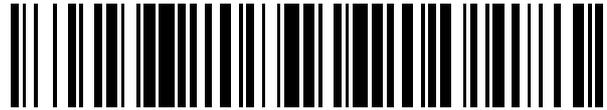


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 594 552**

51 Int. Cl.:

**G06T 7/00**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.05.2013 PCT/IB2013/054053**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.11.2016 WO2013182929**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.05.2013 E 13731954 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.06.2016 EP 2856427**

54 Título: **Método para cuantificar el grado de regularidad morfológica de la zona pelúcida en embriones y ovocitos**

30 Prioridad:

**05.06.2012 IT RM20120257**

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

**21.12.2016**

73 Titular/es:

**ADVANCED COMPUTER SYSTEMS A.C.S. S.R.L.  
(100.0%)**

**Via Della Bufalotta, 378  
00139 Roma, IT**

72 Inventor/es:

**BIZZI, STEFANO y  
GALLI, LUCA**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 594 552 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

Método para cuantificar el grado de regularidad morfológica de la zona pelúcida en embriones y ovocitos

5 La presente invención se refiere a un método para calcular un factor de forma indicativo de la uniformidad del espesor de la zona pelúcida de una estructura biológica, y a un método para evaluar la uniformidad del espesor de la zona pelúcida de dicha estructura a través de dicho factor de forma.

10 La zona pelúcida es una membrana de glicoproteína que rodea el óvulo (ovocito) de los mamíferos, y es producida por el ovocito durante la ovogénesis. La zona pelúcida es, en particular, una envoltura primaria que está ubicada entre la membrana plasmática del óvulo y las células foliculares, que tiene diversas funciones, entre las cuales las de: el fomento de la unión de espermia por la presencia de receptores específicos, la contribución al bloqueo de la poliespermia, la protección del embrión durante la segmentación, la inducción de la liberación de enzimas líticas presentes en el acrosoma y la garantía de especificidad de especie de la fertilización.

15 El análisis de las características morfológicas de ovocitos y embriones es realizado con frecuencia por médicos y técnicos especialistas para diversos fines. En particular, en las técnicas de reproducción asistida (RA), las evaluaciones acerca de las características morfológicas del ovocito pueden permitir obtener información acerca de, por ejemplo, la potencial fertilidad del óvulo, la potencial unión o el trascurso del embarazo después de la implantación. Para este fin, normalmente el especialista adquiere imágenes de los ovocitos o embriones en las fases que preceden a la implantación con la RA y realiza evaluaciones acerca de sus características morfológicas en función de su experiencia y capacidad de observación.

25 Las principales y más comunes metodologías de análisis y de clasificación morfológica de embriones y de ovocitos que se usan están basadas en la evaluación de una pluralidad de características morfológicas heterogéneas, entre las cuales, por ejemplo, la simetría de la forma celular, el número de células, la homogeneidad de la estructura interna, la presencia de corpúsculos, el aspecto del glóbulo polar y del espacio perivitelino. Tales evaluaciones, que están basadas en la experiencia y en la capacidad de observación y por lo tanto, en última instancia, en criterios no siempre cuantitativos y objetivos, están vinculadas con un cierto grado de subjetividad y, por lo tanto, entrañan diversos inconvenientes. En particular, la evidencia experimental que está relacionada con la aplicación de tales metodologías indica, por ejemplo, cómo la calidad de los parámetros detectados no puede aún correlacionarse completamente con el éxito real de los procedimientos de RA.

35 En la literatura científica, también se han propuesto métodos alternativos a los que se han indicado en lo que antecede, tales como la caracterización de la variabilidad, o en un doble sentido la uniformidad, de la zona pelúcida y, en particular, de su espesor.

40 Tales métodos están basados en el cálculo del porcentaje de variación del espesor de la zona pelúcida (*PZTV, pellucid zone thickness variation*) a partir de mediciones "manuales" que son realizadas por el técnico especialista en un pequeño número de puntos, de aproximadamente 4 a 8, en la imagen del embrión u ovocito. Varios son los inconvenientes que están asociados con tales métodos; en particular, las mediciones de variabilidad de la zona pelúcida dependen de unos puntos seleccionados por el operador en la imagen, e incluso en el caso de que el espesor se mida en un conjunto fijo de puntos (el mismo para cualquier operador), las mismas mediciones dependen de la orientación del propio embrión, por lo tanto, un cambio en la orientación del embrión entraña una medición diferente de la variabilidad de la zona pelúcida.

50 Además, el pequeño número de puntos de muestra (de 4 a 8) en las imágenes y la ausencia de procedimientos adecuados de filtrado, optimización, detección de bordes automatizada de la imagen de la zona pelúcida, permiten una medición estrictamente limitada a la variabilidad de baja frecuencia, proporcionando una información muy aproximada e incompleta en lo que respecta a niveles de irregularidad concentrados, en particular, en secciones de la zona pelúcida.

55 El documento EP1918692 describe un método para determinar el espesor de la zona pelúcida que comprende las etapas de determinar los bordes interiores y exteriores de la zona pelúcida. En particular, el espesor se calcula por medio del soporte lógico Quick Photo Micro 2.2, disponible en el mercado.

60 N. Pacala y col. ("*Establishing some morphometric parameters usable in estimating the quality of mouse embryos in different development stages*", *Lucrari Stiintifice* vol. 55, *Seria Zootehnie* (01-01-2011) páginas 311-314) investigan los parámetros morfométricos que se pueden usar en la estimación de la calidad de embriones de ratón en diferentes fases del desarrollo. Los parámetros morfométricos tomados en consideración fueron: el espesor de la zona pelúcida, el diámetro exterior e interior y el perímetro exterior e interior. Estos parámetros se midieron mediante el soporte lógico Quick Photo Micro 2.2.

