

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 618 831**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50	(2006.01)
G01N 33/483	(2006.01)
C12N 5/073	(2010.01)
C12M 3/00	(2006.01)
C12M 1/00	(2006.01)
C12M 1/34	(2006.01)
A61D 19/04	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.06.2012 PCT/GB2012/051533**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **10.01.2013 WO2013005012**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.06.2012 E 12735601 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.12.2016 EP 2726865**

54 Título: **Métodos para predecir la viabilidad de un embrión de mamífero**

30 Prioridad:

01.07.2011 US 201161503827 P
20.12.2011 US 201161577860 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.06.2017

73 Titular/es:

CAMBRIDGE ENTERPRISE LIMITED (100.0%)
The Old Schools Trinity Lane
CambridgeCambridgeshire CB2 1TN, GB

72 Inventor/es:

ZERNICKA-GOETZ, MAGDALENA;
AJDUK, ANNA y
GRAHAM, CHRIS

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 618 831 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

Métodos para predecir la viabilidad de un embrión de mamífero

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a métodos para valorar el potencial de desarrollo de un embrión de mamífero, a métodos de selección o clasificación de embriones entre una pluralidad de embriones según su potencial de desarrollo previsto, y a métodos de fecundación *in vitro* (FIV) y reproducción asistida. También se proporciona un sistema para llevar a cabo los métodos de la invención.

Antecedentes de la invención

Actualmente existe la necesidad de unos medios mejores de valorar la vitalidad de embriones para el trasplante en la madre aspirante en clínicas de FIV. El patrón general ha sido para valorar el grado del desarrollo a los 3 días y para usar esto como indicador del probable éxito de posterior desarrollo y, por lo tanto, el embarazo. La falta de fiabilidad de esta valoración ha conducido a un número creciente de clínicas de FIV para cultivar embriones hasta la fase de blastocisto (6 días) de manera que se pueden usar directamente blastocistos aparentemente sanos. No solo es este planteamiento costoso, sino que hay riesgos inevitables a partir del cultivo *in vitro* a largo plazo hasta la fase de blastocisto.

Se han caracterizado los sucesos tempranos en un embrión después de la fecundación de un óvulo. En cigotos de mamífero, la entrada del espermatozoide está ligada a la reorganización del citoesqueleto, gránulos corticales⁷, retículo endoplasmático⁸ y mitocondria⁹. La entrada del espermatozoide causa cambios en la forma del cigoto: formación del segundo cuerpo polar (PB); protrusión del cono de fecundación (FC) por encima de la cromatina del espermatozoide^{17,18}; y aplanamiento del cigoto a lo largo del eje que corta el FC¹⁹. La fecundación de mamífero también desencadena oscilaciones del Ca²⁺ citoplasmático libre entre la finalización de la meiosis y la entrada en interfase del primer ciclo celular embrionario¹⁰. Las oscilaciones de Ca²⁺ regulan no solamente los sucesos inmediatamente después de la fecundación¹¹⁻¹⁴, sino también se informa de que afectan a aspectos del desarrollo post-implantación^{12,15,16}. Se ha informado que tanto el citoesqueleto de actina funcional como el patrón correcto de transiciones de Ca²⁺ (especialmente el tiempo total de la elevación de Ca²⁺) son cruciales para el desarrollo^{12, 15, 16, 37-39}.

En algunos organismos se han descrito los movimientos citoplasmáticos desencadenados por la entrada del espermatozoide. En erizos de mar, ascidias y ranas, por ejemplo, se sabe que están asociados a el progreso con éxito de los sucesos de desarrollo, tal como el establecimiento de la polaridad del embrión¹⁻⁶. Se han detectado algunos movimientos citoplasmáticos en el óvulo de ratón fecundado²⁰.

La solicitud de patente europea EP 1 847 595 A1 revela un método *in vitro* de valoración del potencial de desarrollo de un embrión de mamífero, basado en el nivel medido de un marcador (tal como p53, Cav1.2 o catalasa) en el medio de cultivo.

La solicitud de patente americana US 2010/099135 A1 revela un método *in vitro* de valoración del potencial de desarrollo de un embrión de mamífero, basado en un perfil de proteínas secretadas.

La solicitud de patente internacional WO 2011/025736 A1 revela un método *in vitro* de valoración del potencial de desarrollo de un embrión de mamífero, basado en la duración de los sucesos de citocinesis.

A pesar de esta caracterización de los sucesos que se dan en el embrión inmediatamente después de la fecundación, la valoración del grado del desarrollo de los embriones después de un periodo de cultivo sigue el método preferido y estándar de la valoración de la calidad del embrión.

Compendio de la invención

Los presentes inventores han caracterizado los movimientos citoplasmáticos desencadenados por la entrada del espermatozoide en óvulos de ratón. También han identificado cambios periódicos en la forma del embrión que se dan después de la fecundación. Han descubierto que las dinámicas de estos movimientos se pueden usar para predecir de manera fiable el posterior éxito de desarrollo del embrión.

En un primer aspecto, la invención proporciona un método *in vitro* de valoración del potencial de desarrollo de un embrión de mamífero, comprendiendo el método

- (a) tomar mediciones de los movimientos citoplasmáticos en el embrión (y opcionalmente de los cambios periódicos en la forma del embrión) en la fase de una célula, y
- (b) usar las mediciones para predecir el potencial de desarrollo del embrión.

Una característica importante de este método es que usa mediciones tomadas a partir de las fases más tempranas del desarrollo del embrión después de la fecundación y antes de la primera división celular embrionaria. Por tanto, el método proporciona un modo ventajosamente temprano y rápido de valorar la calidad de un embrión y el probable posterior éxito de desarrollo.

5 Los inventores han identificado una correlación significativa entre los parámetros en relación con la velocidad promedio de los movimientos citoplasmáticos en embriones de ratón en la fase de una célula e indicadores del posterior éxito de desarrollo.

10 Los inventores han observado distintos picos periódicos en la velocidad promedio del movimiento citoplasmático, referidos en el presente documento como "picos de velocidad" en embriones de ratón después de la fecundación. Han encontrado que la longitud del intervalo entre los picos de velocidad es predictiva del éxito de desarrollo del embrión. Intervalos más largos entre picos de velocidad se correlacionan con mayor éxito de desarrollo.

15 En algunos casos de acuerdo con el método de la invención, el potencial de desarrollo de un embrión se predice midiendo la velocidad citoplasmática media en el embrión en la fase de una célula durante un periodo de tiempo que es suficiente para identificar dos picos de velocidad sucesivos y calcular el intervalo en tiempo entre los dos picos de velocidad. Un intervalo más largo o un intervalo promedio más largo entre picos de velocidad se puede correlacionar con una predicción de mayor potencial de desarrollo. En algunos casos, un intervalo más corto o un intervalo promedio más corto entre picos de velocidad se puede correlacionar con una predicción de mayor potencial de desarrollo. En algunos casos, el potencial de desarrollo del embrión se predice comparando el intervalo o el intervalo promedio entre picos de velocidad con uno o más valores de referencia predeterminados.

20 Cuando se forma el cono de fecundación del embrión, los picos de velocidad coinciden con cambios periódicos en la forma del embrión. Muy sorprendentemente, los picos de velocidad coinciden con pulsaciones del cono de fecundación (pulsaciones del FC). Por lo tanto, los cambios periódicos en la forma del embrión tal como las pulsaciones del FC también pueden ser predictivos del potencial de desarrollo.

30 Un segundo parámetro que se correlaciona significativamente con el éxito del desarrollo es la velocidad citoplasmática basal promedio. Esta es la velocidad promedio antes de que se registre el primer pico de velocidad, entre los picos de velocidad y/o después del último pico de velocidad registrado. Los inventores han encontrado que la velocidad citoplasmática basal promedio es predictiva del éxito de desarrollo del embrión. Una velocidad citoplasmática basal promedio más rápida se correlaciona con mayor éxito de desarrollo.

35 En algunos casos de acuerdo con el método de la invención, el potencial de desarrollo de un embrión se predice midiendo la velocidad citoplasmática basal promedio en el embrión antes de que se registre el primer pico de velocidad, entre los picos de velocidad y/o después del último pico de velocidad distinto registrado. Una velocidad citoplasmática basal promedio más rápida se puede correlacionar con una predicción de mayor potencial de desarrollo. En algunos casos, una velocidad citoplasmática basal promedio más lenta se puede correlacionar con mayor potencial de desarrollo. En algunos casos, el potencial de desarrollo del embrión se predice comparando la velocidad citoplasmática basal promedio con uno o más valores de referencia predeterminados.

40 La predicción del potencial de desarrollo se puede mejorar usando ambos de estos parámetros juntos. En algunos casos de acuerdo con el método de la invención, la predicción del potencial de desarrollo se basa en tanto la longitud del intervalo entre picos de velocidad o pulsaciones de FC como la velocidad citoplasmática basal promedio. Estos parámetros se pueden haber calculado usando las mediciones de los embriones tomadas durante el mismo periodo de tiempo. En general, los inventores han encontrado que los embriones que se prevé que tienen alto o bajo potencial de desarrollo basándose en la longitud de sus intervalos inter-pico correspondientemente también se prevé que tienen alto o bajo potencial de desarrollo basándose en su velocidad citoplasmática basal promedio. Es decir, las predicciones basadas en estos dos parámetros tienen a corresponder.

55 El método de la invención ofrece un modo rápido de predecir la vitalidad de los óvulos fecundados *in vitro* en una fase temprana después de la fecundación, es decir, antes de la primera división celular embrionaria, y, por lo tanto, podría mejorar las perspectivas para el tratamiento de la fecundación *in vitro* (FIV).

60 En un aspecto adicional la invención proporciona un método de fecundación *in vitro*, que comprende la fecundación de un óvulo de mamífero y la prediciendo del potencial de desarrollo del embrión resultante usando mediciones de los movimientos citoplasmáticos en el embrión (y opcionalmente también de los cambios periódicos en la forma del embrión) en la fase de una célula. Los óvulos fecundados *in vitro* previsto por tener buen potencial de desarrollo se pueden, por ejemplo, seleccionar para transferirse a un receptor materno, mejorando de ese modo los índices de embarazo con éxito.

65 En algunos casos la calidad absoluta de un embrión dado es de menos importancia que la calidad relativa de los embriones en un grupo de embriones, por ejemplo, los embriones desarrollados a partir de óvulos obtenidos de la misma madre.

Un aspecto adicional de la invención proporciona un método de selección a partir de una pluralidad de embriones uno o más embriones para su uso en un método de reproducción asistida, comprendiendo el método la predicción del potencial de desarrollo de cada embrión usando mediciones de los movimientos citoplasmáticos en el embrión (y opcionalmente también de los cambios periódicos en la forma del embrión) en la fase de una célula, y la selección de uno o más embriones basándose en su potencial de desarrollo previsto. Otros factores también se pueden tomar en cuenta cuando se seleccionan el(los) embrión(es).

Otro aspecto de la invención proporciona un método de clasificación de uno o más embriones en una población de embriones según su potencial de desarrollo, comprendiendo el método la predicción del potencial de desarrollo de cada embrión usando mediciones de los movimientos citoplasmáticos en el embrión (y opcionalmente también de los cambios periódicos en la forma del embrión) en la fase de una célula, y la clasificación de cada embrión basándose en su potencial de desarrollo previsto. Se pueden seleccionar más uno o más embriones para su uso en un método de reproducción asistida basándose en su potencial de desarrollo previsto.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un sistema para llevar a cabo el método de la invención, comprendiendo el sistema uno o más sensores para capturar imágenes secuenciales de los embriones y al menos un procesador en comunicación con el al menos un sensor, estando el procesador programado con instrucciones legibles por ordenador para transformar dichas imágenes en una predicción del potencial de desarrollo del embrión llevando a cabo un método como se describe en el presente documento.

A continuación, la invención se describirá con más detalle, a modo de ejemplo y no limitación, en referencia a los dibujos acompañantes. Muchas modificaciones y variaciones equivalentes serán obvias para los expertos en la técnica cuando se ofrezca esta descripción. Por lo tanto, las realizaciones de la invención, descritas a modo de ejemplo, se considera que son ilustrativas y no limitantes.

