");

    //start settings
    run("Conversions...", ' ');

    //make difference stack
    run("Duplicate...", "title=Stack-copy duplicate");
    run("Delete Slice");
    setSlice(nSlices);
    run("Add Slice");
    setSlice(1);
}

```



```

run("Image Calculator...", "image1=Stack operations=Subtract image2=Stack-copy create stack");
selectWindow("Stack-copy");
run("Close");

//make oval selection
selectWindow("Result");
setTool(1);
makeOval(30, 30, 90, 90);

//clean up
restoreSettings();
}

//-----

macro "4-Measure movement and annotate" (

// Check conditions
requires("1.33v");
saveSettings();
if (nSlices==1)
    exit("Stack required");
if (selectionType==1)
    exit("Make selection first");

//print experiment parameters to log
starttime=getNumber("Start time? (hrs)",24);
print("");
print("Start time " + starttime + " hrs");
interval=getNumber("Interval? (hrs)",2);
print("");
print("Interval " + interval + " hrs");
gray=getNumber("Gray? [Black=0, white=255]",255);

//start settings
setColor(gray, gray, gray);
setFont("SansSerif", 12);
run("Set Measurements...", "mean standard modal min redirect=None decimal=3");
run("Clear Results");

//measure
for (i=1; i<=nSlices; i++){
    setSlice(i);
    run("Measure");
    integer=floor(starttime +(i-1)*interval+0.01);
    decimal=round(10*(starttime + (i-1)*interval))-integer*10;
    setJustification("left");
    drawString("Time ",10,20);
    setJustification("right");
    drawString(integer + "." + decimal + " hr",90,20);}
for (i=0; i<=nSlices-1; i++){

```

ES 2 549 205 T3

```

        setResult("Time",i,starttime + i*interval);}
updateResults();

//Find variables to plot
xValues=newArray(nSlices);
yValues=newArray(nSlices);
zValues=newArray(nSlices);
for (i=0; i<nSlices; i++){
    xValues[i] = getResult("Time",i);
    yValues[i] = getResult("Mean",i);
    zValues[i] = getResult("StdDev",i);}

//Generate Plot
Plot.create("Movement", "Time", "Mean");
Plot.setLimits(starttime, xValues[nSlices-1], 0, 25);
Plot.setLineWidth(1);
Plot.setColor("red");
Plot.add("line", xValues, yValues);
Plot.add("circles", xValues, yValues);
Plot.setColor("green");
Plot.add("line", xValues, zValues);
Plot.add("circles", xValues, zValues);
Plot.show();

//save results
selectWindow("Results");
run("Text..."); // File>Save As>Text

//clean up
restoreSettings();
}

//-----
macro "-" {}

// macro "Sample Tool - C0a0L18f8L818f" {
//     getCursorLoc(x, y, z, flags);
//     print("Sample: "+x+" "+y);
// }

//-----

macro "Annotate" {

// Check conditions
requires("1.33r");
saveSettings();
if (nSlices==1)

    exit("Stack required");
}

```

```

//print experiment parameters to log
starttime=getNumber("Start time? (hrs)",24);
print("");
print("Start time " + starttime + " hrs");
interval=getNumber("Interval? (hrs)",2);
print("");
print("Interval " + interval + "hrs");
gray=getNumber("Gray? [Black=0, white=255]",255);

//start annotation
setColor(gray, gray, gray);
setFont("SansSerif", 12);

for (i=1; i<=nSlices; i++){
    setSlice(i);
    integer=floor(starttime + i*interval+0.01);
    decimal=round(10*(starttime + i*interval))-integer*10;
    setJustification("left");
    drawString("Time ",10,20);
    setJustification("right");
    drawString(integer + "." + decimal + " hr",90,20);}