65 En consecuencia, hasta la fecha no se ha logrado ni evidencia concluyente ni una aplicación eficaz de las características morfológicas de la zona pelúcida en el ámbito médico, en particular en apoyo de los procedimientos de reproducción asistida (RA).

Un objeto de la presente invención es proponer una solución novedosa y original a los inconvenientes presentes en el estado de la técnica que se ha mencionado en lo que antecede y que está relacionada con métodos para medir la uniformidad de la zona pelúcida.

5 Un primer objeto de la presente descripción es un método para calcular un factor de forma indicativo de la uniformidad del espesor de la zona pelúcida de una estructura biológica, tal como se define mediante la reivindicación 1.

10 Un segundo objeto de la presente descripción es un método para evaluar la uniformidad del espesor de la zona pelúcida de una estructura biológica a través de un factor de forma calculado mediante el método anterior, tal como se define mediante la reivindicación 14.

15 En las reivindicaciones dependientes relacionadas se notifican características preferidas de los objetos de la presente descripción.

20 En particular, la presente descripción se refiere a un método para calcular un factor de forma indicativo de la uniformidad del espesor de la zona pelúcida de una estructura biológica, tal como, por ejemplo, ovocito, embrión o cigoto, método caracterizado por que cualquier variación en el espesor de la zona pelúcida contribuye a la definición del valor del factor de forma y, por lo tanto, a la evaluación de la uniformidad del espesor. Esto se diferencia de lo que tiene lugar con los métodos que se conocen en el estado de la técnica, en los que el espesor analizado es, exclusivamente, una función del valor máximo y mínimo de tal espesor de la zona pelúcida. En particular, un resultado de este tipo se logra gracias al hecho de que el factor de forma, en el método que se describe en el presente documento, es una función de la longitud de una línea de trazo discontinuo y de un conjunto de curvaturas locales, que se calculan en cada vértice que está relacionado con dicha línea de trazo discontinuo, en donde la línea de trazo discontinuo es una representación en un plano cartesiano de tal espesor de la zona pelúcida, tal como se detalla mejor en lo sucesivo en el presente documento.

30 El método que se describe en el presente documento entraña una serie de ventajas, entre las cuales se encuentra una mayor precisión en el cálculo del espesor de la zona pelúcida con respecto a las metodologías de análisis morfológico conocidas y actualmente usadas. En particular, el método que se propone en el presente documento posibilita superar las principales limitaciones encontradas con las metodologías comunes, debido a que este permite calcular un valor del espesor de la zona pelúcida que ya no está basado en criterios subjetivos, tales como la experiencia y la capacidad de observación, sino más bien en parámetros geométricos a partir de una imagen adquirida que está relacionada con la zona pelúcida. Además, precisamente debido a que el método está basado en parámetros de análisis objetivos, las variaciones en el cálculo del espesor de la zona pelúcida que se observan con el uso de los métodos conocidos y debido, por ejemplo, a cambios en la orientación de estructuras biológicas, se eliminan con el método que se describe en el presente documento. Una de las ventajas de la presente invención es, por lo tanto, la obtención de un valor detallado y preciso que no se ve afectado por la variabilidad que está vinculada a la realización por parte del operador individual y/o la orientación particular de la estructura biológica de interés. En consecuencia, el método que se describe en el presente documento permite, en última instancia, la obtención de un valor del factor de forma que está relacionado con la uniformidad del espesor de la zona pelúcida, valor que es robusto y asegura una alta fiabilidad de uso, como, por ejemplo, para fines médicos tales como reproducción asistida.

45 Además, dicho método se puede realizar de forma ventajosa, en cada una de sus etapas, de forma automática mediante el uso de un ordenador.

50 Ventajas adicionales, así como las características y los modos de empleo de la presente invención, serán evidentes en la siguiente descripción detallada que está relacionada con posibles realizaciones de la misma, dadas a modo de ejemplo no limitante. Se hará referencia a las figuras de los dibujos adjuntos, en los que:

- la figura 1 muestra una representación esquemática de las etapas de operación de una realización del método que se describe en el presente documento;
- las figuras 2A, 2B, 2C y 2D muestran un blastocisto con la zona pelúcida PZ relacionada;
- 55 - la figura 2E muestra un ejemplo de línea de trazo discontinuo que representa el conjunto de distancias que están relacionadas con las tomas de muestras de espesor de la zona pelúcida PZ.

60 Un objeto de la presente descripción es un método para calcular un factor de forma  $\Psi$  indicativo de la uniformidad del espesor de la zona pelúcida PZ de una estructura biológica.

"Zona pelúcida PZ" en la presente descripción quiere decir la membrana de glicoproteína que está ubicada externamente con respecto a la membrana plasmática de estructuras biológicas, tales como óvulo fertilizado (cigoto) o no fertilizado (ovocito) y embrión. Preferiblemente, dicha estructura biológica pertenece a animales tales como mamíferos, incluso más preferiblemente a seres humanos. Por lo tanto, la expresión "espesor de la zona pelúcida" denota el espesor de la membrana que rodea la membrana plasmática, por ejemplo, del ovocito.

El método comprende una serie de etapas operativas de naturaleza matemática/geométrica que se van a realizar a partir de una imagen digital adquirida de la zona pelúcida PZ a analizar. Tal imagen a adquirir puede comprender la estructura biológica con la zona pelúcida PZ respectiva, como, por ejemplo, un embrión (blastocisto) en el que la zona pelúcida PZ es visible, tal como se muestra en la figura 2A. Como alternativa, la imagen puede consistir en la única zona pelúcida PZ. La adquisición de imagen de la zona pelúcida PZ se puede realizar por medio de instrumentos adecuados para este fin. El técnico en el campo es capaz de adquirir una imagen de interés en función de su conocimiento, de tal modo que no es necesario proporcionar detalles adicionales en el presente documento. Meramente a modo de ejemplo, la adquisición de imagen que está relacionada con la zona pelúcida PZ se puede realizar con un microscopio de laboratorio. Para los fines de la presente invención, la imagen que se va a adquirir tiene una resolución y definición tal como para permitir una detección de detalles de la propia zona pelúcida PZ. Preferiblemente, la imagen tiene una resolución de al menos 1000 X 1000 puntos.