La presente invención incluye la combinación de los aspectos y las características preferidas descritas excepto cuando tal combinación es claramente no permisible o está indicada para ser expresamente evitada.

Los títulos de sección usados en el presente documento son solamente por conveniencia y no están contruidos de ningún modo como limitantes.

Las referencias a color en las figuras son únicamente informativas. No hay figuras a color.

Descripción de los dibujos

Fig. 1

Oscilaciones de la velocidad citoplasmática en óvulos de ratón fecundados

(a) Esquema del algoritmo de análisis de imagen de correlación cruzada usado para medir el movimiento del citoplasma celular (descripción detallada en Métodos). (b) Una representación esquemática de las fases analizadas: MII: óvulos no fecundados en metafase de la 2^o división meiótica. Fase 1: se forma 2PB y aparece primero FC. Fase 2: FC está completamente formado. Fase 3: FC retrocede y se forman los pronúcleos. (c) Velocidad citoplasmática media en un óvulo no fecundado representativo. (d) Velocidad citoplasmática media en un cigoto fecundado *in vivo* representativo durante las Fases 1 a 3. (e) Imágenes DIC con patrones del vector representativos para los óvulos no fecundados (MII) y para cigotos en la Fase 1 a 3. Por claridad solamente se muestra cada segundo vector. La longitud de los vectores y el color del fondo indican la velocidad del movimiento citoplasmático local. Barra de escala 10 μ m.

Fig. 2

Los picos de velocidad citoplasmática dependen de los cambios en el citoesqueleto de actomiosina en la región del FC

(a) Imágenes DIC del cigoto con un FC palpitante: el FC (marcado con un asterisco) sufre protrusión y se aplasta de un modo repetitivo. Barra de escala 20 μ m (b) Picos de la velocidad citoplasmática media en el óvulo de ratón fecundado (azul/línea de abajo) se correlacionan con el comiendo de un descenso en el diámetro de FC (verde/línea de arriba). El diámetro de FC se midió como se muestra en (a) a partir del punto de simetría máxima en el borde del FC hasta el otro borde de la célula. (c) Cambio en el diámetro de FC (medido como una diferencia entre diámetro de FC inmediatamente antes del pico de velocidad y en el momento cuando el pico de velocidad alcanza su máximo) se correlaciona con la amplitud del pico de velocidad acompañante. El coeficiente de correlación de Pearson calculado para estas mediciones es de 0,595 y es estadísticamente significativo ($p < 0,0001$). (d) Intensidad de fluorescencia de UtrCH-EGFP en la corteza del FC (azul/línea de abajo) fluctúa cuando FC cambia su forma (mostrado por los cambios en el diámetro de FC (rojo/línea de arriba)). Los valores de intensidad están representados como una relación entre la fluorescencia de UtrCH-EGFP y Gap43-RFP (una proteína de membrana), para eliminar los cambios de intensidad causados por cambios en el foco (véase Métodos para los detalles). Los asteriscos muestran los extremos de la región cortical en los que se midieron las intensidades de UtrCH-EGFP y Gap43-RFP. Barra de escala 10 μ m. (e) La intensidad de fluorescencia de MyoRLC-GFP en el hombro inferior y superior del FC

(línea azul y línea azul con cruces, respectivamente) fluctúa cuando que FC cambia su forma (mostrado por cambios en el diámetro de FC (rojo)). Los valores de intensidad están representados como una relación entre la fluorescencia de UtrCH-EGFP y Gap43-RFP. Los asteriscos marcan las regiones en las que se midieron las intensidades de MyoRLC-GFP y Gap43-RFP. Barra de escala 10 μm . **(f)** Velocidad citoplasmática media en cigotos representativos tratados con nocodazol (línea azul (de arriba)), citocalasina D (línea roja (de abajo)) y ML-7 (línea verde (del medio)). **(g)** Velocidad citoplasmática media en cigotos representativos tratados con taxol (línea azul (de arriba)) y jasplakinolida (línea roja (de abajo)). El pico visible a aproximadamente 90 min es debido a un cambio en foco.

Fig. 3

Los picos de velocidad citoplasmática dependen de las oscilaciones de Ca^{2+} libre

Picos de velocidad citoplasmática media (líneas azules/de abajo) y niveles de Ca^{2+} libre (línea verde/de arriba) en un óvulo fecundado representativo **(a)**, óvulo fecundado tratado con BAPTA-AM **(b)** y óvulo activado con SrCl_2 **(c)**. Cuando los óvulos se activaron con SrCl_2 , las transiciones de Ca^{2+} no estaban acompañadas ni siquiera de picos de velocidad pequeños (inserción en **(c)**). En todas las gráficas el incremento en el nivel de Ca^{2+} se reflejaba por un descenso en la intensidad de fluorescencia de FuraRed. Un pico en **(b)** era debido a un cambio en foco.

Fig. 4

Los picos de velocidad citoplasmática de alta amplitud dependen de la presencia del FC

La velocidad citoplasmática media (líneas azules/de abajo) y los niveles de Ca^{2+} libre (líneas verdes/ de arriba) en óvulos representativos sometidos a inyección intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI). Se inyectó una cabeza de espermatozoide fresco bajo la corteza **(a)** o en la parte central del citoplasma **(b)**. Se inyectó una cabeza de espermatozoide inactivada por calor bajo la corteza y, a continuación, el óvulo o bien se activó **(c)** o no se activó **(d)** con SrCl_2 . En los óvulos inyectados con cabezas de espermatozoide calentado y activados con SrCl_2 se presentaban frecuentemente pequeños picos de velocidad (inserción en **(c)**). En todas las gráficas se reflejaba el incremento en el nivel de Ca^{2+} por un descenso en la intensidad de fluorescencia de FuraRed.

Fig. 5

Movimientos citoplasmáticos como indicador para la viabilidad de embriones

Correlación entre velocidades basales medias **(a)** o intervalos inter-pico de velocidad medios **(b)** registrados en cigotos y el número de células en los embriones después de 4 días de cultivo. **(c)** Modelo matemático ajustado a los datos en **(a)**, que muestra la correlación lineal y cuadrática entre las velocidades basales medias y el número de células en los embriones de 4 días de vida con un ajuste para los diferentes valores de los intervalos inter-pico medios. El intervalo inter-pico medio +1 SD (línea superior), intervalo inter-pico medio +0,5 SD (segunda línea de abajo), intervalo inter-pico-medio (tercera línea de abajo), intervalo inter-pico medio -0,5 SD (cuarta línea de abajo), intervalo inter-pico medio -1 SD (línea inferior). **(d)** Modelo matemático ajustado a los datos en **(b)**, que muestra la correlación lineal entre los intervalos inter-pico medios y el número de células en los embriones de 4 días de vida con un ajuste para los diferentes valores de las velocidades basales medias. Intervalo inter-pico medio +1 SD (línea superior), intervalo inter-pico medio +0,5 SD (segunda línea de abajo), intervalo inter-pico medio (tercera línea de abajo), intervalo inter-pico medio -0,5 SD (cuarta línea de abajo), intervalo inter-pico medio -1 SD (línea inferior). La representación gráfica de los modelos en **(c)** y **(d)** se preparó para valores en el rango indicado con corchetes rojos en **(a)** y **(b)**, respectivamente. **(e)** Una gástrula (*egg cylinder*) (izquierda) y crías de 2 meses de vida (derecha) obtenidas de embriones valorados como "buenos" basándose en nuestro modelo. Actina marcada con faloidina en verde y Gata4 que marca el endodermo visceral en rojo. Barra de escala 50 μm . **(f)** Eficacia de las transferencias de embrión. Los embriones se valoraron como de "alta" o "baja calidad" según nuestro modelo, se transfirieron en la fase de 2 células a las hembras receptoras y se diseccionaron en 6,5 (columnas azules (sólidas)) o 19,5 dpc (columnas rojas (tramado)).

Fig. 6

Las oscilaciones de Ca^{2+} inducidas por PLC ζ e ICSI en ovocitos humanos están acompañadas de movimientos transitorios coincidentes en el citoplasma del ovocito. En A) se muestra un registro de los incrementos de Ca^{2+} intracelular medidos mediante la fluorescencia de Oregon Green BAPTA dextrano (OGBD) (unidades arbitrarias) y los correspondientes movimientos en el citoplasma medidos con PIV. Los trazos en B) muestran las fases iniciales de Ca^{2+} y PIV, respectivamente, a partir de otro ovocito que mostró un gran incremento de Ca^{2+} inicial con un descenso en el movimiento. Los picos marcados con * se muestran en una escala aumentada en la Fig. 7.

Fig. 7

Análisis de coincidencia de cambios de Ca^{2+} y movimiento citoplasmático. Estos paneles con una escala de tiempo aumentada son tomadas a partir del ovocito en la Fig. 6B. El primer pico de Ca^{2+} dura durante un largo periodo y se suprime el movimiento citoplasmático. Los últimos picos de Ca^{2+} se acortan y la magnitud media de movimiento en el pico de velocidad se incrementa a un máximo poco después del máximo de pico. En el caso ilustrado, el máximo de pico de velocidad se da 20 segundos después del máximo de Ca^{2+} . Indicar que la magnitud media de movimiento comienza a acelerar dentro del mismo intervalo de 10 segundos que el máximo de Ca^{2+} .

Fig. 8

Imágenes de un ovocito humano sobrepuestas con el patrón de movimiento citoplasmático. Cada mapa de vector registra el movimiento durante el intervalo de 10 segundos entre un marco cualquiera al próximo. Este par de mapas de vector se recogió con 20 segundos de separación e ilustran el cambio de la dirección de movimiento

sin alteración en la orientación del movimiento.

Fig. 9

Movimientos citoplasmáticos en el cigoto

La velocidad citoplasmática media en un cigoto fotografiado en un plano por encima del FC **(a)**, un plano que corta el FC **(c)** y un plano por debajo del FC **(e)**. **(b)**, **(d)** y **(f)** Velocidades citoplasmáticas en unos tiempos marcados por una flecha en **(a)**, **(c)** y **(e)** respectivamente. El color del fondo representa los valores locales de velocidad. FC visible a las 5 en punto. Barra de escala 10 μm . **(g)** Picos de velocidad registrados durante las primeras y segundas transiciones de Ca^{2+} en el óvulo inyectado con espermatozoide.

Fig. 10

Reorganización de actina en la corteza del cono de fecundación.

(a) Imágenes quietas de una película secuencial que muestra la reorganización de la actina (marcada con UtrCH-EGFP) en el FC. La intensidad de UtrCH-EGFP en la corteza de FC cambia de acuerdo con el cambio en la forma de FC. Cuando se aplanan el FC (comienzo del aplanamiento marcado con una línea roja) se debilita la intensidad de UtrCH-EGFP, marcación de F-actina. Cuando el FC comienza gradualmente a protruir, se incrementa de nuevo la intensidad de UtrCH-EGFP. Gap43-RFP sirvió como un marcador de membrana. Las imágenes se tomaron cada 20 s, se muestra cada 4ª imagen. **(b)** Imágenes aumentadas de la región cortical de FC indicada en **(a)**. Barra de escala 10 μm .

Fig. 11

Reorganización de miosina en la corteza del cono de fecundación.

(a) Imágenes quietas de una película secuencial que muestra la reorganización de miosina (marcada con MyoRLC-GFP) en el FC. La intensidad de MyoRLC-GFP en la corteza de los hombros de FC cambia de acuerdo con el cambio en la forma de FC. Cuando se aplanan FC (comienzo del aplanamiento marcado con una línea roja) se debilita la intensidad de MyoRLC-GFP. Cuando el FC comienza gradualmente a protruir, se incrementa de nuevo la intensidad de MyoRLC-GFP. Gap43-RFP sirvió como un marcador de membrana. Las imágenes se tomaron cada 20 s, se muestra cada 2ª imagen. **(b)** y **(c)** Imágenes aumentadas de la región cortical de FC indicada en **(a)** por los números 1 y 2 respectivamente. Barra de escala 10 μm .

Fig. 12

Efecto de la quelación de Ca^{2+} y los inhibidores de citoesqueleto sobre los microtúbulos y la actomiosina en cigotos de ratón.