//clean up
restoreSettings();
}

```

- 5 *Materiales y métodos.* Los complejos de cúmulo-ovocito (COC) inmaduros de bovino se aspiraron de ovarios obtenidos en matadero, se seleccionaron y se hicieron madurar durante 24 h en placas de cuatro pocillos (Nunc, Roskilde, Dinamarca). Cada pocillo contenía 400 µl de medio de TCM-199 tamponado con bicarbonato (Gibco BRL, Paisley, UK) complementado con suero de ganado al 15 % (CS; Danish Veterinary Institute, Frederiksberg, Dinamarca), 10 UI/ml de eCG y 5 UI/ml de hCG (Suigonan Vet; Intervet Scandinavia, Skovlunde, Dinamarca). Los embriones se hicieron madurar en aceite mineral a 38,5 °C en un 5 % de CO₂ en aire humidificado. La fertilización se realizó en medio de Tyrode modificado usando espermatozoides seleccionados con Percoll, congelados-descongelados. Después de 22 h, se eliminaron las células del cúmulo mediante agitación vorticial y se transfirieron presuntos cigotos a 400 µl de medio de cultivo, compuesto por medio de fluido de oviducto sintético con aminoácidos, citrato e inositol (SOFaaci) complementado con antibióticos (sulfato de gentamicina, 10 mg/ml) y CS al 10 5 % y se incubaron a 38,5 °C en una atmósfera de un 5 % de CO₂, un 5 % de O₂, un 90 % de N₂ con humedad máxima.
- 15 El sistema de incubadora se ha descrito en detalle anteriormente y se ha demostrado que es adecuado para el cultivo de embriones *in vitro* (Holm *et al.* 1998). En resumen, la placa de cultivo de 4 pocillos se colocó en la platina del microscopio (platina de barrido MultiControl 2000, Märzhäuser, Alemania) de un microscopio TMD de Nikon invertido (Diaphot, DFA A/S, Copenhague, Dinamarca). Se acopló una caja incubadora de plexiglás de color negro regulada mediante un controlador de la temperatura del aire (Air-Therm™, World Precision Instruments, Aston, UK) 20 alrededor de la platina. Se colocó una cubierta de plástico con la parte inferior abierta sobre la placa de cultivo y la mezcla de gases humidificada se condujo hacia el interior de esta cámara de cultivo semicerrada después de haber pasado a través de un frasco de lavado de gases colocado dentro de la caja incubadora.
- 25 Se ha demostrado previamente que esta caja de cultivo es útil para el cultivo de embriones *in vitro* (Holmet *et al.* 1998, 2003), proporcionando condiciones de humedad y de temperatura estables. La producción de embriones *in vitro* rutinaria semanal durante el experimento sirvió como control para determinar la integridad del sistema de cultivo básico.
- 30 Sistema de cámara. La grabación a intervalos de tiempo estaba dirigida mediante un software de análisis de imágenes (ImagePro™, Unit One, Birkerød, Dinamarca), que controlaba tanto los movimientos de la platina de barrido en los ejes x, y, y z, el funcionamiento de la cámara de vídeo altamente sensible a la luz conectada (WAT-902H, Watec, DFA A/S, Copenhague, Dinamarca), así como el registro y almacenamiento de secuencias a intervalos de tiempo en el disco duro del ordenador.

Se registraron secuencialmente imágenes de cada embrión (aumento total: x 265) con luz mínima a intervalos de 20 min. durante el periodo de cultivo. Entre los registros, los embriones se movieron fuera del campo de luz.

5 El tiempo de la primera aparición de las siguientes fases de escisión/embrionaria se registró para los cigotos en focos con blastómeros identificables: fases de 2 y 3-4 -células, y para mórulas y blastocitos con una masa celular coherente visible: mórula compacta máxima, primera expansión del blastocito y colapsos de los blastocitos.

Las Figs. 3-5 muestran series de datos de imágenes y resultados de análisis como perfil de actividad.

10

Ejemplo 2

Ejemplo teórico para cuantificar la división celular en células madre que crecen en monocapa de células alimentadoras

15

La presente invención también se puede usar para detectar y cuantificar el número de divisiones por área por unidad de tiempo en una capa de células confluentes (o divisiones celulares entre células madre que crecen por encima de una capa confluyente de células alimentadoras). La presente invención es particularmente útil cuando una mala definición de los límites celulares hace que sea inviable detectar, demarcar y hacer el recuento de células individuales. Sin embargo, como la división celular se asociará con el movimiento, el análisis del movimiento de la presente invención probablemente reflejará la división celular inducida por la motilidad, siempre que las otras células permanezcan estacionarias. Por lo tanto, el análisis de la división celular en los casos en los que las células individuales no se pueden discernir se puede conseguir mediante el método que se describe en la presente invención. El método funciona muy bien si las divisiones celulares son sucesos raros y por lo tanto rara vez se coproducen en diferentes partes de la imagen. En este caso, los picos aislados en los parámetros derivados de toda la imagen se asociarán con la división celular. Sin embargo, en muchos casos, las divisiones celulares se producirán con mayor frecuencia y siempre se producirá un cierto movimiento en diferentes partes de la imagen. Una solución sencilla es subdividir la imagen a continuación en partes más pequeñas (por ejemplo, 2 x 2, 3 x 3 o 4 x 4, etc.) de modo que la división celular se produce de forma relativamente poco frecuente en cada parte. La presente invención se usa para analizar la serie temporal para cada parte por separado, y a continuación para sumar los resultados para toda la imagen.

20

25

30

Un ejemplo teórico que usa datos hipotéticos que ilustran el principio se muestra en la Fig. 6. En este ejemplo imaginario, se adquieren imágenes de un cultivo de células confluentes cada 20 minutos durante 60 horas. La serie de imágenes a intervalos de tiempo se analiza mediante el cálculo de las imágenes de diferencia y el cálculo de la varianza de cada imagen de diferencia. Sin embargo, debido al número relativamente elevado de divisiones celulares en el área investigada (es decir, 9) la varianza de la imagen completa (símbolos abiertos en el gráfico superior) no se puede interpretar fácilmente. Sin embargo, si la imagen se subdivide en cuatro cuartiles, y cada cuartil se analiza por separado a continuación, cada cuartil tiene de una a tres divisiones celulares en el intervalo de tiempo analizado, las cuales están claramente definidas en el respectivo gráfico de varianza (figuras inferiores, símbolos rellenos). El recuento de los picos claramente definidos en cada cuartil da el número total de divisiones celulares para todo el área, es decir 9 divisiones en 60 horas.