En unas realizaciones del presente método, también se pueden proporcionar etapas adicionales de procesamiento de la imagen adquirida, como, por ejemplo, una etapa de filtrar la propia imagen. Meramente a modo de ejemplo, una etapa de filtrado puede tener como objeto detectar y eliminar la imagen adquirida, por ejemplo, de células, corpúsculos proximales con respecto a la zona pelúcida PZ, por lo general de unas dimensiones mucho más pequeñas que las del ovocito o embrión de interés. Tal etapa se puede llevar a cabo mediante un filtrado de "crecimiento de regiones", es decir, técnicas que permiten examinar las proximidades de una estructura de interés incluyendo o excluyendo de la misma los diversos elementos con forma de punto analizados en función de un patrón de homogeneidad que está relacionado con su intensidad.

Además, la imagen adquirida también se puede someter a normalizaciones y a calibraciones geométricas con el fin de mejorar su calidad. Desde esta perspectiva, se pueden proporcionar una o más etapas de normalización de la imagen adquirida. A modo de ejemplo no limitante, la normalización puede ser una normalización geométrica, que se realiza en relación con una imagen de referencia y cuyo objeto es eliminar, por ejemplo, cualquier deformación óptica que sea introducida en la imagen por el sistema de adquisición. De acuerdo con lo que se describe en el presente documento, preferiblemente la imagen de referencia es un patrón geométrico conocido que está asociado con el tipo de dispositivo que se usa para la adquisición.

La etapa de normalización también puede ser de tipo radiométrico, es decir, tener como objeto eliminar desequilibrios cromáticos, de contraste o de luminosidad, así como componentes de ruido presentes en la imagen adquirida. Tal normalización radiométrica se puede realizar mediante un reequilibrado automático de los componentes, por ejemplo, el color, la luminosidad, el contraste a unos valores convencionales para la tipología de imagen de interés, y también mediante algoritmos de filtrado espectral para la reducción de ruido, que se van a aplicar, de forma opcional, en un modo "adaptativo", o de forma heterogénea y específica en diferentes áreas de la imagen.

A partir de dicha imagen adquirida, es posible reconocer un borde exterior y un borde interior de la zona pelúcida PZ. En particular, tal como se muestra en la figura 2B, el borde exterior a se corresponde con un borde distal de la zona pelúcida PZ con respecto a la estructura biológica, tal como, por ejemplo, un blastocisto, mientras que el borde interior b se corresponde con un borde proximal de la zona pelúcida PZ con respecto al mismo blastocisto. Además, los bordes exterior a e interior b singularizados se pueden identificar mejor mediante etapas específicas adicionales al método en cuestión.

Tras singularizar dicho borde interior b y exterior a, la siguiente etapa consiste, de forma respectiva, en extraer, de los bordes exterior a e interior b, unos primeros puntos y unos segundos puntos. En general, la etapa de extraer dichos puntos consiste en etiquetar los puntos (marcas puntuales pequeñas) de una imagen digital, que se limita en este caso a los bordes que se han indicado en lo que antecede, en los que se observa un cambio en la intensidad luminosa, con el fin de describir la morfología de la imagen. Tal extracción se puede realizar con el uso de métodos que se desarrollan a este efecto, preferiblemente con métodos de detección de bordes. Tal como se muestra en la figura 2C, la interpolación de los primeros puntos que se extraen a partir del borde exterior a posibilita determinar y singularizar un polígono exterior A y, de forma similar, tal como se muestra en la figura 2C, la interpolación de los segundos puntos que se extraen en el borde interior b determina un polígono interior B.

Tras la determinación de los polígonos A y B, en una o en ambas de las mismas se singularizarán y se definirán una pluralidad de puntos de referencia  $R_i$ . En particular, tal como se ejemplifica en la figura 2D, los puntos de referencia i se definen en función de una relación geométrica que existe entre los mismos. A modo de ilustración no limitante, dicha relación geométrica puede ser función de un ángulo  $\beta_i$  formado entre una semilínea s, que pasa por cada punto de referencia  $R_i$ , y un baricentro c del polígono interior B, y una línea de referencia r que pasa por dicho baricentro c. El baricentro c se calcula de antemano y, tal como acaba de mencionarse, está relacionado con el polígono interior B. La línea de referencia r puede ser cualquier línea que pase por el baricentro c cuya definición permite identificar los valores del ángulo  $\beta_i$  a través de los cuales los diversos puntos de referencia i se encuentran en una relación geométrica.

El número N de puntos de referencia Ri (con i variando de 1 a N) puede variar de forma notable, y será evidente que, cuanto mayor sea su número, más preciso será el cálculo del factor de forma y, por lo tanto, la indicación acerca de la uniformidad del espesor de la zona pelúcida.

5 A modo de ilustración no limitante, se calcula, en cada punto de referencia Ri, una distancia a correspondiente entre los dos polígonos A y B, obteniendo de este modo, para N puntos de referencia Ri, un conjunto de N distancias. En particular, haciendo referencia a la figura 2D, la distancia entre los polígonos A y B se calcula como una longitud de un segmento z en la semilínea s, que se origina en el baricentro c del polígono interior B y que pasa por el punto de referencia Ri, que está comprendido entre el polígono interior B y el polígono exterior A.