Se transfirieron óvulos fecundados *in vitro* a los inhibidores cuando apareció la protuberancia de anafase. Las imágenes muestran proyecciones preparadas a partir de pilas Z (*z-stack*) confocales de cigotos representativos fijados inmediatamente después de 20 minutos de incubación previa con el fármaco (20 + 0 min) o 1,5 o 3 horas después (0 + 90 min y 0 + 180 min, respectivamente). Se examinaron los cigotos experimentales y control usando los mismos ajustes. La tinción con faloidina de cigotos tratados con jasplakinolida no consiguieron mostrar F-actina (tercer panel desde la parte inferior), debido a que jasplakinolida compite con faloidina por los mismos sitios de unión y, así, previene la apropiada tinción. La tinción con anticuerpo anti-actina reveló que jasplakinolida conduce a la formación de una capa cortical más espesa (2 panel inferior). La cromatina hembra indicada por f, la cromatina macho indicada por m. Barra de escala 10 μm .

Fig. 13

La toma de imagen DIG no afecta al desarrollo de los embriones de ratón.

(a) Modelo matemático que correlaciona la probabilidad de alcanzar la fase de blastocisto con velocidad basal media con un ajuste para los intervalos inter-pico medios. Intervalo inter-pico medio +1 SD (línea superior), intervalo inter-pico medio +0,5 SD (segunda línea de abajo), intervalo inter-pico medio (tercera línea de abajo), intervalo inter-pico medio -0,5 SD (cuarta línea de abajo), intervalo inter-pico medio -1 SD (línea inferior). **(b)** Modelo matemático que correlaciona la probabilidad de alcanzar la fase de blastocisto (es decir, ≥ 32 células) con intervalo inter-pico medio con un ajuste para la velocidad basal media. Intervalo inter-pico medio +1 SD (línea superior), intervalo inter-pico medio + 0,5 SD (segunda línea de abajo), intervalo inter-pico medio (tercera línea de abajo), intervalo inter-pico medio -0,5 SD (cuarta línea de abajo), intervalo inter-pico medio -1 SD (línea inferior). **(c)** Número medio de células en las imágenes de embriones de 4 días de vida en diferentes tiempos después de la fecundación. **(d)** Distribución de embriones de 4 días de vida con diferentes números de células en relación con el tiempo de formación pronuclear, **(e)** Número medio de células en embriones de 4 días de vida fotografiados o no en la fase de cigoto. **(f)** Distribución de embriones de 4 días de vida con diferentes números de células dependiendo de si son o no fotografiados en la fase de cigoto. las barras de error representan las desviaciones estándar. Los datos proceden de 13 experimentos independientes.

Fig. 14

Resolución subpíxel del método de PIV

La precisión de PIV para la medición de desplazamientos subpíxel de las imágenes artificialmente cambiadas y submuestreadas. **(a)** Error en píxeles. **(a)** Error como porcentaje del desplazamiento.

Descripción detallada de la invención

5 El término “embrión” es usado en esta memoria para referirse a un organismo mamífero a partir de la fase más temprana que comienza con un óvulo fecundado unicelular. Un óvulo se fecunda en la fusión con un espermatozoide. El óvulo puede haber sido fecundado *in vitro* para obtener el embrión. Los embriones unicelulares son células vivas.

10 Los métodos de la invención se pueden aplicar a embriones de cualquier especie de mamífero adecuada, tal como: primates, incluyendo seres humanos, grandes simios (por ejemplo, gorilas, chimpancés, orangutanes), monos del viejo mundo, monos del nuevo mundo; roedores (por ejemplo, ratones, ratas, cobayas, hámster); gatos; perros; lagomorfos (incluyendo conejos); vacas; ovejas; cabras; caballos; cerdos; y cualquier otro mamífero de ganado, agrícola, de laboratorio o doméstico. Aunque el trabajo descrito en los Ejemplos se lleva a cabo en ratones, los resultados preliminares indican que un mismo patrón de movimientos citoplasmáticos también se da en embriones unicelular humanos.

15 El “potencial de desarrollo”, de un embrión de mamífero es una medida de la calidad del embrión. Es una medida de la capacidad del embrión para desarrollarse posteriormente con éxito. El desarrollo con éxito puede ser durante un periodo de tiempo definido o bajo condiciones particulares, por ejemplo, después del crecimiento en cultivo o después de transferencia del embrión a un receptor materno. La transferencia a un receptor materno significa la transferencia de un embrión en una madre aspirante con el objetivo de un embarazo resultante. La madre puede ser el donante o la fuente de los óvulos (gametos femeninos) que dan origen al embrión o puede ser una madre subrogada.

20 Una predicción del potencial de desarrollo de un embrión es una predicción de la capacidad del embrión para desarrollarse posteriormente con éxito. Una predicción del potencial de desarrollo puede comprender una predicción de si el embrión tiene la capacidad de desarrollarse a una fase particular. Los ejemplos son una predicción de que un embrión alcanzará la fase de blastocisto si crece en cultivo, o que un embrión se desarrollará a la fase de gástrula o a término completo después de la transferencia del embrión al receptor materno. La predicción puede comprender una probabilidad determinada de que el embrión alcanzará una fase particular de desarrollo, o la probabilidad de que se alcanzará una fase particular del desarrollo dentro de un periodo de tiempo definido. Por ejemplo, la predicción puede definir la probabilidad de que un embrión alcanzará la fase de blastocisto después de 4 días de crecimiento en cultivo. No es necesario que el embrión se cultive posteriormente de acuerdo con la predicción. En su lugar, el embrión se puede transferir a un receptor materno. La predicción puede comprender una predicción de la fase de desarrollo que el embrión alcanzará después de un periodo de tiempo definido. Un ejemplo es una predicción del número de células que un embrión tendrá después de un periodo de tiempo en cultivo, por ejemplo, después de 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más días de crecimiento en cultivo.

30 En algunos casos la predicción del potencial de desarrollo está basado en las mediciones de los movimientos citoplasmáticos en el embrión y/o cambios periódicos en la forma del embrión solos. En otras realizaciones la predicción de la predicción de desarrollo se basa en estas mediciones junto con otros parámetros que son conocidos por ser predictivos del éxito del desarrollo. Por ejemplo, después de tomar mediciones de los movimientos citoplasmáticos y/o cambios periódicos en la forma del embrión en el embrión unicelular, el embrión posteriormente se puede cultivar y además usar el grado del desarrollo y/o morfología del embrión en cultivo en la valoración del potencial de desarrollo del embrión.

40 El término “movimiento citoplasmático” se refiere a las dinámicas de fluido del citoplasma. El citoplasma es la fase fluida en un embrión unicelular. No hay núcleo convencional en un óvulo no fecundado o fecundado hasta que se descondensa el complemento cromosómico haploide de la segunda división de la meiosis femenina y adquiere una envuelta nuclear y, para óvulos fecundados, hasta que la cromatina del espermatozoide llega a asociarse correctamente con histonas y se encapsula con una envuelta nuclear. Tal formación de los pronúcleos femeninos y masculinos son anteriores a la primera división celular embrionaria. Los movimientos citoplasmáticos descritos en el presente documento se dan hasta el momento de la formación de pronúcleos.

50 El término “promedio” tal como es usado en esta memoria se refiere a una medida de la tendencia central. “Promedio” abarca la media y la mediana.

55 La “velocidad citoplasmática promedio” significa la velocidad promedio en cualquier tiempo particular medida en un solo plano a través del embrión unicelular o en el propio citoplasma, por ejemplo, medido en una serie de planos a través de toda la célula.

60 Los inventores han mostrado que antes de la fecundación, el movimiento citoplasmático en un óvulo de ratón es lento y relativamente homogéneo. La fecundación desencadena incrementos y descensos periódicos drásticos en la velocidad de los movimientos citoplasmáticos en el óvulo. Estos flujos citoplasmáticos bruscos, periódicos y transitorios son distintos de los movimientos de velocidad menor que se dan entremedias y en el presente documento reciben el nombre de “picos de velocidad”.

65 El término “movimientos de después” se refiere a los movimientos citoplasmáticos que se pueden dar

inmediatamente después del descenso drástico en velocidad de un pico de velocidad, pero que son de mayor amplitud que y se pueden distinguir de los movimientos más lentos que se dan entre los picos de velocidad. Un pico de velocidad puede incluir los movimientos de después.

5 Los picos de velocidad se dan por todo el citoplasma del óvulo y pueden durar aproximadamente 4 horas después de la fecundación, hasta la formación de pronúcleos. Los picos de velocidad se pueden identificar midiendo la velocidad citoplasmática media en un embrión durante el tiempo que dura este periodo. Los picos de velocidad se pueden identificar en cualquier plano a través del embrión unicelular. Sin embargo, la amplitud de los picos de velocidad es la mayor en el plano ecuatorial de la célula.

10 La amplitud de los picos de velocidad puede variar a lo largo del tiempo. El primer pico de velocidad puede ser de relativamente alta amplitud, seguido de un periodo en el cual los picos de velocidad tienen amplitud relativamente baja (entre el inicio de la anafase de la meiosis II y la protuberancia de FC temprana, en el presente documento referido como "fase 1"). Cuando el FC está completamente formado o extendido (referido en el presente documento como "fase 2"), las amplitudes de los picos de velocidad pueden ser mayores. La amplitud de los picos de velocidad puede descender durante y después de la regresión de FC (referido en el presente documento como "fase 3").

20 La dirección o el vector del movimiento citoplasmático rápido de un pico de velocidad puede variar entre los picos de velocidad registrados a partir del mismo óvulo fecundado. Durante la fase 1, los vectores generalmente están hacia el desarrollo del segundo cuerpo polar (PB). Durante la fase 2, los vectores están generalmente directamente hacia el FC o ligeramente desplazados hacia el segundo cuerpo polar.

25 Si se identifican dos picos de velocidad sucesivos en el movimiento citoplasmático en un embrión unicelular, entonces se puede medir el intervalo en tiempo entre ellos. Si se identifican más de dos picos de velocidad sucesivos, entonces se puede determinar el intervalo promedio entre los picos de velocidad en el embrión.

El cono de fecundación (FC) es una proyección cónica transitoria que protruye a partir de la superficie de un óvulo fecundado en el punto de contacto con el espermatozoide fecundado.

30 Los picos de velocidad o pulsaciones de FC también pueden ser sincrónicos con las transiciones de Ca^{2+} en el embrión.

35 La "velocidad citoplasmática basal promedio" es la velocidad citoplasmática promedio con el tiempo durante el periodo antes del primer pico de velocidad que se registra, durante el periodo entre picos de velocidad y/o durante el periodo después del último pico de velocidad que se registra. La velocidad citoplasmática basal promedio se puede medir en cualquier momento durante uno o más de estos periodos. En algunos casos de acuerdo con el método de la invención, se mide la velocidad citoplasmática media hasta que se registra el primer pico de velocidad, desde inmediatamente después de un pico de velocidad distinto hasta el comienzo del próximo pico de velocidad distinto, y/o inmediatamente después de que se registra el último pico de velocidad distinto. Se puede determinar la velocidad citoplasmática basal promedio durante estos periodos.

40 En algunos casos, el potencial de desarrollo de un embrión se predice comparando el intervalo entre picos de velocidad o pulsaciones de FC, el intervalo promedio entre picos de velocidad o pulsaciones de FC, o la velocidad citoplasmática basal promedio, con uno o más valores de referencia predeterminados. Los valores de referencia se pueden haber determinado empíricamente basándose en los datos previos que correlacionan estos parámetros con indicadores de alto o bajo potencial de desarrollo.

50 En algunos casos las mediciones son tomadas cuando el embrión está en una fase de desarrollo entre la fecundación y la formación de los pronúcleos. La "formación de los pronúcleos" es la descondensación de la cromatina del espermatozoide y óvulo y la formación del núcleo interfase que contiene los nucléolos más pequeños. El experto en la técnica puede identificar esto en campos brillantes o imágenes DIG (contraste de interferencia diferencial).

55 En algunos casos, el embrión unicelular está en una fase de desarrollo entre la fecundación y la regresión del cono de fecundación. En algunos casos, el embrión unicelular está en una fase de desarrollo después de la extrusión del cuerpo polar y antes de la formación de los pronúcleos, o antes de la regresión del cono de fecundación. La extrusión del cuerpo polar es cuando los bordes del cuerpo polar en la zona de contacto con el óvulo rodean sugiriendo que la ranura de división se estira.