35

40

El presente ejemplo hipotético ilustra una situación ideal en la que la división celular no se produjo a lo largo de los límites de dos compartimentos, y no era el doble recuento de un solo suceso de división. Sin embargo, las divisiones celulares en los límites también se pueden omitir si el pico resultante en ambos cuartiles vecinos están por debajo del umbral. Por lo tanto, no queda claro si los efectos de borde darán lugar a una sobreestimación o una subestimación de los valores reales y representarán claramente una aproximación muy útil.

45

50

Ejemplo 3

Determinación de la calidad de una población de células: Evaluación de la calidad del embrión

Se ha encontrado que la determinación de los embriones óptimos a implantar después de fertilización *in vitro* (IVF) es posible basándose en el tiempo, duración y alcance de las divisiones celulares observadas y movimiento celular asociado.

55

Por consiguiente, un primer objetivo es determinar la calidad del embrión realizando un método que comprende controlar el embrión durante un periodo de tiempo usando el método que sea descrita anteriormente para determinar el cambio en una población de células, teniendo dicho periodo de tiempo una duración suficiente para comprender al menos un periodo de división celular y al menos una parte de un periodo entre divisiones, y determinar la duración del al menos un periodo de división celular y/o determinar el movimiento celular durante el periodo entre divisiones y/o determinar la duración del periodo de tiempo del movimiento celular para un periodo entre divisiones obteniendo de este modo una medida de la calidad del embrión.

60

65

La medida de la calidad del embrión obtenida se puede usar a continuación para identificar y seleccionar embriones adecuados para trasplante en el útero de una hembra para proporcionar un embarazo y una cría nacida viva.

Por lo tanto, un segundo objetivo es permitir la selección informada de un embrión adecuado para trasplante mediante la realización de un método que comprende el control del embrión como se ha definido anteriormente obteniendo una medida de la calidad del embrión, y seleccionando el embrión que tiene la medida de la calidad del embrión más elevada.

Ejemplo 3a

Experimentos, observación, análisis y discusión

Materiales y métodos. Los complejos de cúmulo-ovocito (COC) inmaduros de bovino se aspiraron de ovarios obtenidos en matadero, se seleccionaron y se hicieron madurar durante 24 h en placas de cuatro pocillos (Nunc, Roskilde, Dinamarca). Cada pocillo contenía 400 μ l de medio de TCM-199 tamponado con bicarbonato (Gibco BRL, Paisley, UK) complementado con suero de ganado al 15 % (CS; Danish Veterinary Institute, Frederiksberg, Dinamarca), 10 UI/ml de eCG y 5 UI/ml de hCG (Suigonan Vet; Intervet Scandinavia, Skovlunde, Dinamarca). Los embriones se hicieron madurar en aceite mineral a 38,5 °C en un 5 % de CO₂ en aire humidificado. La fertilización se realizó en medio de Tyrode modificado usando espermatozoides seleccionados con Percoll, congelados-descongelados. Después de 22 h, las células del cúmulo se eliminaron mediante agitación vorticial y se transfirieron presuntos cigotos a 400 μ l de medio de cultivo, compuesto por medio de fluido de oviducto sintético con aminoácidos, citrato e inositol (SOFaaci) complementado con antibióticos (sulfato de gentamicina, 10 mg/ml) y CS al 5% y se incubaron a 38,5 °C en una atmósfera de un 5 % de CO₂, un 5 % de O₂, un 90 % de N₂ con humedad máxima.

El sistema de incubadora se ha descrito en detalle anteriormente y se ha demostrado que es adecuado para el cultivo de embriones *in vitro* (Holm *et al.* 1998). En resumen, la placa de cultivo de 4 pocillos se colocó en la platina del microscopio (platina de barrido MultiControl 2000, Märzhäuser, Alemania) de un microscopio TMD de Nikon invertido (Diaphot, DFA A/S, Copenhague, Dinamarca). Se acopló una caja incubadora de plexiglás de color negro regulada mediante un controlador de la temperatura del aire (Air-Therm™, World Precision Instruments, Aston, UK) alrededor de la platina. Se colocó una cubierta de plástico con la parte inferior abierta sobre la placa de cultivo y la mezcla de gases humidificada se condujo hacia el interior de esta cámara de cultivo semicerrada después de haber pasado a través de un frasco de lavado de gases colocado dentro de la caja incubadora.

Se ha demostrado previamente que esta caja de cultivo es útil para el cultivo de embriones *in vitro* (Holmet *et al.* 1998, 2003), proporcionando condiciones de humedad y de temperatura estables. La producción de embriones *in vitro* rutinaria semanal durante el experimento sirvió como control para determinar la integridad del sistema de cultivo básico.

Sistema de cámara. La grabación a intervalos de tiempo estaba dirigida mediante un software de análisis de imágenes (ImagePro™, Unit One, Birkerød, Dinamarca), que controlaba tanto los movimientos de la platina de barrido en los ejes x, y, y z, el funcionamiento de la cámara de vídeo altamente sensible a la luz conectada (WAT-902H, Watec, DFA A/S, Copenhague, Dinamarca), así como el registro y almacenamiento de secuencias a intervalos de tiempo en el disco duro del ordenador. Se registraron secuencialmente imágenes de cada embrión (aumento total: x 265) con luz mínima a intervalos de 30 min. durante el periodo de cultivo. Entre los registros, los embriones se movieron fuera del campo de luz.

El análisis manual de la serie de imágenes a intervalos de tiempo consistió en registrar el tiempo de la primera aparición de las siguientes fases de escisión/embrión: 2 células, 4 células, 8 células, 16 células y para mórulas y blastocitos con una masa celular coherente visible: mórula compacta de máximo, primera expansión del blastocito, colapsos de blastocitos y eclosión del blastocito.

El análisis informático automatizado consistió en calcular la desviación estándar de la imagen de diferencias que se calcula como la diferencia entre dos fotogramas consecutivos. Para evitar artefactos de alineación y otros problemas, se usó el siguiente procedimiento elaborado:

1) *Adquisición de imágenes.* (Véase la descripción anterior).

2) *Eliminar artefactos de posición fijados (Polvo de la cámara)* restando una imagen de referencia desenfocada de los artefactos de cada fotografía en la serie.