10 El conjunto de distancias, es decir, las longitudes de los segmentos zi, se utilizan subsiguientemente para construir, en un plano cartesiano, una línea de trazo discontinuo que representa dicho conjunto de distancias como una función de la relación geométrica. De acuerdo con una realización preferida que se ilustra en la figura 2E, la representación del conjunto de distancias tiene lugar en un plano cartesiano en coordenadas polares, como una función de un parámetro angular βi que se define para cada punto Ri como el ángulo que está comprendido entre la semilínea s, que pasa por el baricentro c y el punto Ri, y una línea de referencia r que pasa por dicho baricentro c. En la realización preferida, en la que la relación geométrica es una función del ángulo βi, la línea de trazo discontinuo se singulariza, por lo tanto, en un plano cartesiano mediante unos puntos pi cuya distancia desde el origen de los ejes se corresponde, para cada uno de los mismos, con las distancias z individuales, y los ángulos con los valores relacionados del ángulo βi, que se define tal como se ha descrito en lo que antecede. A continuación, a partir de una conexión gráfica de unos puntos pi subsiguientes, se construye una línea de trazo discontinuo, de la cual, además, se calcula la longitud L. Debido a lo que se mencionó en lo que antecede, la línea de trazo discontinuo es, por lo tanto, una secuencia de N segmentos, comprendido cada uno entre dos puntos pi sucesivos en el plano cartesiano, y que tendrá un número N de vértices v que se corresponde con el número de los mismos puntos pi tal como se muestra en la figura 2E.

25 En cada uno de tales vértices vi se calcula una curvatura local, apta para aproximar la línea de trazo discontinuo dentro de las proximidades de cada vértice vi o punto pi. El resultado final de dicha operación es un conjunto de curvaturas locales k(i), conjunto formado, por lo tanto, por N curvaturas locales que se calculan, debido a lo que se mencionó en lo que antecede, en N vértices vi.

En una realización preferida del presente método, la curvatura local se calcula de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$k(i) = \frac{\dot{x}(i)\ddot{y}(i) - \ddot{x}(i)\dot{y}(i)}{[\dot{x}(i)^2 + \dot{y}(i)^2]^{3/2}}$$

35 en la que

i, que varía de 0 a N, indica dichos vértices vi de la línea de trazo discontinuo que se corresponden con los puntos de referencia Ri,  
 40 (x(i), y(i)) representa las coordenadas cartesianas de cada uno de dichos vértices vi,  
 (ẋ(i), ẏ(i)), representa la primera derivada de la curva en cada uno de dichos vértices vi,  
 (ẍ(i), ÿ(i)) representa la segunda derivada de la curva en cada uno de dichos vértices vi.

45 En lo que respecta al cálculo del factor de forma Ψ de acuerdo con el método que se describe en el presente documento, que permite obtener una indicación que está relacionada con la uniformidad del espesor de la zona pelúcida, este se calcula finalmente como una función de la longitud L de la línea de trazo discontinuo, así como del conjunto de curvaturas locales k(i).

50 En una realización preferida del presente método, el factor de forma Ψ se calcula a través de la fórmula:

$$\Psi(\alpha) = (L^\alpha / N) \sum_{i=0}^{N-1} k(i)^\alpha$$

55 Esta fórmula identifica una familia de funciones en las que α es un factor que identifica una función particular de la familia, L es la longitud de dicha línea de trazo discontinuo tal como se ha definido en lo que antecede, y N es el número de dichos puntos de referencia Ri de la línea de trazo discontinuo. En una realización particularmente preferida de la invención, α es α = 2 y N es mayor que 800.

La información de la uniformidad del espesor de la zona pelúcida representa un parámetro morfológico que, tal como ya se ha indicado en lo que antecede, se usa en la práctica clínica, por ejemplo, en técnicas de reproducción asistida

(RA) para evaluar las características del ovocito, del cigoto, del embrión, con el objeto de indicar una probabilidad de un resultado positivo del procedimiento de RA. Se deduce que el factor de forma  $\Psi$  que se calcula de acuerdo con el método que se describe en el presente documento puede ser usado por especialistas, tales como, por ejemplo, médicos y biólogos, como un parámetro de evaluación en el ámbito clínico.

5 Por lo tanto, un objeto de la presente descripción es también un método para evaluar la uniformidad del espesor de la zona pelúcida de una célula a través de un factor de forma  $\Psi$  que se calcula con el método anterior. En una realización del método que se ha definido al presente fin, dicha evaluación también se puede llevar a cabo mediante el uso de un ordenador. Preferiblemente, para los fines del método de evaluación, el factor de forma  $\Psi$  se calcula a  
10 través de la fórmula que se ha definido en lo que antecede

$$\Psi(\alpha) = (L^\alpha / N) \sum_{i=0}^{N-1} k(i)^\alpha$$

15 Para verificar la fiabilidad del cálculo del factor de forma  $\Psi$  para los fines del método de evaluación, se realizaron diversos análisis experimentales en los que, para un grupo de imágenes digitales de embriones para las cuales era conocido el resultado del procedimiento de RA (es decir, sin embarazo, aborto, parto), se calculó el factor de forma  $\Psi$  tal como se describe en la presente descripción. Los resultados de la experimentación posibilitaron singularizar los valores del factor de forma  $\Psi$  con respecto a los cuales es posible indicar o no indicar la uniformidad del espesor de la zona pelúcida.

20 En particular, a modo de ejemplo no limitante, mediante la aplicación de la fórmula anterior para  $\alpha = 2$ , un valor del factor de forma  $\Psi$  más bajo que  $18-19 \times 10^3$  es indicativo de una uniformidad sustancial del espesor de la zona pelúcida. Por el contrario, para valores del factor de forma  $\Psi$  con  $\alpha = 2$  marcadamente más altos que  $18-19 \times 10^3$ , se detecta una uniformidad baja significativa del espesor de la zona pelúcida.

25 Unos resultados adicionales de la experimentación indicaron una correlación sustancial entre la falta de uniformidad del espesor de la zona pelúcida, calculada tal como se ha descrito en lo que antecede, y la probabilidad de un resultado positivo del procedimiento de RA (parto).