60 En algunos casos, el embrión está en una fase de desarrollo en la que el cono de fecundación está completamente formado. Este es el periodo entre la formación y la regresión del cono de fecundación. En algunos casos, la predicción del potencial de desarrollo está basado en mediciones de los movimientos citoplasmáticos tomados por todo el periodo cuando está presente el cono de fecundación. En ratones, el cono de fecundación está presente durante aproximadamente 2 horas, comenzando a partir de aproximadamente 1-1,5 horas después de la fecundación. Generalmente, el cono de fecundación se comenzará a formar aproximadamente dos horas después de la incubación con el espermatozoide cuando el óvulo se fecunda *in vitro*. En algunos casos de acuerdo con el método de la invención las mediciones son tomadas después de dos horas de incubación conjunta de espermatozoide con un óvulo.

En algunos casos, la toma de las mediciones comprende la captura de imágenes a intervalos regulares seguido del análisis de imagen cuantitativo.

- 5 Las imágenes a intervalos regulares se pueden capturar a partir de un solo plano a través del embrión unicelular. Los picos de velocidad son los más rápidos y, por lo tanto, los más fácilmente distinguidos durante la fase 2 cuando el FC está completamente formado y el movimiento citoplasmático de los picos de velocidad está generalmente dirigido hacia el FC. Los picos de velocidad también son los más rápidos en el plano ecuatorial del pocillo. El plano ecuatorial también es el más grande y da la imagen de mejor calidad. Preferiblemente las imágenes a intervalos regulares se capturan a partir de un solo plano a través del centro de la célula. Preferiblemente las imágenes a intervalos regulares se capturan a partir de un solo plano que corta el FC ecuatorialmente.

- 10 Los embriones que se valoran según el método de la invención están destinados a ser transferidos a un receptor materno dando como resultado embarazo. Por lo tanto, es importante minimizar cualquier daño a los embriones mientras se lleva a cabo el método de valoración. El método de la invención puede ser no invasivo. Por ejemplo, una de las ventajas del método de la invención es que se puede llevar a cabo en ausencia de cualquier colorante, por ejemplo, colorante fluorescente, añadido a la célula. Además, los inventores han encontrado que los picos de velocidad, que coinciden con las pulsaciones del cono de fecundación, son dependientes de las dinámicas del citoesqueleto de actomiosina. Por lo tanto, para minimizar los efectos potenciales sobre el patrón innato de los movimientos citoplasmáticos y cambios de forma del embrión, las mediciones preferiblemente son tomadas de un modo que no interfiera con o minimiza la interferencia con la función o dinámicas del citoesqueleto y/o la formación del cono de fecundación.

- 15 En una realización particularmente preferida, el embrión unicelular que está fotografiado se mantiene en un grupo compacto de embriones unicelulares en una pequeña gota de medio. Preferiblemente la pequeña gota de medio es menor de 30 μ l, o menor de 20 μ l de volumen. El volumen puede ser 5 a 10 μ l de volumen. Los inventores han encontrado que esto es un modo eficaz de establecer la posición de los embriones, es decir mantener los embriones quietos, sin afectar las dinámicas estructurales de la célula.

- 30 Alternativamente, el embrión puede ser un solo embrión en la gota de medio.

- El medio puede estar tamponado, por ejemplo, con HEPES, para mantener un pH constante. Alternativamente, se puede usar una cámara climática para mantener un pH regular. La cámara climática puede proporcionar CO₂, por ejemplo, CO₂ al 5 %, para mantener el pH del medio al nivel correcto.

- 35 También se puede usar una cámara climática para regular la temperatura de los embriones durante la toma de imagen. Por ejemplo, la temperatura se puede mantener a 35 a 40 °C, o 37 a 38 °C o a aproximadamente 37,5 °C. La temperatura también se puede controlar usando una fase calentada.

- 40 Preferiblemente, las imágenes se capturan usando luz que no daña los embriones. Por ejemplo, luz intensa de larga exposición o longitudes de onda cortas podrían dañar el ADN y la cadena respiratoria por la producción de especies de oxígeno reactivo. La irradiación y el tiempo de exposición se podría minimizar mediante la selección de, por ejemplo, velocidades de obturador de la lámpara rápidas o fuentes de luz de diodo emisor de luz (LED), y mediante el uso de sensores muy sensibles para recoger las imágenes. Se podrían seleccionar longitudes de onda apropiadas mediante el uso de filtros ópticos o fuentes de luz LED de longitudes de ondas sencillas. Se puede usar luz transmitida blanca.

- 45 Los sistemas de toma de imagen adecuados para medir los movimientos citoplasmáticos y los cambios en la forma celular podrían usar microscopía de campo brillante. Alternativamente podrían usar técnicas de alto contraste que incluyen, por ejemplo, contraste de interferencia diferencial (DIG), contraste de modulación de Hoffman o microscopía de contraste de fase.

- 50 Otra ventaja de la presente invención es que proporciona un modo de valorar el potencial de desarrollo de un embrión en etapas muy tempranas, a partir de las mediciones tomadas durante un corto periodo de tiempo de embriones en la fase más temprana de desarrollo antes de la primera división celular embrionaria. En algunos casos, todas las mediciones relevantes son tomadas dentro de las 6 horas, más preferiblemente dentro de las 5, 4, 3, 2 o 1 hora desde la fecundación. En algunos casos, todas las mediciones son tomadas antes de la formación de los pronúcleos en el embrión. Más preferiblemente, todas las mediciones son tomadas antes de la regresión del FC. Por ejemplo, todas las imágenes a intervalos regulares del embrión se pueden capturar dentro de estos periodos de tiempo. En algunos casos, el método es realizada, incluyendo la predicción del potencial de desarrollo, dentro de los 6 días, más preferiblemente dentro de los 4, 3, 2 o 1 día desde la fecundación, o dentro de las 12, 6, 4, 3, 2 o 1 hora desde la fecundación.

- 60 En algunos casos, el análisis de imagen cuantitativo usa velocimetría de imagen de partícula (PIV). PIV es una técnica de análisis estándar usada ampliamente en dinámicas de fluido^{21,24} que implica correlación cruzada de subregiones de imagen entre pares secuenciales de imágenes. Usando el análisis de PIV cada imagen se puede dividir en regiones interrogación cuadradas y la distribución del coeficiente de correlación cruzada se puede calcular

dentro de una región mayor en la próxima imagen en la secuencia. El pico de la distribución del coeficiente de correlación cruzada da la localización más probable en la segunda imagen del material en la región interrogación en la primera imagen. A continuación, esto se puede usar para calcular el vector de desplazamiento con el tiempo entre las imágenes (Fig. 1A). Cuando el desplazamiento del patrón de contraste de un área de píxeles se mide durante muchos píxeles es posible medir con exactitud los movimientos subpíxeles con esta técnica^{22,24,48}

En algunos casos de acuerdo con la invención, se pueden clasificar uno o más embriones en una población de embriones según su potencial de desarrollo. El potencial de desarrollo de cada embrión se puede clasificar en relación con el potencial de desarrollo de los otros embriones en la población. Esto puede proporcionar un modo útil de determinar qué embriones de la población de embriones son los más adecuados para un uso previsto posterior particular, por ejemplo, transferir a un receptor materno con el objetivo de un embarazo resultante. De ese modo, los embriones se pueden seleccionar según su potencial de desarrollo.

El método puede implicar calcular el intervalo medio de población o el intervalo promedio entre los picos de velocidad o pulsaciones de FC, y/o la velocidad citoplasmática basal promedio media de la población. El método puede implicar calcular las desviaciones estándar de la población para estos parámetros. Casos aparte obvios en la población se pueden excluir de los cálculos. Por ejemplo, se pueden excluir embriones que tienen un intervalo calculado o intervalo promedio entre picos de velocidad o pulsaciones de FC, o una velocidad citoplasmática basal promedio calculada que es más de 1 desviación estándar, o más de 1,5 desviaciones estándar, o más de 2 desviaciones estándar, o más de 3 desviaciones estándar alejados de la media, o que están en el 10 % por encima o por debajo de los valores calculados. La población media y/o desviaciones estándar se pueden usar para cuantificar el potencial de desarrollo relativo de uno o más de los embriones en la población. Por ejemplo, tener un intervalo calculado o intervalo promedio entre picos de velocidad que es más largo que el intervalo medio de la población o intervalo promedio entre picos de velocidad, y/o tener una velocidad citoplasmática basal promedio que es más rápida que la velocidad citoplasmática basal promedio media de población puede ser indicativo de un embrión que tiene alto potencial de desarrollo.

Al contrario, tener un intervalo calculado o intervalo promedio entre picos de velocidad que es más corto que el intervalo medio de población o intervalo promedio entre picos de velocidad, y/o tener una velocidad citoplasmática basal promedio que es más lenta que la velocidad citoplasmática basal promedio media de la población, puede ser indicativo de un embrión que tiene alto potencial de desarrollo. Igualmente, tener un intervalo calculado o intervalo promedio entre picos de velocidad que es al menos la mitad, o al menos un tercio, o al menos un cuarto, o al menos uno, dos o tres desviaciones estándar más largo o más corto que el intervalo medio de población o intervalo promedio entre picos de velocidad, y/o tener una velocidad citoplasmática basal promedio que es al menos la mitad, o al menos un tercio, o al menos un cuarto, o al menos uno, dos o tres desviaciones estándar más rápida o más lenta que la velocidad citoplasmática basal promedio media de población de la población puede ser indicativo de un embrión que tiene alto o bajo potencial de desarrollo, respectivamente.

Ejemplos

La combinación de una toma rápida de imagen del óvulo de ratón recientemente fecundado con el análisis de imagen avanzado basado en la velocimetría de imagen de partícula revela que la fecundación induce movimientos citoplasmáticos rítmicos que coinciden con pulsaciones de la protrusión que se forma por encima de la cabeza del espermatozoide. Encontramos que estos movimientos están causados por contracciones del citoesqueleto de actomiosina desencadenadas por oscilaciones de Ca^{2+} inducidas por la fecundación. Más importante, la relación entre los movimientos y los sucesos de la activación del óvulo hace posible el uso de solo los movimientos para predecir si un cigoto se desarrollará con éxito. Este método ofrece hasta ahora el modo más temprano y rápido, no invasivo para predecir la vitalidad de los óvulos fecundados *in vitro* y, por lo tanto, potencialmente puede mejorar mucho las perspectivas para el tratamiento de FIV.

MÉTODOS

Recogida de óvulos y espermatozoides

Se superovularon hembras de ratón F1 (C57B16 x CBA) y se recuperaron ovocitos y cigotos como se describió previamente⁴⁴. La activación partenogénica se realizó incubando óvulos durante 4 horas en medio M2 sin Ca^{2+}/Mg^{2+} complementado con 10 mM $SrCl_2$. Se aislaron ovocitos con vesícula germinal (VG) de los ovarios con medio M2 complementado con 150 $\mu g/ml$ de dibutilil AMP cíclico (dbcAMP). Se aisló espermatozoide epididimal de los machos F1 y se capacitaron en 0,5 ml de medio de fecundación con 4 mg/ml de BSA⁴⁵. Se tomaron imágenes de los embriones en medio KSOM como se describió anteriormente⁴⁴. En algunos experimentos antes de la toma de imágenes se incubaron previamente los embriones durante 20 min con BAPTA-AM 30 μM (para quelación de Ca^{2+}), 5 $\mu g/ml$ de nocodazol (para despolimerizar los microtúbulos), 2 $\mu g/ml$ de citocalasina D (para despolimerizar F-actina), taxol 10 μM (para estabilizar los microtúbulos) o jasplaquinolida 100 nM (para estabilizar F-actina) y, a continuación, se transfirieron a KSOM puro (embriones tratados con BAPTA) o a KSOM que contenía el respectivo fármaco (resto de los embriones tratados). Los embriones tratados con Mid-7 (para inhibir la quinasa de cadena ligera de miosina (MLCK) y, por lo tanto, la activación de la miosina II⁴⁶) se incubaron previamente con ML-7 25 μM durante 20 min y, a continuación, se tomó una imagen en un disco que contenía KSOM con ML-7 25 μM sin un

revestimiento de aceite mineral que hubiera absorbido ML-7.