3) *Desplazamiento para compensar el movimiento impreciso de la platina.* Una manera muy sencilla de alinear fotografías es comparar la imagen de diferencia original con una imagen de diferencia calculada después de desplazar un único píxel de las imágenes originales en una dirección dada. Si la varianza de la imagen de diferencia calculada después del desplazamiento es inferior a la varianza de la imagen de diferencia de las imágenes originales entonces el desplazamiento producía una mejora de la alineación. Probando sistemáticamente todas las direcciones de desplazamiento posibles y todas las magnitudes de desplazamiento relevantes, es posible obtener una serie temporal alineada. Sin embargo, en el presente caso, los inventores usaron una macro de ImageJ avanzada para la alineación de imágenes desarrollada por Thévenazet *et al.* 1998.

4) *Identificar la región de interés (ROI) y el área de referencia externa.* Es ventajoso comparar el movimiento celular dentro del embrión con respecto al "movimiento" fuera del embrión debido a problemas de alineación del

movimiento Browniano, etc. Esto se consigue definiendo el embrión y comparando las imágenes de diferencias dentro del embrión con las diferencias calculadas en un área similar fuera del embrión. La definición del embrión se realizó de forma manual. Como área de referencia, los inventores eligieron una región de la imagen sin ningún embrión.

5) *Calcular la diferencia de intensidad.*

6) *Calcular un parámetro derivado para cada imagen de diferencia.* Se calcularon varios parámetros de diferencia pero el único que demostró que era el más informativo fue la desviación estándar de la intensidad para todos los píxeles en la imagen de diferencia. Este parámetro se denomina "actividad de blastómeros" en lo sucesivo, así como en los siguientes ejemplos.

7) *Identificar y determinar la forma de los picos en la actividad de blastómeros.*

8) *Calcular la desviación estándar y los valores promedio para la actividad de blastómeros para intervalos de tiempo relevantes para el diagnóstico.* Véase el ejemplo 3d.

Diseño experimental. Se incubaron aproximadamente 20 embriones bovinos en conjunto en un solo pocillo de una placa Nunc de 4 pocillos durante 7 días con adquisición de imágenes cada 30 min. Este experimento se repitió 5 veces en total proporcionando una serie de imágenes de intervalos de tiempo de 99 embriones bovinos.

Resultados:

Basándose en la evaluación cualitativa de series de imágenes de intervalos de tiempo de embriones en desarrollo, (básicamente viendo su actuación como películas numerosas veces y conservando los cambios), se observó que: Un indicador de embriones de alta calidad son las divisiones celulares repentinas cuando la división real del citoplasma evoluciona rápidamente y la consiguiente reorganización de las posiciones de los otros blastómeros se produce rápidamente seguido de un periodo de "reposo" con muy poca reorganización de la posición celular hasta un comienzo repentino de la siguiente división citoplasmática. Los embriones de escasa calidad a menudo muestran reorganizaciones prolongadas de la posición de blastómeros después de las divisiones citoplasmáticas y entre divisiones celulares citoplasmáticas. Para cuantificar y documentar estas observaciones los inventores calculan la actividad de blastómeros a partir de una serie de imágenes de intervalos de tiempo.

Las actividades de blastómero representativas se muestran en la Figura 7 para un embrión "bueno" y uno "malo", respectivamente. El embrión considerado "Bueno" se desarrolló a un blastocito en eclosión, mientras que el embrión considerado "Malo" nunca se desarrolló a un blastocito.

Una cierta cantidad de la actividad observada se debe a división celular asincrónica (por ejemplo, 2→3→4→5→6→7→8) y fragmentación en lugar de a divisiones celulares sincrónicas (por ejemplo, 2→4, 4→8) observadas para embriones de alta calidad. En la Figura 8, la actividad de blastómeros de 41 embriones se presenta como una a pseudoimagen de gel en la que los picos de motilidad se indican con bandas oscuras y la inactividad es de color blanco, y cada calle corresponde a un solo embrión. El patrón de formación de bandas oscuras o manchas refleja periodos de motilidad celular dentro del embrión. Los embriones "buenos" que se desarrollaron hasta blastocitos se presentan por encima de los embriones "malos" que no se desarrollaron a la etapa de blastocito. Para los embriones buenos se observan bandas iniciales más intensas (normalmente tres).

Ejemplo 3b

Experimentos, observación, análisis y discusión

Materiales y métodos. Igual que para el Ejemplo 3a

Resultados

La síntesis de proteínas inicial en embriones de mamíferos usan ARNm materno del ovocito, pero después de unas cuantas divisiones celulares, el genoma embrionario se activa, se transcribe y se traduce. El cambio del genoma materno al genoma embrionario es una etapa fundamental en el desarrollo embrionario. El periodo se produce en la fase de 8 células para bovinos y tiene una duración relativamente larga para embriones humanos, el cambio se produce antes de la fase de 4 a 8 células y tiene una duración más corta.

Un periodo de reposo de muy poco movimiento celular se observa para la mayoría de los mamíferos cuando el genoma embrionario se activa y la síntesis de proteínas cambia de genes maternos embrionarios. Este periodo tiene: i) Inicio temprano, ii) actividad muy baja (= poco movimiento celular = reposo) y iii) terminación temprana entonces es una indicación fuerte de un embrión de alta calidad. El periodo de reposo a menudo se retrasa, en ocasiones se ve interrumpido por el movimiento celular en embriones de escasa calidad. Un ejemplo de esta muestra de actividad de blastómeros, definida en el ejemplo 3a, para 13 embriones diferentes se muestra en la Figura 9. El patrón de formación de bandas oscuras o manchas refleja periodos de motilidad celular dentro del embrión. Los embriones "buenos" que se desarrollan hasta blastocitos se presentan por encima de los embriones "malos" que no se desarrollaron a la fase de blastocito. Para los embriones buenos se observan las bandas iniciales intensas (normalmente tres).

Ejemplo 3c

Experimentos, observación, análisis y discusión

5 *Materiales y métodos.* Igual que para el Ejemplo 3a

Resultados

10 En los embriones de escasa calidad que posteriormente expresan su desarrollo particular y a menudo se observa que hay regiones persistentemente inmóviles que persisten y por último conducen a la parada del desarrollo. Tales regiones inmóviles se pueden asociar con una intensa fragmentación o muerte y lisis de blastómeros. Si estas regiones son más grandes que un porcentaje dado en una fase dada del desarrollo entonces el embrión tiene una probabilidad de sobrevivir baja. En los embriones de alta calidad la motilidad celular que se deriva brevemente después de cada suceso de división citoplasmática se distribuye inicialmente sobre toda la superficie del embrión (es decir todos los blastómeros se mueven ligeramente), solamente se localiza el movimiento observado después de la compactación en la fase de mórula.