30 En particular, los embriones con un valor del factor de forma  $\Psi$  para  $\alpha = 2$  mayor que  $18-19 \times 10^3$  (una uniformidad baja del espesor de la zona pelúcida), entrañan unas probabilidades sensiblemente más grandes de un resultado positivo del procedimiento de RA (parto) con respecto a los embriones con un valor del factor de forma  $\Psi$  para  $\alpha = 2$  más bajo que dicho umbral  $18-19 \times 10^3$ , (una uniformidad sustancial del espesor de la zona pelúcida).

35 Los hallazgos de la experimentación resaltan adicionalmente cómo la evaluación del factor de forma  $\Psi$ , conjuntamente con la clasificación de otros aspectos morfológicos del embrión de acuerdo con procedimientos de evaluación adoptados por médicos y biólogos, pueden proporcionar una correlación más precisa con las probabilidades de un resultado positivo del procedimiento de RA (parto).

40 Un objeto de la presente descripción es también un programa informático que es apto para implementar un método para calcular un factor de forma indicativo de la uniformidad de la zona pelúcida de una estructura biológica tal como se ha definido en lo que antecede, cuando se está ejecutando en un ordenador.

45 El mismo programa también puede implementar, evidentemente, un método para evaluar la uniformidad del espesor de la zona pelúcida de una estructura biológica tal como se ha descrito en lo que antecede.

50 La presente invención se ha descrito al presente fin con referencia a unas realizaciones preferidas de la misma. Se entiende que podrían existir otras realizaciones, cayendo todas ellas dentro del concepto de la misma invención, y comprendidas todas ellas dentro del alcance de protección de las reivindicaciones en lo sucesivo en el presente documento.

**REIVINDICACIONES**

1. Método para calcular un factor de forma indicativo de la uniformidad del espesor de la zona pelúcida de una estructura biológica, que comprende las siguientes etapas:

- adquirir una imagen digital que comprende dicha zona pelúcida;
- reconocer un borde exterior (a) y un borde interior (b) de dicha zona pelúcida, siendo dicho borde exterior y dicho borde interior, de forma respectiva, un borde distal y un borde proximal de dicha zona pelúcida con respecto a dicha estructura;

caracterizado por que este también comprende las siguientes etapas:

- extraer unos primeros puntos de dicho borde exterior,
- interpolar dichos primeros puntos determinando un polígono exterior A,
- extraer unos segundos puntos de dicho borde interior,
- interpolar dichos segundos puntos determinando un polígono interior B,
- definir una pluralidad de puntos de referencia (R<sub>i</sub>) que están geoméricamente relacionados entre los mismos en el polígono interior y/o en el polígono exterior;
- calcular, en cada uno de dichos puntos de referencia (R<sub>i</sub>), una distancia a correspondiente entre dichos polígonos, obteniendo de este modo un conjunto de distancias (z<sub>i</sub>);
- construir una línea de trazo discontinuo que representa dicho conjunto de distancias como una función de dicha relación geométrica;
- calcular una longitud (L) de dicha línea de trazo discontinuo,
- calcular, en cada vértice (v<sub>i</sub>) de dicha línea de trazo discontinuo, una curvatura local apta para aproximar dicha línea de trazo discontinuo, dentro de las proximidades del vértice (v<sub>i</sub>), obteniendo de este modo un conjunto de curvaturas (k(i))
- calcular dicho factor de forma (Ψ) de la zona pelúcida como una función de la longitud (L) de dicha línea de trazo discontinuo y de dicho conjunto de curvaturas (k(i)).

2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho factor de forma se calcula a través de la fórmula:

$$\Psi(\alpha) = (L^\alpha / N) \sum_{i=0}^{N-1} k(i)^\alpha$$

que identifica una familia de funciones en las que,

- L es la longitud de dicha línea de trazo discontinuo,
- N es el número de dichos puntos de referencia (R<sub>i</sub>) o los vértices (v<sub>i</sub>) de dicha línea de trazo discontinuo,
- k(i) es una curvatura local,
- α es un factor que identifica una función particular de la familia.

3. Método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que α es α = 2 y N es mayor que 800.

4. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha curvatura local se calcula a través de la fórmula:

$$k(i) = \frac{\dot{x}(i)\ddot{y}(i) - \ddot{x}(i)\dot{y}(i)}{[\dot{x}(i)^2 + \dot{y}(i)^2]^{3/2}}$$

en la que

- (i), que varía de 0 a N, indica los vértices de dicha línea de trazo discontinuo que se corresponden con los puntos de referencia (R<sub>i</sub>)
- (x(i), y(i)) representa las coordenadas cartesianas de cada uno de dichos vértices,
- ( $\dot{x}(i)$ ,  $\dot{y}(i)$ ) representa la primera derivada de la curva en cada uno de dichos vértices,
- ( $\ddot{x}(i)$ ,  $\ddot{y}(i)$ ) representa la segunda derivada de la curva en cada uno de dichos vértices.

5. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dichas etapas de extraer dichos primeros puntos del borde exterior (a) y dichos segundos puntos del borde interior (b) se realizan a través de métodos de detección de bordes.

6. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende adicionalmente una etapa de calcular un baricentro (c) de dicho polígono interior (B).
- 5 7. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicha relación geométrica es una función de un ángulo  $\beta_i$  formado entre
- una semilínea que pasa por cada uno de dichos puntos de referencia ( $R_i$ ) y dicho baricentro (c), y
  - una línea de referencia r que pasa por dicho baricentro.
- 10 8. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicha distancia ( $z_i$ ) entre los polígonos se calcula como una longitud de un segmento de dicha semilínea que está comprendido entre el polígono interior B y el polígono exterior A.
- 15 9. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende adicionalmente una etapa de filtrar dicha imagen adquirida.
10. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende adicionalmente una etapa de normalizar dicha imagen adquirida.
- 20 11. Método de acuerdo con la reivindicación 10, en el que dicha normalización es una normalización geométrica que se realiza con respecto a un patrón geométrico.
12. Método de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, en el que dicha normalización es una normalización radiométrica.
- 25 13. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que dicha imagen tiene una resolución de al menos 1000 X 1000 puntos.
- 30 14. Método para evaluar la uniformidad del espesor de la zona pelúcida de una estructura biológica a través de un factor de forma calculado con un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.
15. Método de acuerdo con la reivindicación 14, en el que dicho factor de forma se calcula con un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 13.
- 35 16. Método de acuerdo con la reivindicación 15, en el que, para  $\alpha = 2$ , un valor de factor de forma mayor que  $18-19 \times 10^3$  es indicativo de una uniformidad baja del espesor de la zona pelúcida.
- 40 17. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, en el que dicha estructura biológica es un óvulo, un cigoto o un embrión.
18. Programa informático, almacenado en un medio de almacenamiento, apto para implementar un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, cuando se está ejecutando en un ordenador.