Toma de imágenes y análisis de correlación cruzada de los movimientos citoplasmáticos

5 En la mayoría de los cigotos de los experimentos se tomaron imágenes en un solo plano bajo un microscopio confocal invertido (Zeiss LSM 510 Meta) a 37,5 °C y CO₂ al 5 %. Se capturaron imágenes DIC cada 10 s usando un láser HeNe de 633 nm. Para medir la concentración de ion Ca²⁺ libre, los embriones se incubaron previamente durante 20 min en FuraRed-AM 5 μM (Invitrogen) y Furred y se obtuvieron imágenes DIG simultáneamente con un láser de argón de 488 nm. En experimentos en los que se examinaron las correlaciones entre movimientos
10 citoplasmáticos y potencial de desarrollo de los embriones se tomaron imágenes de los cigotos en un solo plano en luz transmitida bajo microscopios no confocales estándares (Zeiss Axiovert o Deltavision) cada 10 s durante 2,5 horas. En experimentos en los que se compararon los movimientos citoplasmáticos en la corteza y partes centrales de cigotos, se tomaron imágenes de los embriones en el microscopio Deltavision en 11 planos cada 6 μm, cada 10 s durante 3 horas.

15 Las especificaciones ópticas de todos los sistemas de toma de imágenes se resumen en la Tabla 7. Se midió la intensidad de fluorescencia de FuraRed usando programas informáticos de imagen. Las imágenes se analizaron usando programas informáticos escritos habituales en MATLAB (The Mathworks Inc., Natick, MA, USA) usando algoritmos adaptados a partir de MatPIV v1.6.1⁴⁷. El algoritmo se basaba en el usado en PIV, una técnica de análisis estándar usada ampliamente en dinámicas de fluido²¹⁻²⁴ que implica correlación cruzada de subregiones de imagen entre los pares secuenciales de imágenes. En el análisis de PIV cada imagen se dividió en regiones interrogación cuadradas y se calculó el coeficiente de distribución de correlación cruzada dentro de una región mayor en la próxima imagen en la secuencia. El pico de la distribución de coeficiente de correlación cruzada dio la localización más probable en la segunda imagen del material en la región interrogación en la primera imagen. A continuación,
20 esto se usó para calcular el vector de desplazamiento con el tiempo entre imágenes (Fig. 1A). Cuando el desplazamiento del patrón de contraste de un área de píxeles está siendo medido sobre muchos píxeles es posible medir con exactitud los movimientos subpíxeles con esta técnica^{22,24,48}.

Análisis de velocimetría de imagen de partícula (PIV)

30 Se analizaron imágenes DIC de óvulos fecundados usando el programa informático escrito habitual en MATLAB (The Mathworks Inc., Natick, MA, USA) usando algoritmos adaptados de MatPIV v1.6.150. El algoritmo se basaba en el usado en PIV, una técnica de análisis estándar que implica el uso de técnicas de emparejamiento patrón basadas en correlación cruzada de subregiones entre pares secuenciales de imágenes (véase Métodos en el texto principal y la Fig. 1a). Para calcular un desplazamiento para cada región interrogación analizada se usaron dos interacciones de PIV posteriores. Primero, se calculó el desplazamiento para un área interrogación mayor y, a continuación, se usó como un estimado de dónde centrar el área de búsqueda para la próxima interacción con una región interrogación más pequeña. El área en el cual el algoritmo buscó el mejor ajuste era dos veces mayor que la propia región interrogación. En la Fig. 1a, la figura representa una sola interacción del algoritmo de PIV. Para
40 experimentos conducidos en microscopio confocal Zeiss LSM 510 Meta, se usó un tamaño de región interrogación inicial de 64 x 64 píxeles en la primera interacción y, a continuación, se usó una región interrogación de 32 x 32 píxeles en la segunda interacción. El tamaño de píxel para este sistema de toma de imagen era de 0,35 μm. Para experimentos conducidos en microscopios Zeiss Axiovert y Deltavision, debido a mayores tamaños de píxel (0,64 y 0,83 μm, respectivamente), en la primera interacción se usó un tamaño de región interrogación inicial de 32 x 32 píxeles y, a continuación, se usó una región interrogación de 16 x 16 píxeles en la segunda interacción. Se calculó la velocidad media del movimiento citoplasmático tomando la magnitud media de un cuadrado de 11 por 11 vectores en el centro de cada célula.

50 La precisión del uso de PIV para medir desplazamientos muy pequeños (subpíxel), tal como se observa en los periodos entre los picos de velocidad, se ensayó usando imágenes de óvulos tomadas en un aumento mayor (x252, es decir, aumento de objetivo x63, aumento digital 4x) y cambiando artificialmente la imagen y, a continuación, reduciendo el aumento y la resolución de la imagen a la misma que la usada en los experimentos (x14, es decir, aumento de objetivo x20, aumento digital 0,7x). A continuación, se midió el cambio usando PIV. Se encontró que el error era aproximadamente linealmente proporcional al desplazamiento para los desplazamientos de menos de aproximadamente 0,3 píxeles (Fig. 14), lo que incluye la mayoría del rango de los movimientos basales experimentalmente medidos. Esto está conforme con otros estudios que observan la precisión de PIV cuando mide pequeños desplazamientos^{24,26,51}. Los desplazamientos del orden de los movimientos basales (entre 0,1 y 0,3 píxeles/marco o 3,5-10,6 nm/s para Zeiss LSM 510 Meta, 6,4-19,2 nm/s para Zeiss Axiovert y 8,3-24,9 nm/s para Deltavision) tenían un error entre -18,1 % y -15,5 % (Fig. 14). Cuando las mediciones de PIV están siendo usadas
60 para fines comparativos estas subestimaciones sistemáticas tenían poco efecto sobre los resultados o su interpretación.

Análisis de la velocidad citoplasmática y la dirección de movimiento

65 En cigotos que manifestaban cambios oscilatorios en la velocidad citoplasmáticas, se midió la velocidad basal media en intervalos entre el final del movimiento de después y el comienzo del pico de velocidad posterior o en un periodo después de al menos el movimiento de después (Fig. 1D). Para cigotos que no manifestaban las oscilaciones de

velocidad, se calculó la velocidad basal media para todo el periodo de registro. En la mayoría de los casos, se valoró la dirección de los movimientos citoplasmáticos basándose en el vector medio de todos los vectores producidos por PIV en el cigoto. En algunos cigotos, los vectores formaron un par de vértices y, a continuación, se tomó su eje común como dirección. Se valoró visualmente la dirección de patrones de vector altamente irregulares desde la dirección de la mayoría de los vectores de alta magnitud.

Inyección intracitoplásmica de espermatozoide

Se llevó a cabo ICSI como se describió previamente⁴⁹ usando micromanipuladores Leica y microscopio invertido Leica. En algunos experimentos se usó espermatozoide inactivado por calor (30 min en 60 °C) en lugar de espermatozoide recientemente aislado. Se mezcló la suspensión del espermatozoide con medio M2 que contenía polivinilpirrolidona al 10 % (PVP, Mr = 360 kDa). El espermatozoide se administró en el citosol de los ovocitos usando una unidad de manejo de micropipeta piezo (IntraCel PMAS-CT150, PrimeTech, Japón).

Fecundación *in vitro* y transferencias de embrión

Para examinar una correlación entre los movimientos citoplasmáticos y el potencial de desarrollo de los embriones, se añadió 10 µl de suspensión de espermatozoide capacitado a óvulos rodeados por células de cúmulo y, a continuación, se incubaron conjuntamente los gametos durante 2 horas. En experimentos que ensayan la especificidad de inhibidores o que implican la toma de imagen *in vivo* de actina y miosina, antes de la fecundación los óvulos se trataron brevemente con solución de Tirode ácida (pH=2,5) para separar zonas, a continuación, se mezclaron con aproximadamente 1 µl de suspensión de espermatozoide capacitado y se incubaron juntos durante 30 min. En ambos casos la fecundación se realizó en medio de fecundación complementado con 4 mg/ml de BSA⁴⁵. Se transfirieron embriones en la fase de dos células a oviductos de las hembras F1 receptoras emparejadas con machos sometidos a vasectomía en 0,5 dpc. Se diseccionaron en 6,5 dpc o 19,5 dpc.

Toma de imágenes *in vivo* de filamentos de actina y miosina II

Se clonaron construcciones que codificaban el dominio de unión a actina de utrofina fusionada con EGFP (UtrCH-EGFP²⁶), cadena ligera reguladora de miosina II fusionada con GFP (MyoRLC-GFP²⁷) y marcador de proteína Gap43 etiquetada con RFP⁵⁰ en un vector pBluescript RN3P y se sintetizó ARNm a partir del promotor T3 usando el kit mMessage mMachin T3 (Ambion). Se inyectaron ARNm (concentración de pipeta de 0,5 µg/µl para UtrCH-EGFP y MyoRLC-GFP y 0,36 µg/µl para Gap43-RFP) en VG de ovocitos que se cultivaron posteriormente durante aproximadamente 5 horas en M2 con 150 µg/ml de dbcAMP y, a continuación, se lavaron y transfirieron a medio M16 para madurar. Se seleccionaron ovocitos que 16 horas más tarde alcanzaron la fase MII para la fecundación *in vitro* y, a continuación, se tomaron imágenes cada 10 a 15 s sobre un microscopio confocal de disco giratorio invertido (Zeiss). Se midieron las intensidades de fluorescencia de UtrCH-EGFP, MyoRLC-GFP y Gap43-RFP en la corteza de FC y en el citoplasma usando el programa informático ImageJ. Los valores obtenidos para UtrCH-EGFP, MyoRLC-GFP y Gap43-RFP cortical se estandarizaron con intensidades respectivas obtenidas para el citoplasma para eliminar algunos cambios de intensidad que eran causados por artefactos de la toma de imagen, por ejemplo, fluctuaciones en la potencia del láser. A continuación, los resultados finales se presentaron como relaciones entre intensidades estandarizadas de UtrCH-EGFP y Gap43-RFP o MyoRLC-GFP y Gap43-RFP para eliminar algunos cambios de intensidad causados por cambios en foco.

Inmunotinción

Se fijaron los embriones en PFA al 4 % y se permeabilizaron como se describió anteriormente⁴⁴. Los embriones se examinaron usando un microscopio confocal invertido (Zeiss LSM 510 Meta).

A más detalle, los embriones se fijaron en PFA al 4 % (30 min, TA o 4 °C durante la noche), se permeabilizaron con Triton-X100 (30 min, TA) al 0,2 a 0,5 % y se bloquearon con BSA al 3 % o FCS al 10 %. Posteriormente, se tiñeron con los siguientes anticuerpos y colorantes:

- 1) anticuerpo anti tubulina beta de ratón marcado con FITC (Sigma-Aldrich; dilución 1:50 en BSA al 3 % 1,5 h a TA);
- 2) anticuerpo anti actina beta de ratón (Sigma-Aldrich; dilución 1:100 en BSA al 3 % 1,5 h a TA)
- 3) anticuerpo primario anti Gata4 de cabra (Santa Cruz; 1:200 en FCS al 10 %, durante la noche en 4 °C) seguido de un anticuerpo secundario marcado con AlexaFluor 568 (Molecular Probes; 1:1.000 en FCS al 10 %, 1,5 h a TA);
- 4) faloidina marcada con TexasRed o OregonGreen (Invitrogen; 1:100, 30 min, TA o durante la noche, 4 °C);
- 5) Hoechst 33342 (Molecular Probes; 100 ng/ul en PBS, 30 min, TA o durante la noche, 4 °C).

Los embriones se examinaron usando un microscopio confocal invertido (Zeiss LSM 510 Meta).