20 Los embriones que se desarrollan hasta blastocitos tal como en el panel izquierdo en la Figura 10 tienen una actividad de blastómeros distribuida de forma uniforme (definido en el ejemplo 3a). Los embriones que no tienen una actividad de blastómeros distribuida de forma uniforme tal como en el panel derecho en la Figura 10 nunca se desarrollan en un blastocito.

Ejemplo 3d

25 *Experimentos, observación, análisis y discusión*

Materiales y métodos. Igual que para el Ejemplo 3a

Resultados

30 La cantidad de movimiento celular en diferentes intervalos de tiempo es un buen indicador de la calidad del embrión. Un parámetro relacionado con la calidad se puede calcular a partir de una proporción del movimiento medio en segmentos temporales diferentes y/o una proporción de desviaciones estándar en segmentos temporales diferentes. Se pueden establecer procedimientos de selección de embriones basándose en el valor de estos parámetros.

35 Algunos ejemplos de diferentes segmentos (= partes) se encuentran en la Figura 11 y 12. En este caso, la parte 1 es el mismo segmento de tiempo de 32 a 60 horas después de la fertilización, la parte 2 es de 60 a 75 horas después de la fertilización, la parte 3 es de 75 a 96 horas después de la fertilización.

40 Basándose en la actividad media de blastómero y/o la desviación estándar de la actividad de blastómeros (definido en el ejemplo 3a) en las diferentes partes es posible clasificar los embriones.

En el presente caso, los inventores han usado los siguientes criterios de selección basándose en:

- 45 • R1 = relación entre la actividad media de blastocito en la parte 1 y en la parte 3 del patrón de actividad de blastocito para un embrión dado
- R2 = relación entre la desviación estándar de la actividad de blastocito en la parte 2 y en la parte 3 del patrón de actividad de blastocito para un embrión dado

Los cálculos se muestran en la Figura 13.

50 Si ($R1 < 1,15$ y $R2 < 0,50$) entonces es un embrión "bueno" ELSE es un embrión "malo". Usando estos criterios los 36 de 39 embriones se clasificaron correctamente de acuerdo con el modo en el que se desarrollaron posteriormente.

55 Ejemplo 3e

Experimentos, observación, análisis y discusión

Materiales y métodos. Igual que para el Ejemplo 3a

60

Resultados

La Figura 14 muestra la correspondencia excelente entre la determinación automática y manual del comienzo de la división celular.

65

Un comienzo muy temprano de la primera división celular es una indicación de un embrión de alta calidad. Un comienzo muy tardío de la primera (y posteriores divisiones celulares) indica embriones de mala calidad. Sin

embargo, para la mayoría de los embriones, el comienzo exacto de la primera división celular sola no proporciona una indicación clara de la calidad del embrión tal como se muestra en la Figura 15.

5 Aunque el comienzo medio de las divisiones celulares se retrasó para los embriones malos, la gran desviación estándar inherente hace que los valores absolutos sean un mal criterio de selección excepto en casos extremos. (por ejemplo, la primera división antes de 30 horas significa un buen embrión. La primera división después de 35 horas significa un mal embrión pero la gran mayoría de los embriones bovinos investigados tienen tiempos de división intermedios que no se interpretan fácilmente.

10 Bibliografía

Artículos

15 Beliën JAM, Baak JPA, Van Diest PJ y Van Ginkel AHM (1997) Counting mitoses by image processing in feulgen stained breast cancer sections: The influence of resolution. *Cytometry* 28: 135-140

20 Bhattacharya S y Templeton A (2004). What is the most relevant standard of success in assisted reproduction? Redefining success in the context of elective single embryo transfers evidence, intuition and financial reality. *Reproducción humana* página 1 - 4

Bos-Mikich A, Mattos ALG y Ferrari AN (2001) Early cleavage of human embryos: an effective method for predicting successful IVF/ICSI outcome. *Hum Reprod* 16,2658-2661.

25 Curl CL, Harris T, Harris PJ, Allman BE, Bellair CJ, Stewart AG y Delbridge LMD (2004) Quantitative phase microscopy: a new tool for measurement of cell culture growth and confluency *in situ*. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 448: 462-468

Eccles BA y Klevecz RR (1986) Automatic digital image analysis for identification of mitotic cells in synchronous mammalian cell cultures. *Pubmed, anal quant cytol-histol* 8: 138-47

30 Fenwick J, Platteau P, Mucdoch AP y Herbert M (2002) Time from insemination to first cleavage predicts developmental competence of human preimplantation embryos *in vitro*. *Hum reprod* 17, 407-412

35 Grisart B, Massip a y Dessy F (1994) Cinematographic analysis of bovine embryo development in serum-free oviduct-conditioned medium. *Pubmed, J. Reprod fertile* 101 (2): 257-64

Haney S.M, Thompson PM, Cloughesy TF, Alger JR y Toga AW (2001) Tracking tumor growth rates in Patients with Malignant gliomas: A test of two algorithms. *AJNR An J Neuroradiol* 22: 73-82

40 Christina Hnida (2004) Computer-assisted, multilevel, morphometric analysis of bio-markers of embryonic quality. tesis PhD, Universidad de Copenhagen

45 Holm P, Booth PJ y Callesen H (2002) Kinetics of early in vitro development of bovine in vivo-and in vitro-derived zygotes produced and/or cultured in chemically defined or serum-containing media. *Reproduction* 123: 553-565

Holm P, Booth PJ y Callesen H (2003) Developmental kinetics of bovine nuclear transfer and parthenogenetic embryos. *Cloning and stem cell Vol 5 número 2*

50 Holm P, Shukri NN, Vajta G, Booth P, Bendixen C y Callesen H (1998) Developmental kinetics of the first cell cycles of bovine in vitro produced embryos in relation to their *in vitro* viability and sex *Theriogenology* 50: 1285-1299

55 Lundin K, Bergh C y Harderson T (2001) Early embryo cleavage is a strong indicator of embryo quality in human IVF. *Hum Reprod* 16, 2652-2657

Majerus V, Lequarre AS, Ferguson EM, Kaidi S, Massip A, Dessy F y Donnay I (2000) Characterization of embryos derived from calf oocytes: Kinetics of cleavage, cell allocation to Inner cell mass, and trophectoderm and lipid metabolism. *Molecular reproduction and development* 57: 346-352