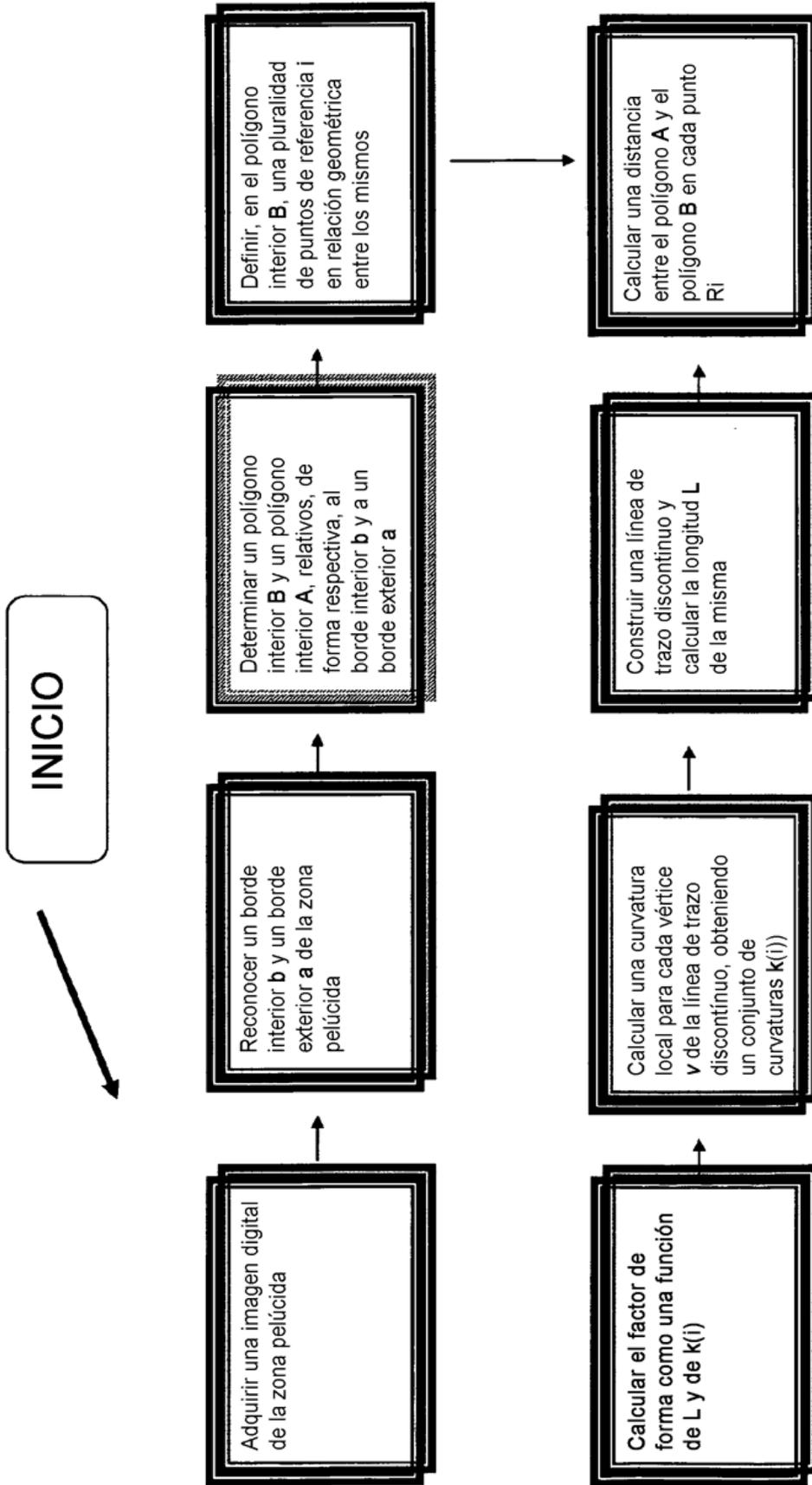


FIGURA 1

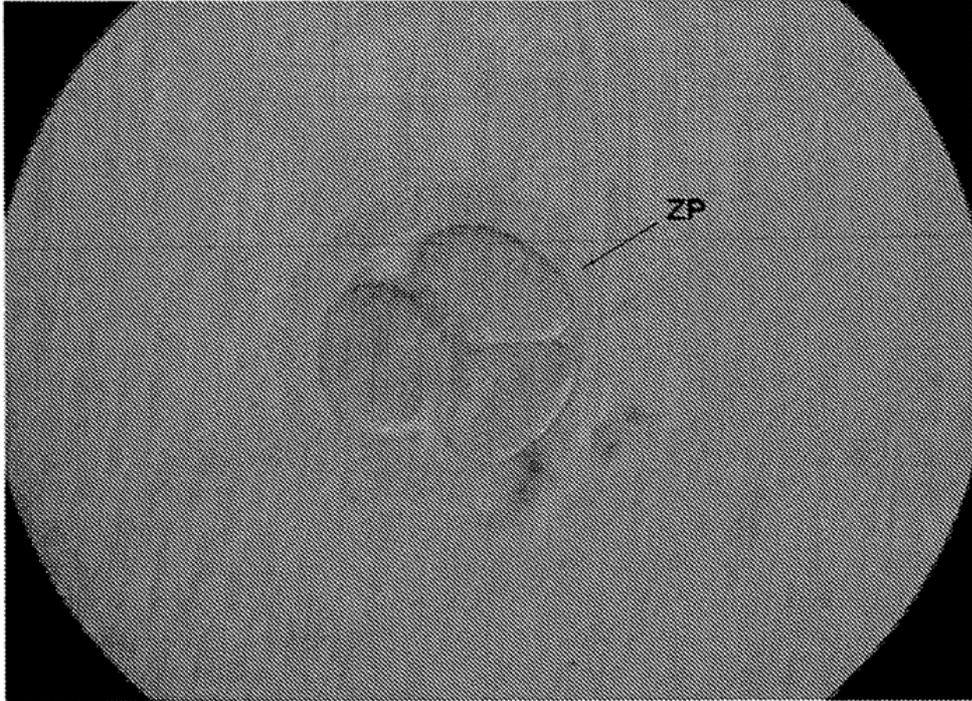


FIGURA 2A

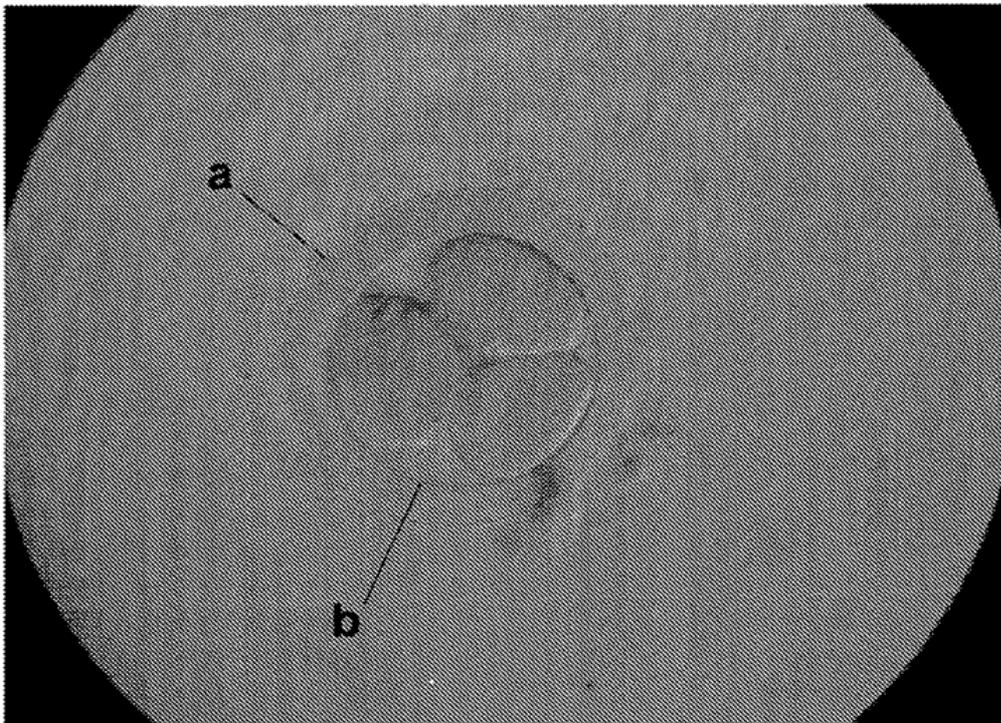


FIGURA 2B