Análisis estadístico

Se realizaron análisis estadísticos o bien usando la prueba de t de Student, la prueba chi cuadrado o los modelos de regresión apropiados. Debido a la naturaleza secuencial de los experimentos realizados y la naturaleza *a priori* de

las cuestiones que luchamos en abordar, valoramos la significancia estadística al nivel 5 %. Para determinar las relaciones entre la velocidad basal media o el intervalo medio entre los picos de velocidad y el número total de las células producidas después de 4 días de desarrollo (es decir, el recuento celular del día cuatro), ajustamos modelos binomiales negativos a los recuentos celulares de los embriones, con una función de unión logarítmica que relaciona el recuento celular medio con la combinación lineal de las variables explicativas: la velocidad basal media, el cuadrado de la velocidad basal media, el intervalo medio entre picos de velocidad, el cuadrado del intervalo medio entre picos de velocidad, y las diversas interacciones entre las variables de la velocidad basal y los picos de velocidad. En nuestro análisis inicial tomamos en cuenta los efectos de distorsión potencial del sistema de toma de imagen usado (Zeiss o Deltavision) sobre el desarrollo del embrión. Sin embargo, puesto que encontramos que la interacción entre los parámetros analizados, el efecto cuadrático del intervalo medio entre picos de velocidad y el sistema de imagen, no era estadísticamente significativa y no contribuía a ninguna fuerza explicativa adicional, los suprimimos en nuestro análisis final. El ensayo de la relación de probabilidad del modelo completo con todas las variables anteriormente mencionadas incluidas en comparación con el modelo final produjo un cambio no estadísticamente significativo en el log-probabilidad ($p=0,53$). El diseño binomial negativo del recuento celular se eligió sobre el diseño de regresión Poisson más estándar del recuento celular para representar la variación observada en los datos del recuento celular⁵¹.

Para investigar la relación entre las mismas variables explicativas que se describieron anteriormente y la probabilidad de que un cigoto se desarrolle en un blastocisto (es decir, alcance al menos la fase de 32 células), también analizamos nuestros datos ajustando los modelos de regresión logística después de dicotomizar el número total de células producidas después de 4 días de desarrollo en una variable binaria que indica si el recuento celular total excede o no 31 células. El modelo logístico final incluía las mismas variables explicativas que aquellas en el modelo binomial negativo final. El ensayo de la relación de probabilidad del modelo completo frente al modelo final produjo un cambio no estadísticamente significativo en el log-probabilidad ($p=0,30$).

Ejemplo 1

La fecundación del óvulo de ratón da como resultado estallidos del movimiento citoplasmático rítmico

Para caracterizar los movimientos citoplasmáticos tras la fecundación del óvulo de ratón y para evaluar si, y si es así, cómo, se relacionan con otros sucesos asociados a la fecundación, primero filmamos los óvulos desde el momento inmediatamente después de la fecundación hasta la formación de pronúcleos. A continuación, usamos análisis de imagen avanzado basado en el método de PIV^{21,24} para analizar y cuantificar estos movimientos (Fig. 1A). Esto reveló que la fecundación del óvulo de ratón fue seguida por incrementos y descensos periódicos drásticos en la velocidad de los movimientos citoplasmáticos (que denominamos picos de velocidad; Fig. 1B-D, $n=55$ ovocitos no fecundados y $n=125$ óvulos fecundados *in vivo*). Esta secuencia de movimientos repetitivos rápidos por todo el citoplasma del óvulo duró aproximadamente 4 horas, hasta la formación de pronúcleos. Los picos de velocidad inicialmente eran de relativamente baja amplitud (entre anafase de meiosis II y protuberancia de FC temprana; Fase 1); pero posteriormente desarrollaron amplitudes significativamente mayores cuando el FC se extendió por completo (Fase 2). Finalmente, su amplitud descendió durante y después de la regresión de FC (Fase 3) (Fig. 1B, D, Tabla 1). En la Fase 2 los movimientos citoplasmáticos rápidos eran mayores en el plano que corta el FC ecuatorialmente y llegaron a ser más lentos en los planos más periféricos (Fig. 9). El análisis de PIV reveló que cada pico de velocidad era seguido por movimientos de después que normalmente persistían durante más de 4 min y eran de menor amplitud. Los movimientos durante la Fase 3 eran excepciones a esta regla en la que los picos de velocidad eran con frecuencia menos distintos que los movimientos de después (Fig. 1D, Tabla 1). Además, notamos que la fecundación conducía a un incremento mayor del doble en la velocidad citoplasmática media basal (la velocidad durante los intervalos inter-pico o después del último pico registrado) en comparación con el nivel restante de ovocitos no fecundados (Fig. 1C-D, Tabla 2).

Nuestro análisis reveló que durante la Fase 1, los vectores de estos movimientos citoplasmáticos bruscos tendieron a ser hacia el desarrollo del segundo PB (17/25 picos de velocidad, 11 cigotos). Esto cambió direccionalmente durante la Fase 2 de manera que los vectores estaban directamente hacia el FC o algunas veces ligeramente desplazados hacia el segundo PB (64/65 picos de velocidad, 19 cigotos). No había patrón persistente durante los movimientos de después de baja magnitud o intervalos inter-pico en ninguna de estas fases. En la Fase 3 direccionalmente o cualquier patrón de los picos de velocidad no era más aparente (Fig. 1E, Tabla 4). Estos picos de velocidad cesaron después de la regresión de FC cuando se observaron los pronúcleos en la mayoría de los cigotos (46/63, 77,8 %) (Fig. 1D). Por tanto, nuestros resultados indican que la fecundación del óvulo de ratón desencadena picos de velocidad de movimientos citoplasmáticos que en su mayor fuerza están dirigidos hacia la formación de FC por encima del sitio de entrada de espermatozoide.

Ejemplo 2

Los picos de velocidad citoplasmática de alta amplitud se correlacionan con las pulsaciones del FC y dependen del citoesqueleto de actomiosina

Puesto que la dirección de los movimientos bruscos de la Fase 2 sugirieron que el FC podría estar implicado en su generación, después examinamos la morfología del FC por todo este periodo (69 picos de velocidad, 14 cigotos).

Esto mostró que, en cada pico de velocidad, la punta del FC se hundía hacia dentro y se ensanchaba la región en la que FC se fusionaba dentro del contorno convexo del cigoto. Como consecuencia, el diámetro del cigoto a lo largo del eje del FC (más adelante denominado el "diámetro de FC") descendió por $1,28 \pm 0,66 \mu\text{m}$ ($1,55 \pm 0,79 \%$ de su longitud) (Fig. 2A, C). La forma del FC se restauró durante el intervalo inter-pico (Fig. 2C). Interesantemente, el grado de reducción del diámetro de FC mostró una asociación lineal con la amplitud de pico de velocidad (20 cigotos, 71 picos de velocidad analizados) (Fig. 2B).

Puesto que el citoesqueleto de actomiosina está enriquecido en la región de FC^{17,25}, consideramos que esto podría ser responsable de pulsaciones de FC. Para evaluar esta posibilidad, visualizamos la actomiosina por todas estas pulsaciones mediante la inyección de ovocitos con ARNm que codifican o bien el dominio de unión a actina de utrofina etiquetada con EGFP (UtrCH-EGFP²⁶) o la cadena ligera reguladora de miosina II etiquetada con GFP (MyoRLC-GFP²⁷). Las mediciones de la intensidad de fluorescencia media de UtrCH-EGFP en tales ovocitos después de su fecundación revelaron cambios oscilatorios en la capa de actina continua subyacente al FC; la intensidad de fluorescencia del marcador de actina descendió cuando el FC se relajó e incrementó cuando el FC estaba protruyéndose gradualmente (Fig. 2D, Fig. 10). Se obtuvieron resultados similares para la intensidad de fluorescencia media de MyoRLC-GFP subyacente a los hombros de FC (Fig. 2E, Fig. 11). Tales fluctuaciones en fluorescencia de UtrCH-EGFP y MyoRLC-GFP podría reflejar un cambio en la cantidad de la actomiosina en esa región. Sin embargo, puesto que estos cambios son relativamente pequeños, transitorios y repetitivos, es más probable que representen contractibilidad de actomiosina que rodea el FC conduciendo a sus pulsaciones.

Ya que los movimientos de FC se daban en el marco con los picos de velocidad citoplasmática dirigidos hacia el FC, después examinamos si el citoesqueleto de actomiosina era responsable de ambos. Para este fin, usamos inhibidores selectivos para interferir con tanto la actomiosina como con los citoesqueletos de microtúbulo. Su especificidad se confirmó mediante inmunotinción (Fig. 12) y sus efectos sobre la progresión del ciclo celular está presente en la Tabla 5. Encontramos que ni la despolimerización inducida por nocodazol ni la estabilización inducida por taxol de microtúbulos inhibían los picos de velocidad aunque se cambiaban ligeramente sus dinámicas. El tratamiento con nocodazol incrementó la velocidad citoplasmática en algunos movimientos de después y en todos los intervalos entre picos de velocidad ($n=38$, Fig. 2F, Tabla 1, 2), mientras que el tratamiento con taxol descendió la amplitud de los picos de velocidad, algunos movimientos de después y velocidad citoplasmática en todos los intervalos inter-pico ($n=27$, Fig. 2G, Tabla 1, 2). Por el contrario, la despolimerización de actina con citocalasina D o la estabilización de filamentos de actina con jasplakinolida dieron como resultado un descenso de casi tres veces en velocidad basal (Fig. 2F, G, Tabla 2). Además, el tratamiento con citocalasina D abolió drásticamente los picos de velocidad (Fig. 2F). Solamente 2 de los 21 cigotos analizados (9,5 %) estaban desenfocados, picos de velocidad de baja amplitud registrados. Los picos de velocidad estaban aún presentes en cigotos tratados con jasplakinolida ($n=60$) aunque sus amplitudes eran significativamente menores que en el control y los movimientos de después eran virtualmente indetectables (Fig. 2G, Tabla 1). En casi todos los cigotos, el tratamiento con ML-7, un inhibidor de quinasa de cadena ligera de miosina (MLCK), también bloqueó las oscilaciones de velocidad citoplasmáticas (16/17 cigotos, 94,1 %) (Fig. 2F), y únicamente tan solo un cigoto excepcional manifestó picos de velocidad de baja amplitud indistintos.

Estos experimentos también revelaron que la despolimerización o estabilización de microtúbulos, mediante respectivos tratamientos con nocodazol o taxol, no tenían efecto sobre o bien la formación y/o mantenimiento de los FC. Por el contrario, no se formaron FC en la mayoría (20/21, 95 %) de cigotos tratados con citocalasina D conforme estudios previos¹³. La estabilización de filamentos de actina en cigotos tratados con jasplakinolida aún permitió la formación y/o el mantenimiento de los FC, pero no eran prominentes como en los controles. Los FC estaban presentes en justo más de la mitad de los embriones (10/17, 58,8 %) cuando se inhibía la actividad de MLCK y cuando estaban presente, estaban peor desarrollados. Esto concuerda con la conclusión previa de que la actividad MLCK está implicada en la formación y mantenimiento del FC^{25,28}. Estos resultados juntos indicaron que tanto las oscilaciones citoplasmáticas y pulsaciones de FC dependen principalmente del citoesqueleto de actomiosina.

Ejemplo 3

Los movimientos citoplasmáticos se correlacionan con y dependen de las transiciones de Ca^{2+}

Ya que se sabe que la fecundación inicia las oscilaciones de Ca^{2+} libre^{10,29}, después deseamos abordar si los picos de velocidad mediados por actomiosina podrían depender de estos pulsos de Ca^{2+} . Para este fin, cargamos óvulos fecundados con el colorante fluorescente sensible a Ca^{2+} FuraRed, y simultáneamente recogimos la fluorescencia de FuraRed e imágenes DIC. En 32 cigotos, todos los 121 picos de velocidad estaban acompañados de un incremento en Ca^{2+} . La velocidad citoplasmática se incrementó exactamente (dentro de la resolución de nuestro intervalo de registro) cuando los niveles de Ca^{2+} llegaron a su máximo (Fig. 3A). Únicamente tan solo un cigoto con oscilaciones de Ca^{2+} excepcionalmente frecuentes manifestó algunos picos de Ca^{2+} (4/17) que no estaban reflejados por picos de velocidad. En algunos óvulos fecundados por ICSI logramos registrar picos de velocidad que acompañaban a la primera transición de Ca^{2+} . Eran de mayor amplitud que el resto de los picos de velocidad de la Fase 1 (Fig. 9) correspondientes a la primera transición de Ca^{2+} que es mayor que los posteriores.