60 Motosugi N, Bauer T, Polanski Zbigniew, Solter D y Hiiragi T (2005) Polarity of the mouse embryo is established at blastocyst and is not prepatterned. *Genes & development* 19: 1081-1092

Oberholzer M, Ostreicher M, Christen H y Bruhlmann M (1996) Methods in quantitative image analysis. *Pubmed, histochem cell boil* 105: 333-55

65 Petersen CG, Mauri AL, Ferreira R, Baruffi RLR y Franco Jr JG (2001). Embryo selection by the first cleavage parameter between 25 and 27 hours after ICSI. *J Assist Reprod Genet* 18, 209-212

Sakkas D, Percival G, D'arcy Y, Sharif K y Afnan M (2001) Assessment of early cleaving in vitro fertilized human embryos at the 2-cell stage before transfer improves embryo selection. *Fertil Steril* 76, 1150-1156

5 Sakkas D, Shoukir Y, Chardonens D, Bianchi PG y Campana A (1998) Early cleavage of human embryos to the two-cell stage after intracytoplasmic sperm injection as an indicator of embryo viability. *Hum Reprod* 13,182-187

Salumets A, Hyden-Granskog C, Suikkari A-M, Tiitinen A y Tuuri T (2002) The predictive value of pronuclear morphology of zygotes in the assessment of human embryo quality. *Hum Reprod* 16, 2177-2181

10 Shoukir Y, Campana A, Farley T y Sakkas D (1997) Early cleavage of in vitro fertilized embryos to the 2-cell stage: a novel indicator of embryo quality and viability. *Hum Reprod* 12, 1531-1536

15 Vayena E, Rowe PJ y Griffin PD (2001) Current practices and controversies in assisted reproduction: Informe de una reunión sobre "aspectos Médicos, Éticos y Sociales de reproducción asistida" celebrado en la sede general de la OMS en Ginebra, Suiza.

Windt M-L, Krueger TF, Coetzee K y Lombard CJ (2004) Comparative analysis of pregnancy rates after the transfer of early dividing embryos versus slower dividing embryos. *Hum Reprod Vol* 19 No 5 pp 1155-1162

20 Books

John C Russ (2002) *The Image Processing Handbook*, CRC press, 4ª Edición ISBN: 084931142X

25 Patentes

Bongiovanni Kevin Paul, Audi Paul Patrick, Fortin Christophers, McPhillips Kenneth (24/02/2005) *Automatic target detection and motion analysis form image data*. Documento de patente US2005041102

30 Cecchi Michael D, Mezezi Monica (24/07/2003) *Biological specimen-culturing system and method with onboard specimen development sensors*. Documento de patente US2003138942

Garankani Arman M., Hack, Andrew A., Roberts Peter, Walter, Sean (13/02/2003) *Method and apparatus for acquisition, compression, and characterization of spatiotemporal signals*. Documento de patente US20030185450

35 Iwasaki Masahiro, Imagawa Taro (28/04/2005) *Monitoring device*. Documento de patente WO2005039181

Myers James Carrol (25/06/2004) *A method of searching recorded digital video for areas of activity* MXA03003268, Documento de patente US6434320 (B1)

40 Klevecz Robert R., Eccles Beverly A. (09/02/1988) *Method and apparatus for automatic digital image analysis*. Documento de patente US4724543

45 Tago Akira, Tsujii Osamu (18/05/2005) *Radiographic image processing method and apparatus*. Documento de patente EP1531422.

Productos

50 EmbryoGuard: Lapso de Tiempo Microscópico y garantía de calidad. Un producto comercializado por IMT international, Chester, Inglaterra. (<http://www.cryo-imt.com/embryoguard.htm>)

55 FertiMorph. Software para análisis de morfología embrionaria. Medidas y puntuación cuantitativas de morfología embrionaria usando 3D una gran cantidad de imágenes registradas en diferentes posiciones en el embrión. Un producto comercializado por Image House Medical, Copenhague, Dinamarca (<http://www.ihmedical.com/products.aspx?id=fmorph-po>).

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar un cambio en una población de células que comprende al menos una célula, comprendiendo dicho método las etapas de
 5 adquirir secuencialmente al menos dos imágenes de la población de células
 comparar al menos una parte de las al menos dos imágenes para obtener al menos una imagen de diferencia
 calcular un parámetro de la al menos una imagen de diferencia, y
 basándose en dicho parámetro calculado, determinar si se ha producido un cambio,
 10 caracterizado por que el parámetro calculado es una desviación estándar o varianza de valores para los píxeles en
 la imagen de diferencia.
2. El método de la reivindicación 1, en el que el parámetro mencionado se calcula a partir la al menos una imagen de
 diferencia basándose en la imagen de diferencia completa.
- 15 3. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el parámetro mencionado se
 calcula sin segmentación adaptativa de la imagen en regiones de interés, y regiones que no tienen interés.
4. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la población de células es un
 20 embrión.
5. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el cambio en la población de
 células es reorganización celular, tal como movimiento celular.
6. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el cambio en la población de
 25 células es división celular.
7. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el cambio en la población de
 células es muerte de al menos una célula.
- 30 8. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la imagen de diferencia se
 obtiene restando valores para los píxeles correspondientes en las al menos dos imágenes.
9. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la imagen de diferencia se
 35 obtiene calculando la proporción de valores para los píxeles correspondientes en las al menos dos imágenes.
10. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la imagen de diferencia es
 una imagen de diferencia de intensidad.
11. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que los valores de los píxeles en
 40 la imagen de diferencia corresponden a diferencia de intensidad.
12. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que los valores de los píxeles en la
 imagen de diferencia corresponden a diferencia en característica espectral.
- 45 13. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las al menos dos imágenes
 se someten a escala idéntica antes de dicha comparación para obtener al menos una imagen de diferencia.
14. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que se obtiene una pluralidad de
 50 imágenes de diferencia a partir de una secuencia de imágenes consecutivas y un cambio en dicho parámetro
 calculado es indicativo de un cambio en la población de células.
15. El método de acuerdo con la reivindicación 14, en el que cada una de dichas imágenes de diferencia se obtienen
 a partir de dos imágenes consecutivas y la recogida de los parámetros calculados de dichas imágenes de diferencia
 55 forman una serie temporal.