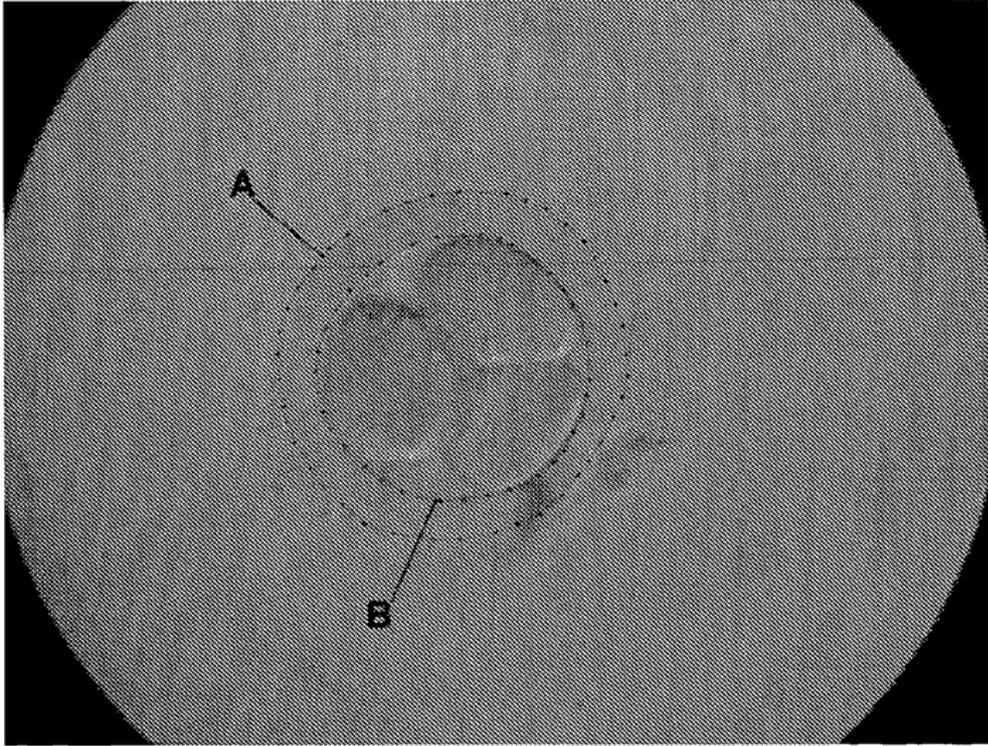


FIGURA 2C

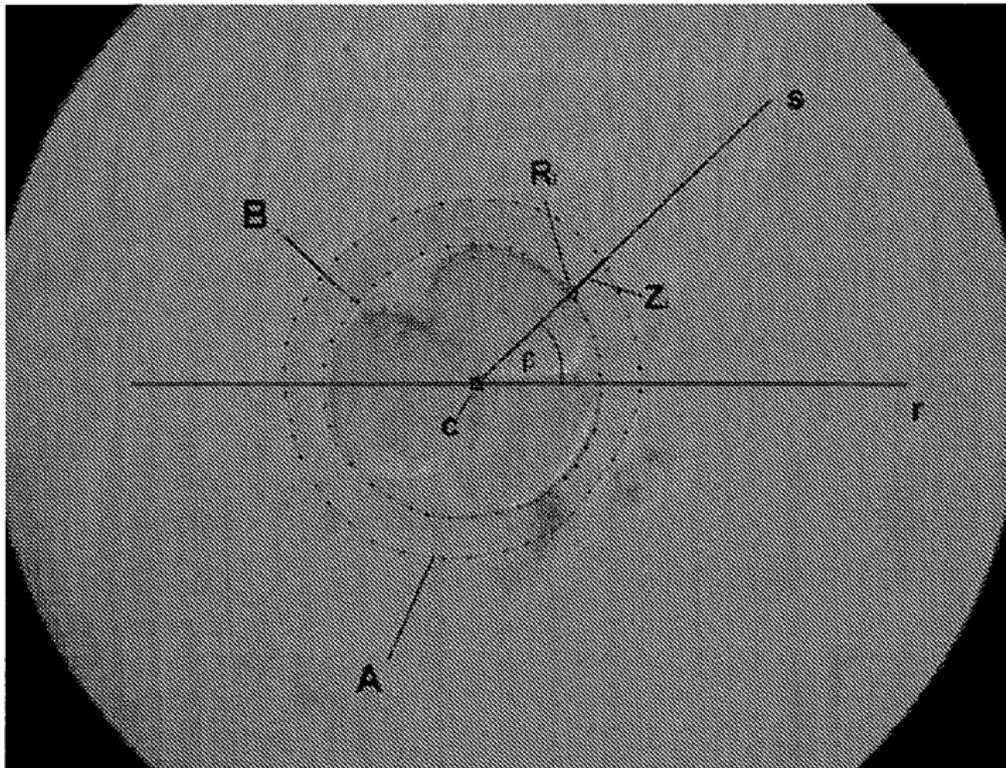


FIGURA 2D

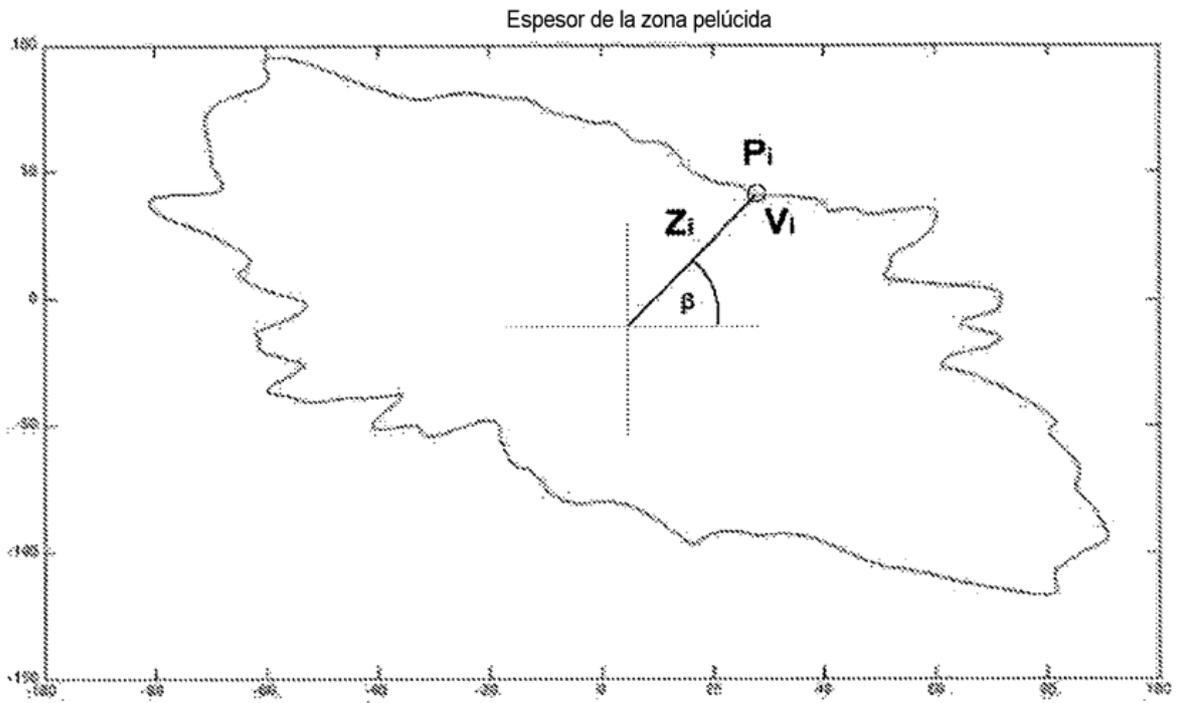


FIGURA 2E