Para determinar si las oscilaciones de Ca^{2+} son esenciales para los movimientos citoplasmáticos, registramos el movimiento en 21 óvulos fecundados cargados con el quelante de Ca^{2+} BAPTA, conocido por inhibir las oscilaciones

de calcio sin cambiar el nivel basal de Ca^{2+} intracelular³⁰. Este tratamiento suprimió picos de velocidad de alta amplitud, pero elevaron la velocidad citoplasmática basal a 1,7 veces más que los controles (Fig. 3B). Aunque BAPTA alteró los microtúbulos (Fig. 12), como se observó en otros sistemas^{31,32}, esto era poco probable que fuera responsable de la pérdida de picos de velocidad debido a que la alteración específica de microtúbulos no causó un fenotipo similar (véase anteriormente).

Interesantemente, cuando activamos los óvulos de ratón (n=47) usando SrCl_2 , causando así oscilaciones de Ca^{2+} similares a las vistas después de la fecundación, solamente el 30 % (133/444) de las transiciones de Ca^{2+} estaban acompañadas de picos de velocidad. Además, estos no se parecían a los picos de velocidad de cigotos ya que tenían amplitudes muy bajas (Fig. 3C, Tabla 1, 3) y también con frecuencia se retrasaron 10 a 30 s con respecto al inicio de la transición de Ca^{2+} . Los movimientos de después estaban presentes con 76,8 % (341/444) de estas transiciones de Ca^{2+} inducidas por Sr, pero sus amplitudes eran también menores que en los cigotos (Tabla 1, 3). Esto sugiere que, aunque las oscilaciones de Ca^{2+} son necesarias para los movimientos citoplasmáticos rápidos, no son suficientes para desencadenar distintos picos de velocidad de alta amplitud distintos. Por tanto, la fecundación conduce a sucesos adicionales que permiten completamente estos movimientos.

Ejemplo 4

Se requieren proteínas de espermatozoide funcionales para iniciar los movimientos citoplasmáticos

Para caracterizar más la contribución relativa hecha por o bien el espermatozoide en sí mismo o el FC sobre tanto los picos de velocidad citoplasmática como las oscilaciones de Ca^{2+} , inyectamos espermatozoide directamente en el óvulo, o bien inmediatamente por debajo de la corteza o en el centro de la célula. Puesto que la formación del FC depende de la interacción entre la cromatina de espermatozoide y la actina cortical y es dependiente de la distancia³³, los FC solamente se formaron en el grupo formador de óvulos inyectados. En ambos casos el espermatozoide inyectado dio como resultado oscilaciones de Ca^{2+} y activación de óvulo. Sin embargo, mientras que los óvulos que formaron FC, 97 % (101/104) de las transiciones de Ca^{2+} estaban acompañadas de picos de velocidad (n=17, Fig. 4A), en óvulos sin FC, 71 % (207/290) de las transiciones de Ca^{2+} tenían picos de velocidad (n=35, Fig. 4B). De manera importante, la amplitud media de los picos de velocidad era significativamente menor en óvulos sin FC, mientras que en óvulos con FC las amplitudes eran similares a las de los fecundados de manera natural (Fig. 4AB, Tabla 1, 3). Sin embargo, la amplitud media de los picos de velocidad durante la formación de pronúcleos y de los movimientos de después de todas las fases eran similares en ambos grupos (Tabla 3), sugiriendo que el mecanismo de estos movimientos particulares puede ser independiente de FC.

Para diseccionar más la contribución de los FC al desencadenamiento de los movimientos citoplasmáticos, examinamos si los picos de velocidad se darían en respuesta a inyección de cabezas de espermatozoide inactivado por calor que están desprovistos de todas las proteínas funcionales y sirven como fuente de ADN. La asociación de cromatina a la corteza se sabe que es suficiente para desencadenar la formación similar a FC³³. Por consiguiente, cuando se inyectaron las cabezas de espermatozoide inactivado por calor en la corteza y óvulos activados por Sr^{2+} , se observaron tanto oscilaciones de Ca^{2+} como formación de FC. En tales cigotos (n=25), 60,8 % (48/79) de las transiciones de Ca^{2+} estaban acompañadas de picos de velocidad cuando los FC estaban presentes (Fase 2). Sin embargo, las amplitudes del pico de velocidad permanecieron relativamente bajas (Fig. 4C, Tabla 3). Interesantemente, las pulsaciones de FC también eran mucho menos pronunciadas que las observadas en cigotos normales y ni los picos de velocidad ni las pulsaciones de FC estaban perfectamente sincronizadas con los picos de transiciones de Ca^{2+} sino que se daban 10 a 30 s más tarde. No se registraron oscilaciones de Ca^{2+} en óvulos inyectados con esperma inactivado y se dejaron sin activación partenogénica (Fig. 4D). Estos resultados juntos sugieren que los picos de velocidad de alta amplitud están asociados a pulsaciones de FC y están facilitados por proteínas funcionales del espermatozoide.

Ejemplo 5

Los movimientos citoplasmáticos proporcionan un indicador de la vitalidad del embrión

Puesto que encontramos que los movimientos citoplasmáticos corresponden al patrón de oscilaciones de Ca^{2+} y la calidad del citoesqueleto, nos preguntamos si el análisis de tales movimientos podría ser predictivo del éxito del desarrollo. Para abordar esto, fecundamos 71 óvulos *in vitro*, registramos sus movimientos citoplasmáticos por todo el periodo en el los FC estaban presentes y, a continuación, cultivamos los embriones durante 4 días. En el primer caso relacionamos el patrón de los movimientos citoplasmáticos en cada embrión con el número total de células en ese momento. Esto reveló que para diferentes valores del intervalo medio entre picos de velocidad había efectos lineales y cuadráticos estadísticamente significativos entre la velocidad basal media ($p=0,0005$ y $0,0001$ respectivamente) y el recuento celular en un embrión (en la escala logarítmica; Fig. 5C). El recuento celular medio el 4º día de desarrollo se incrementó con la velocidad basal media (hasta 1,7 desviaciones estándar ($\text{SD}=6,7$ nm/s) desviado del promedio de 12,2 nm/s de los valores de velocidad basal media) después de lo cual se estabilizó o disminuyó (Fig. 5A, C). Además, para diferentes valores de la velocidad basal media o su cuadrado, el número medio de células después de 4 días de desarrollo se incrementó en proporción con el intervalo medio entre picos de velocidad (1,3 veces mayor (CI al 95 %: 1,07-1,47) para cada 1 SD, es decir, aproximadamente 7 min; $p=0,0045$, Fig. 5B, D). Se observaron descubrimientos similares cuando examinamos el éxito del desarrollo valorando la

probabilidad de desarrollo a la fase de blastocisto (Fig. 13A). Este análisis sugiere una relación lineal entre la velocidad basal media ($p=0,009$) y el logaritmo de probabilidades de que el embrión alcance la fase de blastocisto después de 4 días de desarrollo: la probabilidad de desarrollarse a un blastocisto se incrementa cuando la velocidad media basal se incrementa. Además, encontramos que para cada incremento de 1 SD en el intervalo entre picos de velocidad se incrementaron 2,3 veces las probabilidades de desarrollo de un embrión en un blastocisto (CI al 95 %: 1,10-4,89; $p=0,027$) (Fig. 13B).

Para eliminar la posibilidad de que nuestro método de registro de movimientos citoplasmáticos causase alguna fotolesión y para examinar si cualquier posible sensibilidad a la luz dependía de la fase post-fecundación de toma de imagen, comparamos el desarrollo de los cigotos que formaban pronúcleos en diferentes tiempos después del inicio del registro. No encontramos evidencias de ninguna diferencia o bien entre los números celulares medios o la distribución de las fases de desarrollo alcanzadas ($p>0,46$ para cualquiera de los dos grupos comparados y $p=0,97$, respectivamente, Fig. 13C, D). También comparamos el desarrollo de los embriones fotografiados ($n=71$) y no fotografiados ($n=46$) asegurando que ambos grupos eran tratados del mismo modo. El número medio de células (Fig. 13E) así como la distribución de embriones con números celulares diferentes (Fig. 13F) eran similares en ambos grupos ($p=0,75$ y $0,19$, respectivamente).

Finalmente, puesto que los anteriores resultados indicaron que el patrón de movimientos citoplasmáticos es predictivo de la calidad de desarrollo de la implantación previa, deseamos determinar si estos patrones de movimientos podrían predecir qué óvulos se desarrollarán con éxito a término. Para este fin, tomamos una imagen y analizamos óvulos fecundados *in vitro* y, a continuación, los agrupamos según si sus patrones de movimiento citoplasmático indicarían buen o mal potencial de desarrollo. Se predijo que los embriones con buen potencial tienen después de 4 días de cultivo entre 25 y 52 (un promedio de 32) células por embrión y alcanzan la fase de blastocisto entre 25 y 90 % de los casos (un promedio de 46,5 %). Se predeciría que los embriones clasificados como baja calidad después de 4 días tienen entre 9 y 24 células (un promedio de 17) y que entre 0 y 25 % de ellos, un promedio de 10,7 %, alcanzan la fase de blastocisto. Los dos grupos de embriones se transfirieron en la fase de 2 células a las hembras receptoras. Estos embriones valorados como “de alta calidad” se desarrollaron a la fase de gástrula (6,5 dpc) 5 veces con más frecuencia (83,3 %, 5/6 frente a 16,7 %, 1/6) y a término completo (19,5 dpc) casi 3 veces con más frecuencia (2,77, 87,5 %, 21/24 frente a 31,6 %, 6/19) que los embriones valorados como “de baja calidad” (Fig. 5E, F, Tabla 6). Tomándolos juntos, estos resultados indican que los movimientos citoplasmáticos post-fecundación son predictivos del éxito de desarrollo y nuestro método de toma de imagen no obstaculiza el desarrollo del embrión.

Ejemplo 6

Las oscilaciones de Ca^{2+} inducidas por PLC ζ causan movimientos citoplasmáticos coincidentes en ovocitos humanos

La evidencia reciente sugiere que las oscilaciones de Ca^{2+} en la fecundación están desencadenadas después de que el espermatozoide se fusione con el ovocito, y esto conduce a la introducción de una fosfolipasa C específica a espermatozoide (PLC ζ) en el ovocito^{52,53}. A continuación, PLC ζ genera ciclos repetidos de la producción de $InsP_3$ dentro del ooplasma que causan el fenómeno de liberación de Ca^{2+} repetitivo de oscilaciones de Ca^{2+} ^{52,53}. PLC ζ de espermatozoide se introduce más convencionalmente en los ovocitos mediante microinyección de su ARN complementario (ARNc) que se traduce en la proteína PLC ζ dentro de los ovocitos durante un periodo de varias horas⁵⁴. Por lo tanto, la inyección de ARNc de PLC ζ en ovocitos produce la proteína PLC ζ que causa oscilaciones de Ca^{2+} prolongadas, y en experimentos paralelos se ha demostrado que PLC ζ activa el desarrollo embrionario de ovocitos de ratón, cerdo, vaca y humanos hasta las fases de mórula y blastocisto⁵⁴⁻⁵⁷.

En el presente documento informamos del uso de la toma de imagen PIV en ovocitos humanos que se inyectan con ARNc de PLC ζ de espermatozoide. Demostramos que los movimientos citoplasmáticos repentinos pero pequeños se pueden detectar en sincronía cercana con cada transición de Ca^{2+} inducida por PLC ζ en ovocitos humanos que no se han conseguido fecundar después de ICSI. El método que describimos puede tener potencial como método no invasivo para el seguimiento de patrones de oscilación de Ca^{2+} en ovocitos humanos.