16. El método de acuerdo con las reivindicaciones 14 o 15 en el que un extremo en dicho parámetro calculado es
 indicativo de reorganización celular tal como motilidad celular.
17. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 16, en el que un extremo en dicho parámetro
 60 calculado es indicativo de división celular.
18. El método de acuerdo con la reivindicación 17, en el que la forma de dicho extremo indica la naturaleza del
 cambio que se produce en la población de células.
- 65 19. El método de acuerdo con la reivindicación 15 a 18, en el que un pico estrecho intenso indica una división celular
 rápida con fragmentación mínima.
20. El método de acuerdo con las reivindicaciones 18 o 19, en el que un pico ancho y/o bimodal indica divisiones

celulares más lentas posiblemente división celular asincrónica y/o más fragmentación.

- 5 21. El método de acuerdo con la reivindicación 20, en el que dicho pico ancho y/o bimodal indica división celular asincrónica.
22. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la determinación de un cambio en la población de células agrupadas se compara con otras medidas de la población de células agrupadas.
- 10 23. Un método para determinar la calidad de una población de células que comprende al menos una célula, comprendiendo dicho método las etapas de
adquirir secuencialmente al menos dos imágenes de la población de células
comparar al menos una parte de las al menos dos imágenes para obtener al menos una imagen de diferencia
calcular un parámetro de la al menos una imagen de diferencia, y
basándose en dicho parámetro calculado que determina la calidad de la población de células,
15 caracterizado por que el parámetro calculado es una desviación estándar o varianza de valores para los píxeles en la imagen de diferencia.
- 20 24. El método de cualquier reivindicación 23 para determinar la calidad del embrión que comprende controlar el embrión durante un periodo de tiempo, teniendo dicho periodo de tiempo una duración suficiente para comprender al menos un periodo de división celular y al menos una parte de un periodo entre divisiones, y determinar la duración del al menos un periodo de división celular y/o determinar el movimiento celular durante el periodo entre divisiones y/o determinar la duración del periodo de de tiempo del movimiento celular durante un periodo entre divisiones obteniendo de este modo una medida de la calidad del embrión.
- 25 25. El método de acuerdo con la reivindicación 24, en el que el embrión se controla durante un periodo de tiempo que comprende al menos dos al menos dos periodos de división celular.
- 30 26. El método de acuerdo con la reivindicación 23 para determinar la calidad del embrión que comprende controlar el embrión durante un periodo de tiempo, teniendo dicho periodo de tiempo una duración suficiente para comprender al menos un periodo de reorganización celular y un periodo sin reorganización celular sustancial uso del método que se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1 - 22 para determinar la distribución temporal de la reorganización celular obteniendo de este modo una medida de la calidad del embrión.
- 35 27. El método de acuerdo con la reivindicación 26, en el que el embrión se controla durante un periodo de tiempo que comprende al menos dos periodos de división celular.
- 40 28. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 23 a 27, en el que se determina la duración del tiempo para cada periodo de reorganización y/o periodo de división celular.
- 45 29. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 23 a 28, en el que se determina la duración del tiempo entre cada periodo de reorganización y/o periodo de división celular.
30. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2234 a 29, en el que se determina el periodo de movimiento celular en al menos dos periodos entre divisiones.
- 50 31. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 23 a 30, en el que se determina al alcance del movimiento celular en al menos dos periodos entre divisiones.
- 55 32. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 23 a 31, en el que se realiza la determinación de la duración del al menos un periodo de división celular y la determinación del movimiento celular durante el periodo entre divisiones.
33. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 23 a 32, en el que una duración breve de reordenaciones celulares después de la división celular es indicativo de un embrión de alta calidad.
- 60 34. El método de acuerdo con la reivindicación 33, en el que la duración de la reorganización celular se determina mediante cualquiera de los métodos descritos en la reivindicación 1 a 22.
35. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 23 a 34, en el que un pico del parámetro estrecho intenso determinado mediante cualquiera de los métodos descritos en la reivindicación 1 a 22 es indicativo de un embrión de alta calidad.
- 65 36. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 23 - 35, en el que la división citoplasmática prolongada y la reorganización extensa y/o prolongada de los otros blastómeros a continuación indica un embrión de mala calidad.
37. El método de acuerdo con la reivindicación 36, en el que la reorganización extensa y/o prolongada mencionada de los otros blastómeros se indica mediante un pico ancho en la actividad de blastómeros.

38. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 23 - 37, en el que regiones persistentemente inmóviles en un embrión indican un embrión de mala calidad.
- 5 39. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 23 a 38, en el que la ausencia de regiones inmóviles sin movimiento antes de la compactación en la fase de mórula indica un embrión de alta calidad.
40. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 23 a 39, en el que la proporción de movimiento medio en segmentos temporales adecuados y/o una proporción de desviaciones estándar para la imagen de diferencia en segmentos temporales diferentes es un parámetro de calidad.
- 10 41. El método de acuerdo con la reivindicación 40, en el que los segmentos temporales mencionados para un embrión bovino son básicamente de 32-60 horas después de la fertilización y/o 60-75 horas después de la fertilización y/o 75-90 horas después de la fertilización.
- 15 42. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 23 a 41, en el que los periodos de división celular inferiores a básicamente 1 hora aumentan la medida de la calidad del embrión.
43. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 23 a 42, en el que un movimiento celular escaso en los periodos entre divisiones aumenta la medida de la calidad del embrión.
- 20 44. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 23 a 43, en el que el comienzo temprano del primer periodo de división celular, es decir, antes de 25 horas después de la fertilización para embriones humanos aumenta la medida de la calidad del embrión.
- 25 45. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 23 a 44, en el que la distribución uniforme de la reorganización celular tal como movimiento celular dentro del embrión en el tiempo aumenta la medida de la calidad del embrión.
- 30 46. Un método para seleccionar un ovocito o embrión fertilizado adecuado para trasplante, conservación congelado o eliminación comprendiendo dicho método determinar los cambios en el ovocito o embrión mediante un método tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 - 45, y seleccionar el ovocito o embrión adecuado para trasplante, conservación congelado o eliminación.
- 35 47. El método de la reivindicación 46, en el que el ovocito o embrión seleccionado mencionado es el ovocito o embrión que tiene la medida de la calidad del embrión más alta.
- 40 48. El método de la reivindicación 46, en el que el ovocito o embrión seleccionado mencionado es el ovocito o embrión que tiene la medida de la calidad del embrión más baja.
49. El método de la reivindicación 46, en el que el ovocito o embrión seleccionado mencionado es el ovocito o embrión que tiene atributos en particular tales como un patrón temporal en particular en uno de los parámetros determinados con los métodos de la reivindicación 1-22.
- 45 50. Un sistema para determinar un cambio en una población de células que comprende al menos una célula, comprendiendo dicho sistema medios para adquirir secuencialmente al menos dos imágenes de la población de células medios para comparar al menos una parte de las al menos dos imágenes para obtener al menos una imagen de diferencia un ordenador para calcular un parámetro de la al menos una imagen de diferencia, y medios para determinar si se ha producido un cambio basándose en dicho parámetro calculado, caracterizado por que el parámetro calculado es una desviación estándar o varianza de valores para los píxeles en la imagen de diferencia.
- 50 51. Un sistema para determinar la calidad de una población de células que comprende al menos una célula, comprendiendo dicho sistema medios para adquirir secuencialmente al menos dos imágenes de la población de células medios para comparar al menos una parte de las al menos dos imágenes para obtener al menos una imagen de diferencia un ordenador para calcular un parámetro de la al menos una imagen de diferencia, y medios para determinar la calidad de la población de células basándose en dicho parámetro calculado, caracterizado por que el parámetro calculado es una desviación estándar o varianza de valores para los píxeles en la imagen de diferencia.
- 55 60 65

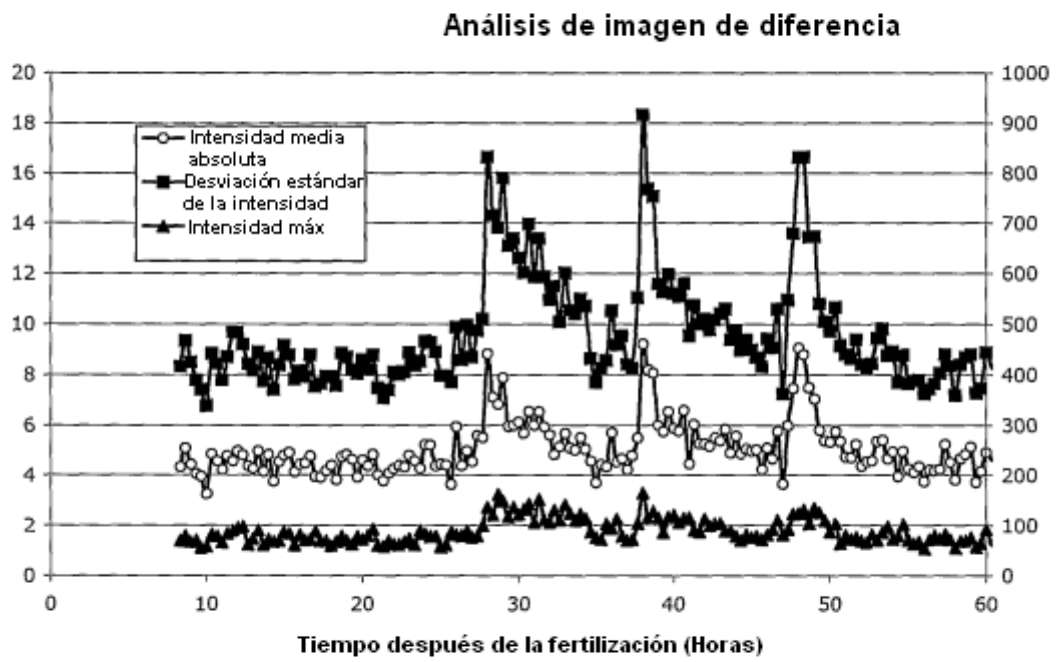


Fig. 1

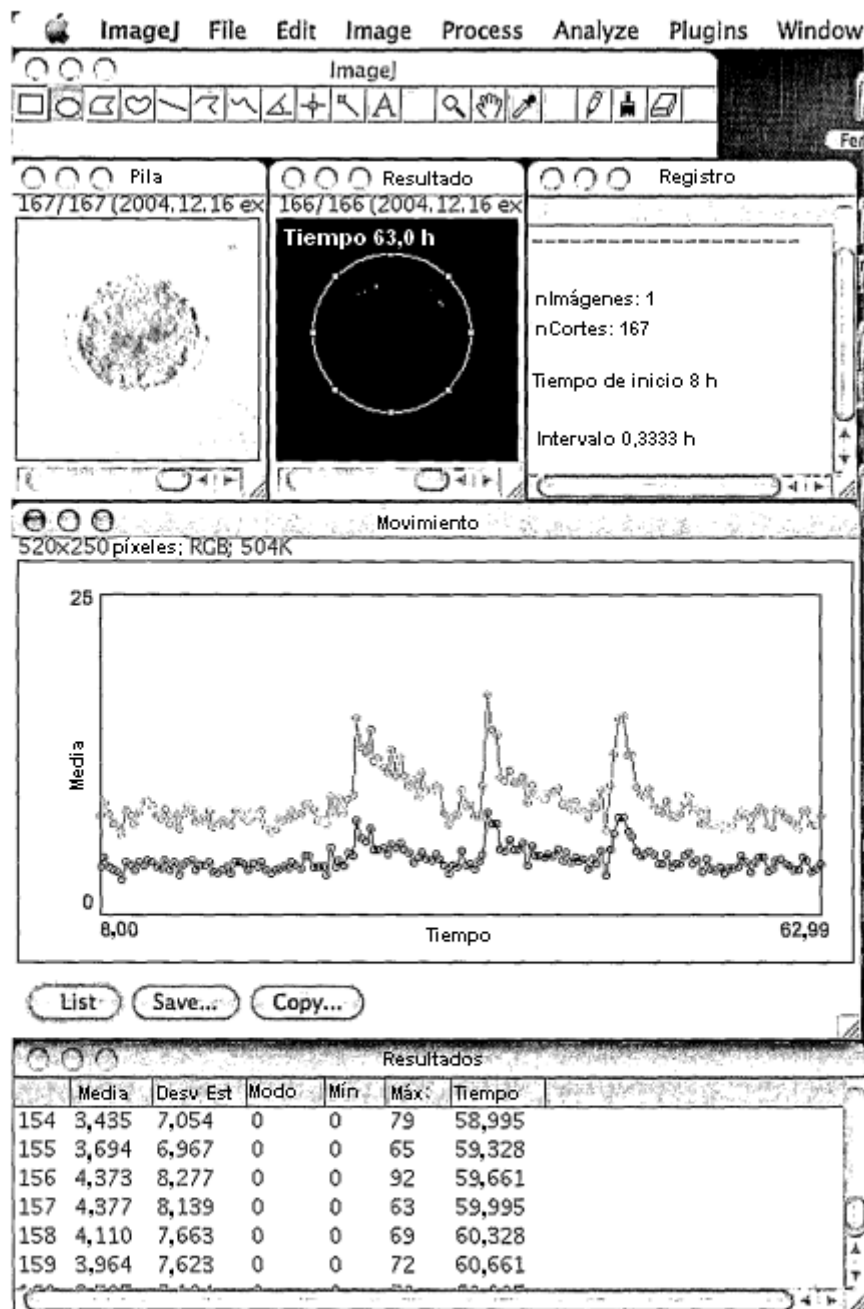


Fig. 2

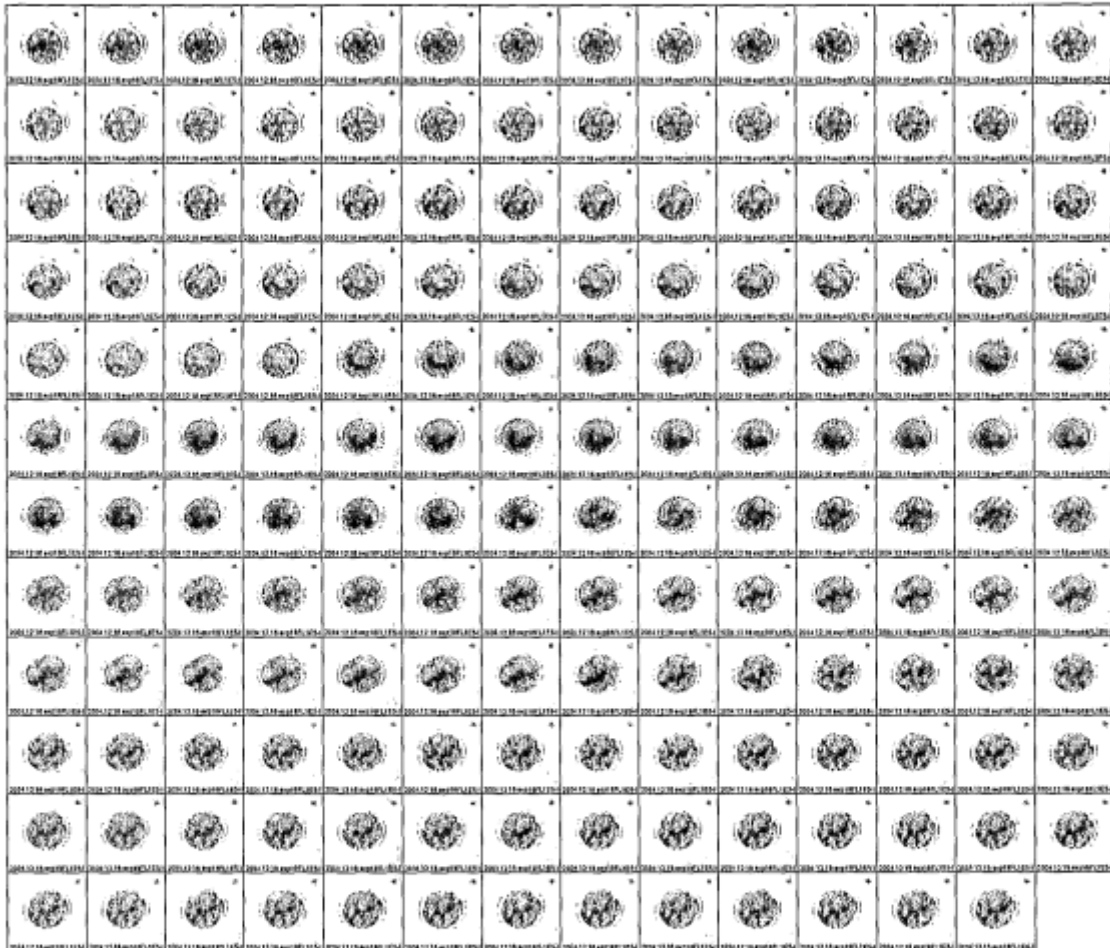


Fig. 3

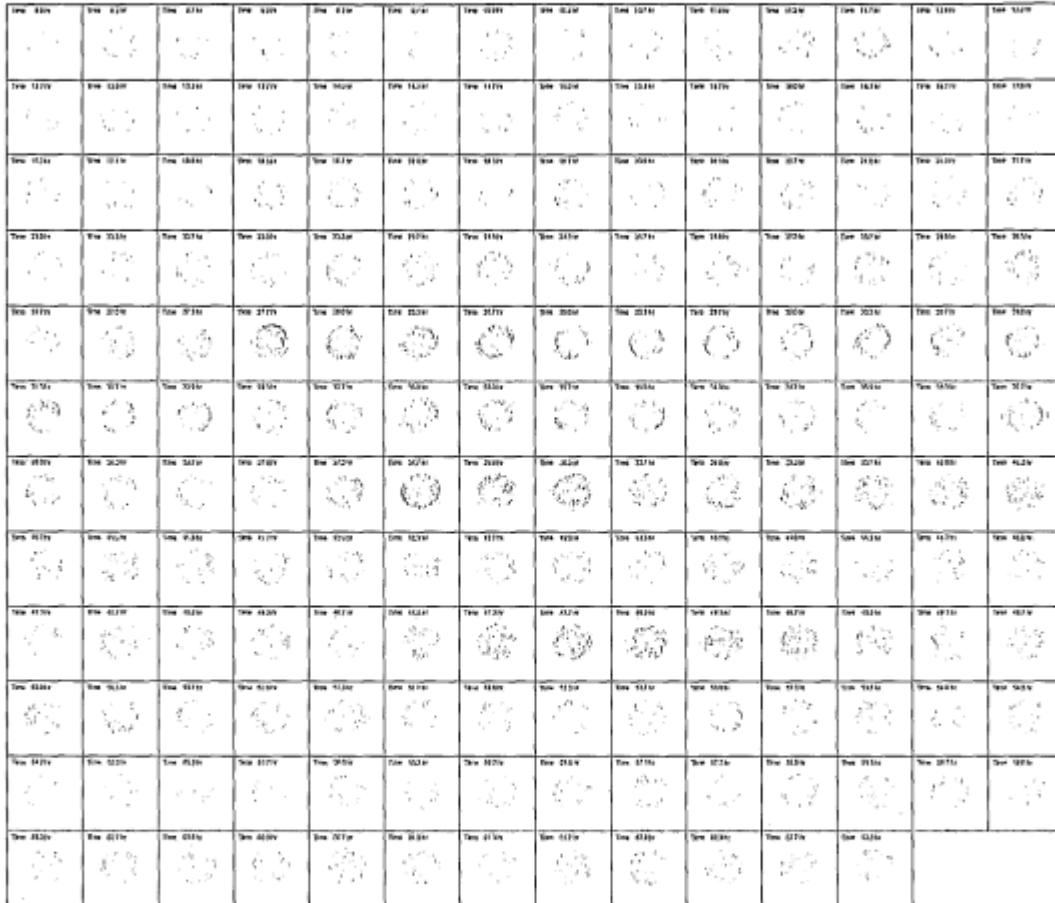


Fig. 4

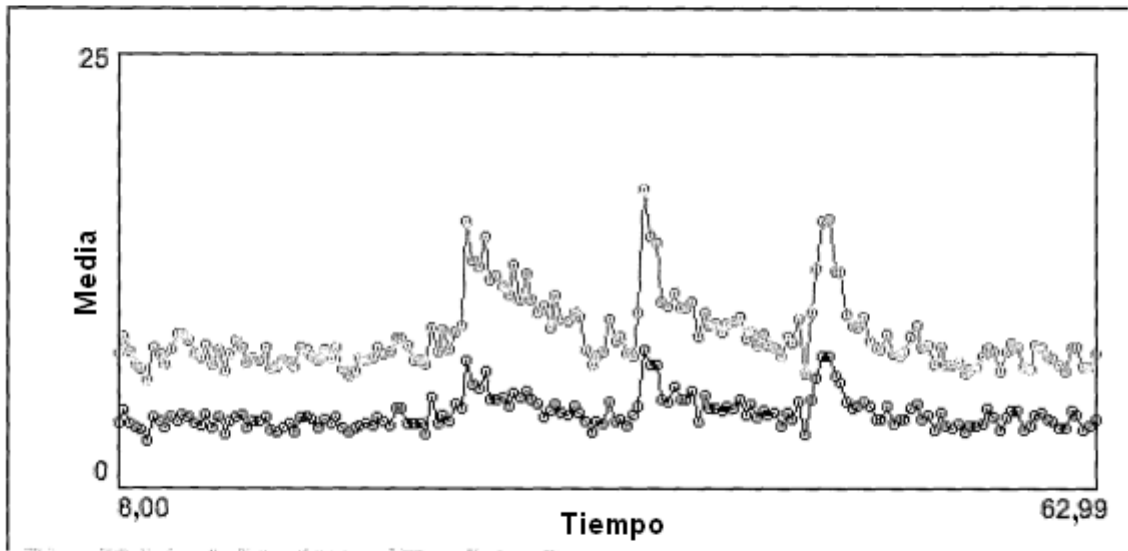


Fig. 5

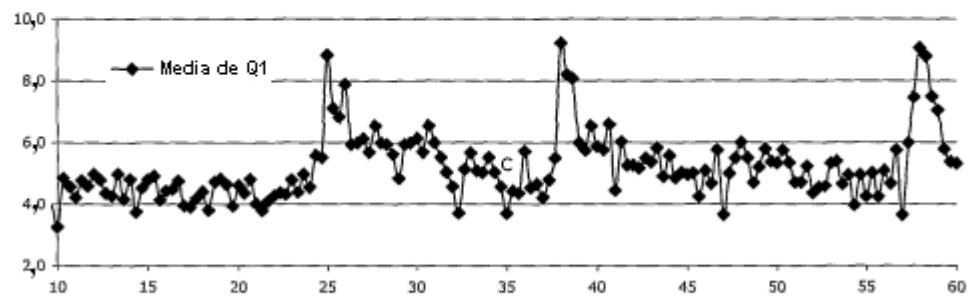
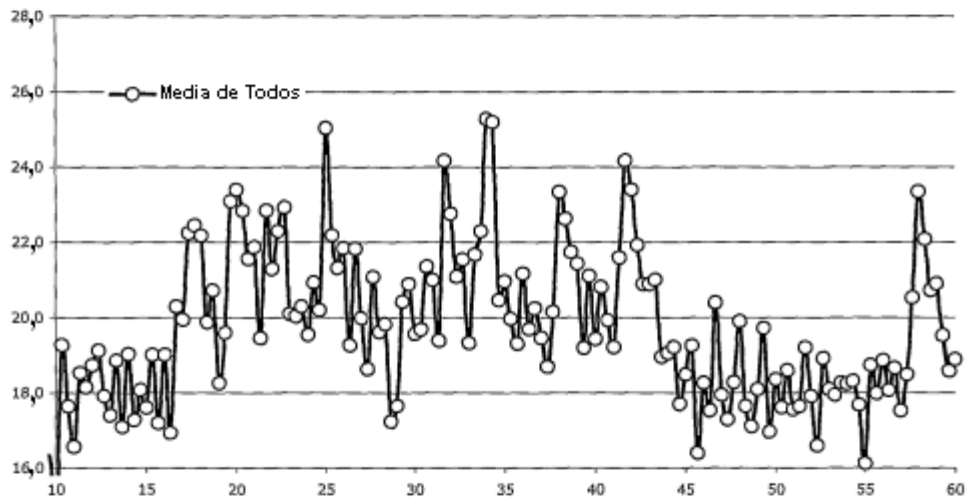
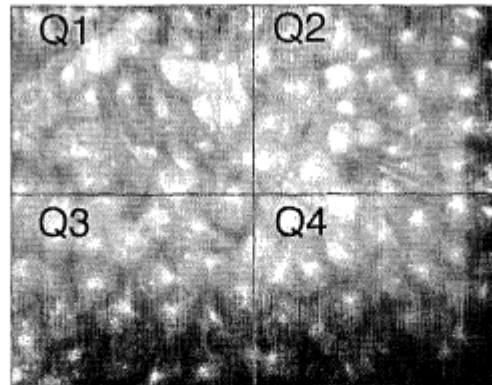


Fig. 6

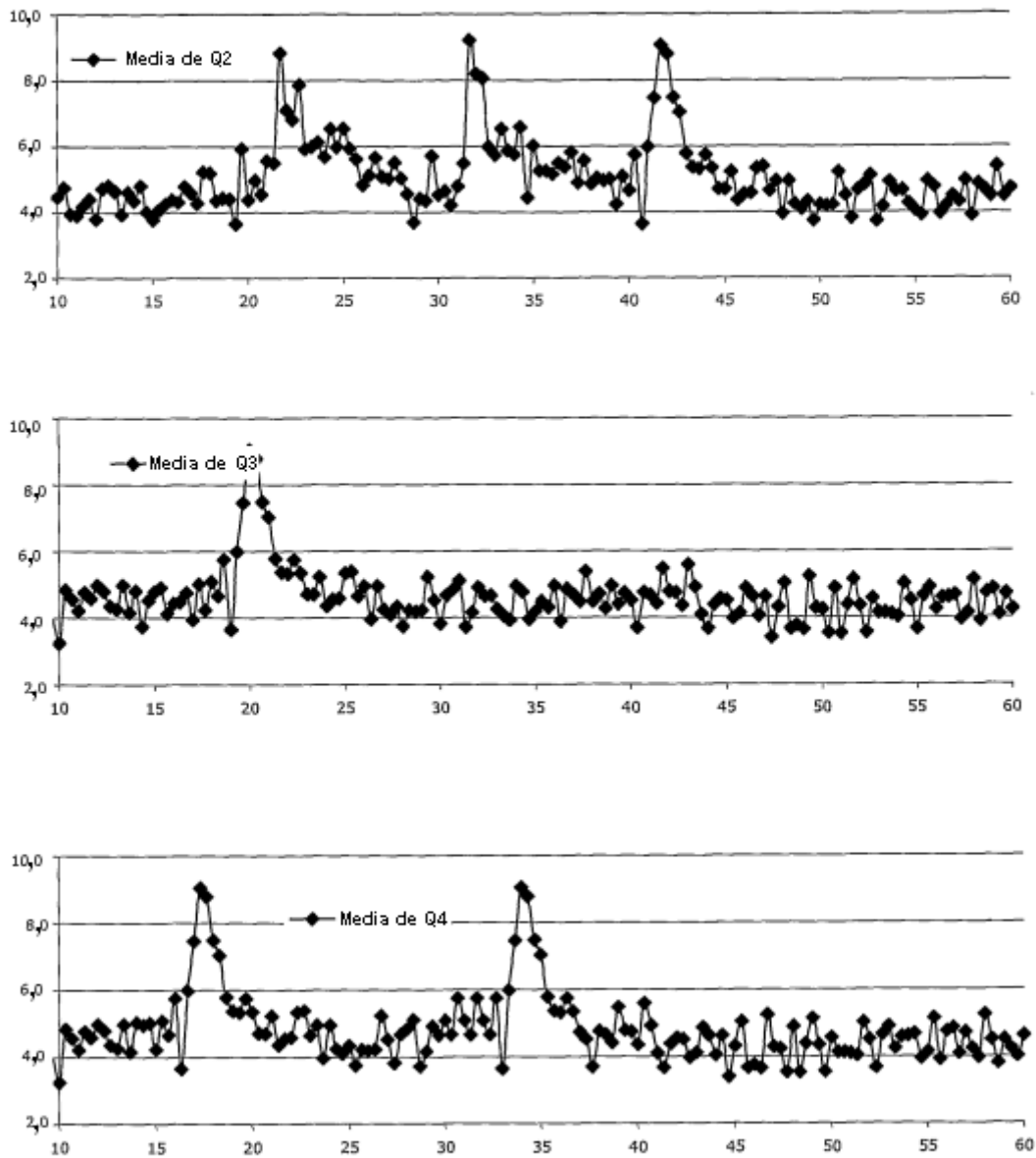


Fig. 6 (continuación)

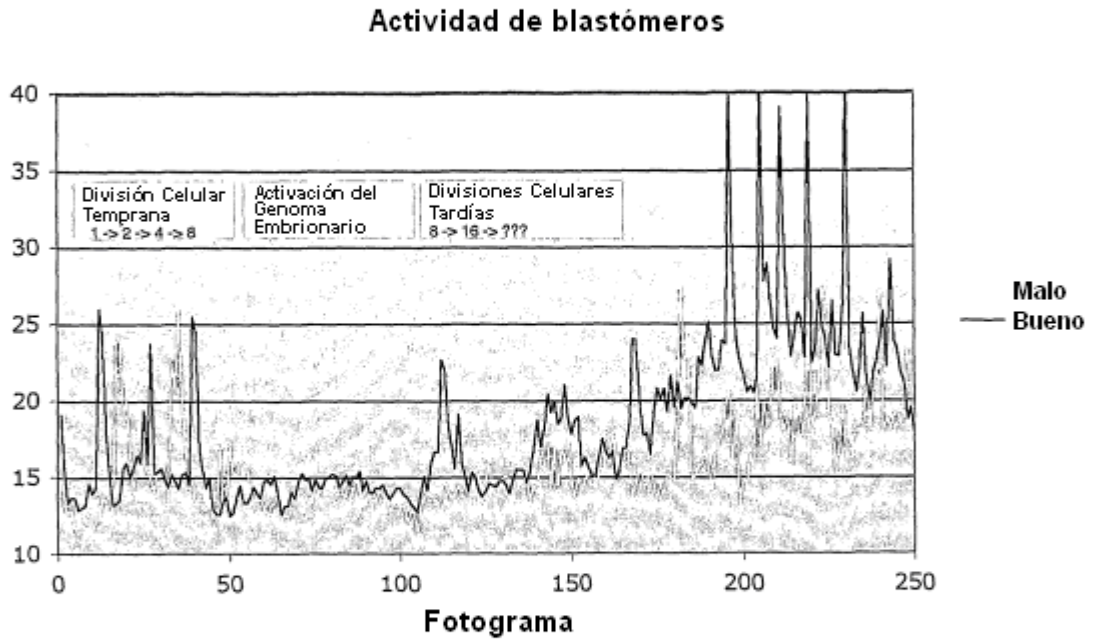


Fig. 7

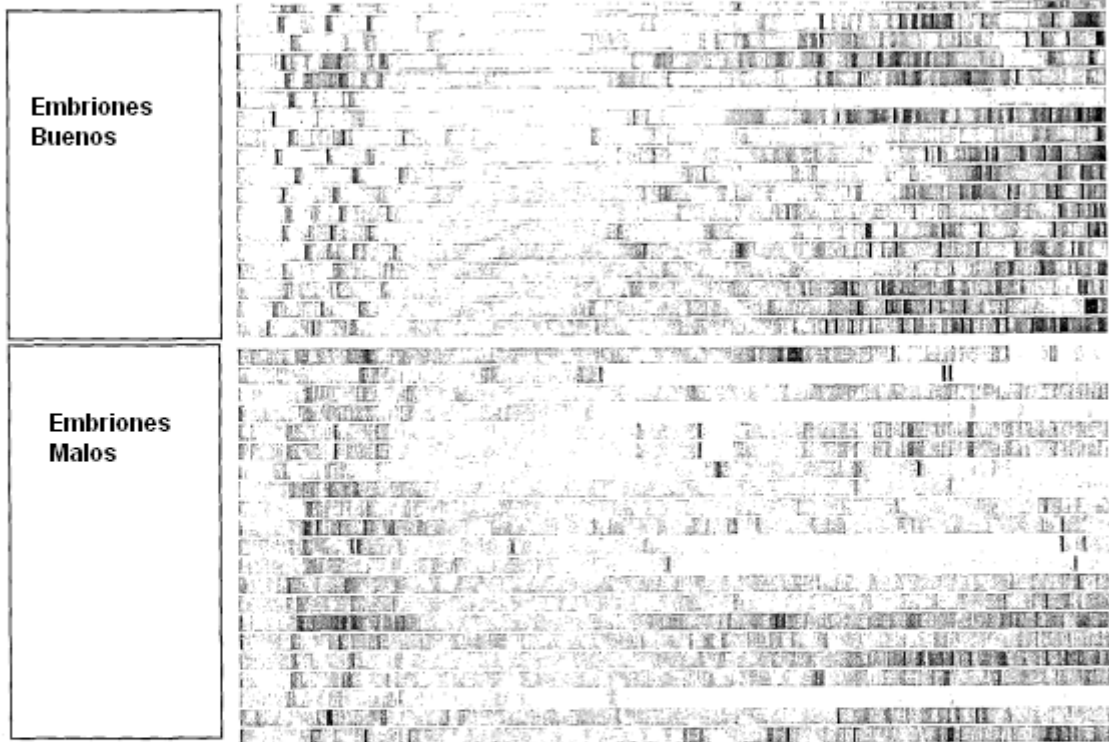


Fig. 8

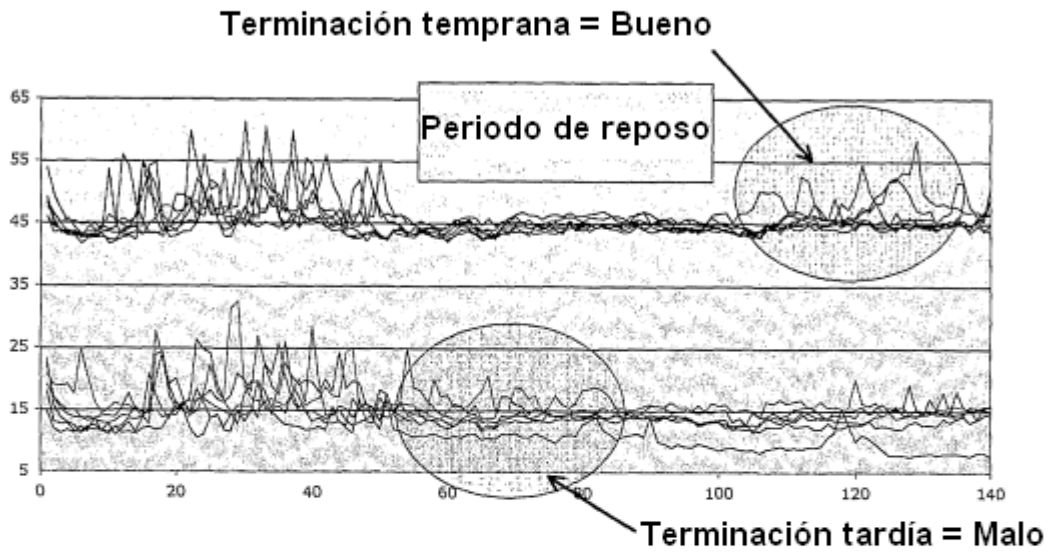
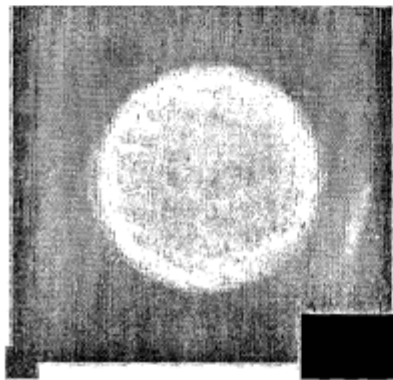


Fig. 9

Bueno



Malo

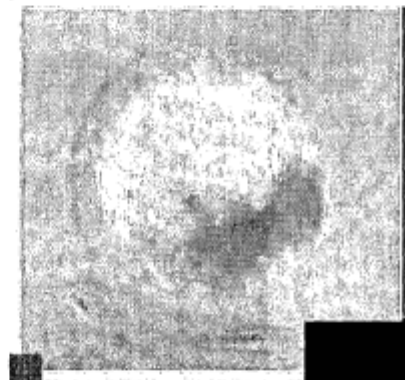


Fig. 10

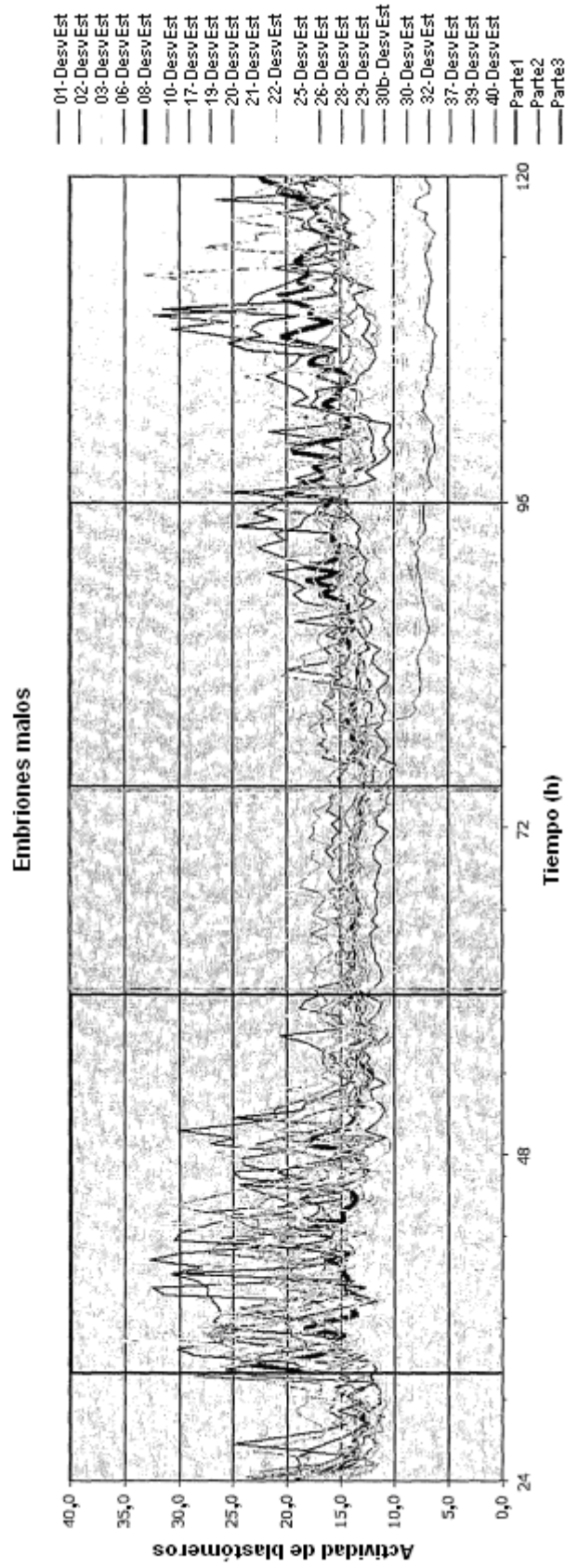


Fig. 11

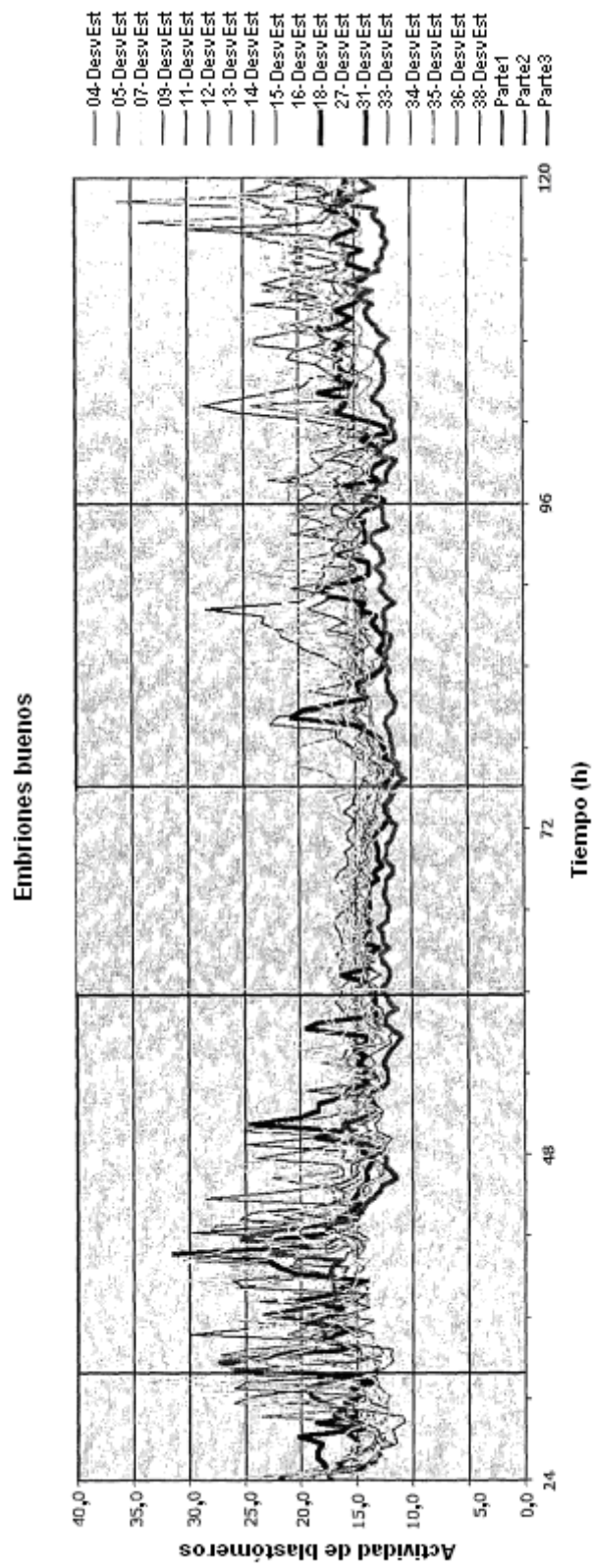
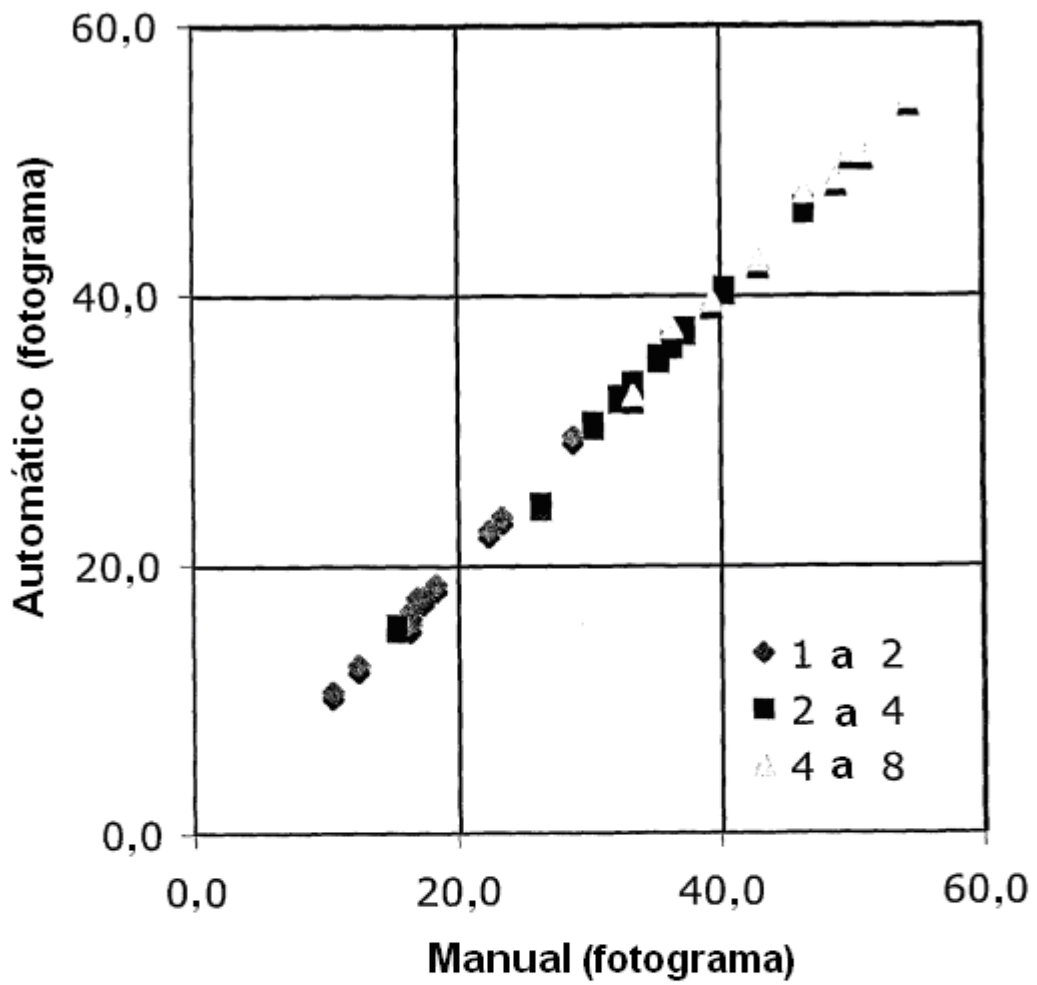


Fig. 12

Selección de embriones basada en las proporciones del promedio y de la desviación estándar para la actividad de blastómeros en diferentes segmentos

Secciones	Tiempo (h) Fotograma		Tiempo (h) Fotograma		Tiempo (h) Fotograma																		
	Parte 1	73	Parte 2	60	Parte 3	75																	
	32	129	75	159	96	201																	
	60	159																					
Embriones malos																							
Criterio 1	Promedio	16,2	17,0	12,7	15,3	14,7	17,6	21,7	16,7	17,4	15,8	16,2	19,3	15,4	18,9	12,9	15,4	15,4	16,6	16,2	13,8	20,1	
	Promedio	Parte 3	13,8	15,5	8,8	14,4	14,4	14,9	15,9	13,7	14,6	11,3	12,3	14,3	12,8	13,5	10,9	12,0	12,2	8,5	13,9	10,5	16,6
	Proporción <	1,15	1,17	1,09	1,44	3,07	1,02	1,18	1,37	1,22	1,19	1,41	1,32	1,35	1,20	1,40	1,18	1,28	1,25	1,96	1,17	1,31	1,21
Criterio 2	DesvEst	Parte 2	0,655	0,709	1,473	0,628	0,425	1,405	0,579	0,752	0,693	0,99	1,934	1,382	1,06	0,495	0,737	0,498	0,489	1,364	0,671	3,352	0,898
	DesvEst	Parte 3	3,138	0,983	1,564	1,094	1,377	1,206	2,917	1,157	0,944	1,977	1,354	2,092	1,086	0,581	0,605	1,644	1,703	2,029	2,319	4,546	1,05
	Proporción <	0,50	0,209	0,721	0,930	0,574	0,308	1,165	0,198	0,734	0,500	1,429	0,756	0,974	0,852	1,219	0,303	0,287	0,672	0,289	0,737	0,855	
Combinado																							
		Malo	Malo	Malo	Malo	Malo	Malo	Malo	Malo	Malo	Malo	Malo	Malo	Malo	Malo	Malo	Malo	Malo	Malo	Malo	Malo	Malo	Malo
Embriones buenos																							
Criterio 1	Promedio	Parte 1	15,6	15,2	15,3	15,9	17,4	13,8	16,0	16,1	16,0	15,6	17,1	14,7	15,6	19,7	19,7	15,8	15,2	16,6			
	Promedio	Parte 3	16,3	15,9	15,8	15,9	17,3	15,1	14,8	16,6	14,0	15,6	14,0	15,0	12,1	17,9	17,8	15,3	15,0	14,8			
	Proporción <	1,15	0,96	0,95	0,97	1,00	1,01	1,05	1,08	0,97	1,14	1,00	1,22	0,98	1,29	1,10	1,11	1,03	1,02	1,12			
Criterio 2	DesvEst	Parte 2	0,909	0,519	0,444	0,524	0,632	0,75	0,518	0,581	0,699	0,703	0,92	0,79	0,413	0,888	0,909	0,551	0,504	0,473			
	DesvEst	Parte 3	1,824	2,347	2,211	1,544	2,88	2,25	1,328	2,662	1,433	1,536	2,045	2,558	0,677	2,103	3,043	2,075	1,671	1,71			
	Proporción <	0,50	0,498	0,221	0,201	0,339	0,219	0,313	0,390	0,218	0,488	0,458	0,450	0,309	0,609	0,422	0,239	0,265	0,302	0,277			
Combinado																							
		Bueno	Bueno	Bueno	Bueno	Bueno	Bueno	Bueno	Bueno	Bueno	Bueno	Bueno	Bueno	Bueno	Bueno	Bueno	Bueno	Bueno	Bueno	Bueno	Bueno	Bueno	Bueno

Fig. 13



	Análisis manual			Análisis automatizado		
	1 a 2	2 a 4	4 a 8	1 a 2	2 a 4	4 a 8
1	23,5	40,5	54,5	23,5	40,5	54,5
2		46,5	66,5		46,5	
3	16,5	32,5		16,5	32,5	
4	10,5	26,5	36,5	10,5	24,5	37,5
5	12,5	27,5	39,5	12,5 ¹		39,5
6	18,5	35,5	50,0	18,5	35,5	
7	16,5	32,5	46,5	16,5	32,5	47,5
8	18,5	36,5	50,0	18,5	36,5	50,5
9	1,5	15,5	33,5		15,5	32,5
10	17,5	32,5	48,5	17,5	32,5	
11	22,5	37,5	51,0	22,5	37,5	50,5
12	16,5	30,5	43,0	15,5	30,5	42,5
13	17,0	33,5	49,0	17,5	33,5	48,5

Fig. 14

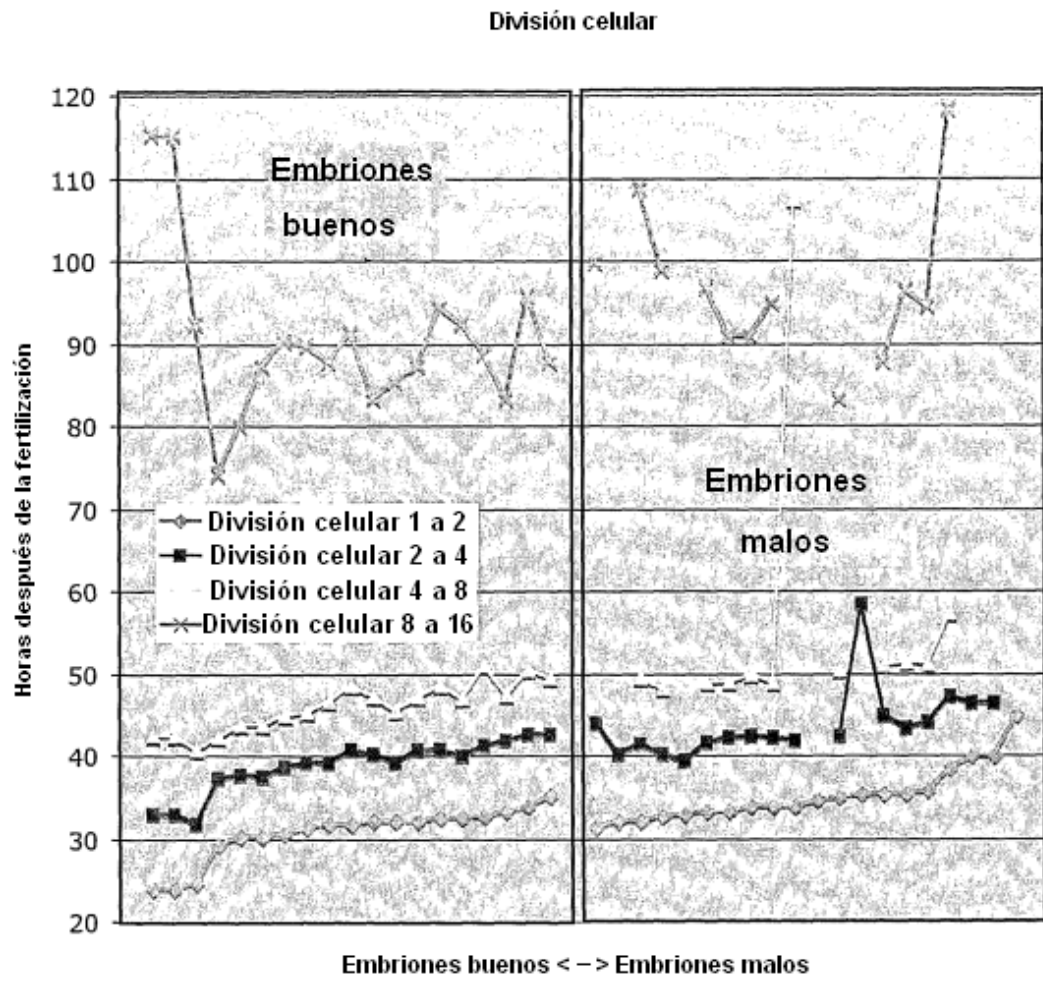


Fig. 15