MATERIALES Y MÉTODOS (Ejemplo 6)

Ovocitos humanos

Los ovocitos humanos fueron donados por pacientes en la *IVF Wales Clinic* en la *University Hospital of Wales*, Cardiff. El proyecto actual y todos los procedimientos asociados han sido aprobados por el *South East Wales Research Ethics Committee* y la *Human Fertilisation and Embryology Authority* (R0161 sostenido por K. Swann y N. Amso). Se usaron ovocitos de “ICSI fallida” envejecidos y ovocitos frescos derivados de procedimientos de reducción de folículo. La ICSI se realizó bajo condiciones estándares y los ovocitos se cultivaron durante unas 16 a 18 horas más antes de que se juzgue si están fecundados o no. “Ovocitos frescos” derivados de la reducción de folículo se usaron dentro de las 5 horas de recogida. Solamente se usaron en los experimentos aquellos ovocitos que se establecieron como no activados. Durante las posteriores 1 a 4 horas estos ovocitos se transfirieron de la clínica al laboratorio de investigación donde se microinyectaron con aproximadamente 10 a 20 pl de ARNc de PLC ζ humano, como se describió previamente^{54,55}. Brevemente el ARNc se mezcló con colorante sensible a Ca^{2+} , Oregon

Green BAPTA dextrano 0,5 Mm (OGBD, Invitrogen). A continuación, se microinyectó la mezcla usando una micropipeta (diámetro de la punta de aproximadamente 1 μM). Se insertó la micropipeta en el ovocito usando un pulso breve de oscilación eléctrica de un amplificador que estaba conectado en línea a la aguja de la micropipeta. A continuación, se aplicó un pulso de presión (aproximadamente 1 segundo de 20 psi) a la parte posterior de la micropipeta para empujar un émbolo de la mezcla de inyección en el ovocito. El ARNc se mezcló con colorante sensible a Ca^{2+} , Oregon Green BAPTA dextrano 0,5 mM, (OGBD, Invitrogen). El ARNc de PLC ζ se preparó como se describió previamente⁵⁴. Durante la recogida de datos, los ovocitos se mantuvieron a 37 °C en una gota de medios bajo el aceite, usando una cámara de toma de imagen Series 40 Quick Change con un controlador de temperatura CL-100 (Warner Instruments). Los ovocitos se microinyectaron en medios M2 (Sigma) y, a continuación, el registro era en medios KSOM tamponados con HEPES, como se describió anteriormente⁵⁹.

Sistema de toma de imágenes

Se tomaron imágenes de los ovocitos o cigotos durante varias horas después de la microinyección usando un microscopio de epifluorescencia Nikon TiU con un objetivo 20x 0,75 NA. Se pasó la excitación por fluorescencia de una lámpara de halógeno a través de un filtro de paso banda de 490 nm, se reflejó por un dichroico de 505 nm, y se recogió con un filtro de paso banda de 530 nm. Se usó luz blanca de otra lámpara de halógeno para visualizar los ovocitos con microscopía de contraste de fase de interferencia diferencial (DIC). Los obturadores se colocaron el paso de estas fuentes de luz, y las ruedas del filtro estaban en el paso de tanto la excitación de fluorescencia como la luz de emisión de modo que los ovocitos estaban solamente brevemente expuestos a la luz durante la adquisición de la imagen. Los obturadores y las ruedas del filtro se controlaban mediante un controlador de Lambda-10 (Sutter Instruments). Las imágenes se tomaron con exposiciones de 100 a 200 ms en sucesión inmediata cada 10 segundos con una cámara Coolsnap HQ2 CCD (Photometrics). Se controlaron la Lambda-10, la recogida de imagen y el análisis inicial usando el programa informático InVivo (Media Cybernetics) y se almacenaron las imágenes como unas pilas de tiff.

Se analizaron las imágenes de fluorescencia usando ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) y se trazó la intensidad de fluorescencia del colorante desde todo el ovocito frente a tiempo. Se analizaron los movimientos en el citoplasma con métodos de correlación cruzada que se habían desarrollado para estudiar movimientos similares en cigotos de ratón⁵⁸. El algoritmo se basa en lo usado en el análisis de PIV en la investigación de las dinámicas de fluido e implica correlación cruzada de subregiones de imagen entre pares sucesivos de imágenes. Este análisis da un campo vector que representa el movimiento de las regiones locales de citoplasma. La velocidad media del movimiento se calculó tomando la media de la magnitud de los vectores en una región cuadrada en el centro del ovocito, como se describió previamente⁵⁸. El programa informático se desarrolló y escribió en MATLAB y está disponible bajo una licencia de uso académico no comercial en <http://users.ox.ac.uk/~zool0847/code.html>.

RESULTADOS (Ejemplo 6)

La microinyección de ARNc de PLC ζ en ovocitos humanos que no se habían conseguido activar después de ICSI causó una serie prolongada de oscilaciones de Ca^{2+} que se ilustran en la Fig. 6A. El patrón específico de los picos de Ca^{2+} libre elevada mostraron alguna variación entre los ovocitos, pero la respuesta general consistía en un gran incremento de Ca^{2+} inicial, seguido de una serie de transiciones de Ca^{2+} más pequeñas que gradualmente incrementaron en frecuencia con el tiempo. Este patrón general de oscilaciones Ca^{2+} es similar al informado previamente en ovocitos humanos que eran inyectados con ARNc de PLC ζ ⁵⁵. La latencia relativamente larga ente la inyección de ARNc (15 a 20 min antes del comienzo del registro) y la primera aparición de picos de Ca^{2+} , y la acumulación posterior en la frecuencia de pico de Ca^{2+} , probablemente refleja el incremento gradual en la expresión de la proteína PLC ζ con el tiempo que previamente se ha demostrado empíricamente con construcciones de fusión etiquetadas con luciferasa de PLC ζ ^{54,60-62}.

Cuando analizamos los ovocitos inyectados con ARNc de PLC ζ para los movimientos citoplasmáticos usando PIV, encontramos que se daban distintos movimientos dentro del mismo intervalo de 10 segundos, inmediatamente después de cada transición de Ca^{2+} (Fig. 6B). En estos ovocitos humanos, la velocidad de PIV media máxima era o bien coincidente con el máximo del pico de Ca^{2+} , o se daba dentro de los 50 s siguientes al máximo de la transición de Ca^{2+} . En total, se detectaron 95/102 movimientos citoplasmáticos dentro de este rango a partir de 10 cigotos diferentes. El retraso medio del pico de velocidad era de 18 segundos después del pico de Ca^{2+} (con un rango de 10 a 50 segundos). Es digno de mención que los movimientos detectados en el citoplasma del ovocito son relativamente pequeños en escala: la magnitud media de todos los vectores en un pico de velocidad nunca excedió 40 nm/s, y dentro de estas regiones locales de picos de velocidad nunca se movieron más rápido de 120 nm/s. Aunque en la mayoría de los casos no hubo un incremento brusco en el movimiento asociado a una transición de Ca^{2+} , también es notable que el nivel mayor de Ca^{2+} alcanzado en el primer pico de algunos registros con frecuencia estaban acompañados por movimiento reducido en el citoplasma (4/6 casos) (Fig. 6B). En un caso, cuando el nivel de Ca^{2+} se mantenía alto en el segundo pico, también se suprimía el movimiento citoplasmático (1/6) (Fig. 6B y 7).

Para ovocitos individuales, los vectores de movimiento tenían una orientación consistente durante cada pico de velocidad, pero la dirección de movimiento con frecuencia se invirtió dentro de un espasmo de movimiento (Fig. 8). Sin embargo, la dirección media del movimiento no tenía relación consistente con la posición de los primeros o segundos cuerpos polares. Además, pequeños vórtices eran frecuentemente visibles en picos de velocidad. Dada la

limitación del pequeño número de ovocitos fotografiados en un solo plano, estos vórtices no estaban obviamente asociados a ninguna estructura de ovocito particular.

5 El grado de sincronía entre la elevación de Ca^{2+} y el movimiento era el resultado común en estos ovocitos humanos. Esto sugiere que los movimientos citoplasmáticos en ovocitos humanos están directamente inducidos por iones Ca^{2+} libres elevados. Estudios previos en cigotos de ratón mostraron que tales movimientos en el citoplasma son dependientes del citoesqueleto de actina y están muy influenciados por la presencia del espermatozoide y el cono de fecundación⁵⁸. Era difícil identificar la región de los ovocitos humanos activados que cambió la forma durante los picos de velocidad, aunque había cambios progresivos lentos del perfil celular detectados durante los registros. En algunos registros era posible observar una región granular que se movía alrededor del citoplasma y que formaba un creciente granular espeso por debajo de la membrana celular. Este creciente periférico también se movía en relación con la posición del primer cuerpo polar pero el límite del creciente preciso estaba mal definido. No se mantiene claro si puede estar presente algún espermatozoide potencial dentro de estos ovocitos "ICSI fallidos" o si alguna estructura alrededor de un espermatozoide podría jugar un papel específico en los movimientos citoplasmáticos, como se sugiere en cigotos de ratón. Sin embargo, no llevamos a cabo un análisis similar de oscilaciones de Ca^{2+} inducidas por ARNc de PLC ζ y movimientos citoplasmáticos en 7 ovocitos no fecundados que se obtuvieron después de la reducción de folículo. Notablemente, no conseguimos detectar ningún movimiento asociado a los 41 picos de Ca^{2+} observados en estos ovocitos derivados de la reducción de folículo.

20 DISCUSIÓN

La toma de imágenes rápidas a intervalos regulares, no invasivas, combinadas con el análisis de PIV de los sucesos citoplasmáticos después de la fecundación descrita en el presente documento, revela que la entrada del espermatozoide en el óvulo de ratón desencadena una serie de contracciones de actomiosina rítmicas inesperadas asociadas a los movimientos citoplasmáticos. En su velocidad máxima estos movimientos citoplasmáticos tienen vectores dirigidos hacia la protrusión formada por encima del sitio de entrada de espermatozoide que se somete a pulsaciones en sincronía con ellos. Los picos de velocidad de los movimientos citoplasmáticos corresponden en ritmo con las transiciones de Ca^{2+} inducidas por fecundación y dependen de las oscilaciones de calcio. Mostramos que el análisis del intervalo entre picos proporciona un modo no invasivo y muy rápido novedoso de valorar la vitalidad del embrión y su capacidad de tener éxito en el desarrollo.

La implicación del citoesqueleto de actomiosina en mediar movimientos citoplasmáticos es evidente a partir de nuestros descubrimientos de que la inhibición de MLCK o los tratamientos que o bien estabilizaban o despolimerizaban la F-actina disminuían tanto los picos de velocidad como la velocidad citoplasmática basal. Los movimientos también dependen de las transiciones de Ca^{2+} debido a que se previnieron por quelación de Ca^{2+} con BAPTA. Una posibilidad es que las quinasas dependientes de Ca^{2+} tal como quinasa II dependiente de Ca^{2+} /calmodulina (CaMKII) o protein quinasa C convencional (cPKC) participen en el desencadenamiento de los movimientos ya que estas enzimas son conocidas tanto por regular el citoesqueleto¹⁰ como por responder a oscilaciones de Ca^{2+} ³⁴⁻³⁶. Sin embargo, mientras que la amplitud de las oscilaciones de Ca^{2+} son similares por todo el periodo post-fecundación (excepto para el primer pico de Ca^{2+} que es generalmente mayor que los posteriores²⁹), la amplitud de los picos de velocidad se incrementa en el inicio de la formación de FC y desciende tras la regresión de FC. Además, las transiciones de Ca^{2+} provocadas por la activación partenogénica no son suficientes para promover movimientos citoplasmáticos oscilatorios rápidos sugiriendo que los factores asociados a fecundación adicionales deben permitir dar lugar los movimientos.

La coincidencia de picos de velocidad fuertes de movimiento con movimientos rítmicos mediados por actomiosina del FC sugiere que estos son manifestaciones del mismo proceso. Esto además se confirma por estudios de formación de FC después de la inyección de espermatozoide. Ya que la formación de FC requiere la interacción de cromatina con proteínas corticales³³, no se da cuando el espermatozoide se inyecta profundo en el óvulo. Por consiguiente, los óvulos fecundados de este modo mostraron picos de velocidad mucho más débiles que en cigotos con FC. El hecho de que los picos de velocidad, aunque débiles, estén aún presentes, podría ser debido a que la cromatina de espermatozoide estaba colocada lo suficientemente cerca de la superficie celular para causar alguna reorganización de la actomiosina cortical. Aunque insuficiente para producir un FC bien definido, esto aún sería capaz de aumentar los movimientos citoplasmáticos débiles. Alternativamente, se podrían desencadenar picos de velocidad mediante contracciones de la actomiosina cortical acumulada por encima de la cromatina maternal derivada. De hecho, frecuentemente podríamos ver que una protuberancia formada por encima del conjunto de los pulsados cromosómicos maternos de un modo similar al FC. También es posible que los picos de velocidad de baja amplitud puedan ser un efecto de contractibilidad general del citoesqueleto de actomiosina, no asociada a la corteza. Las dos últimas posibilidades también podrían explicar por qué hay algunos picos de velocidad de baja amplitud visibles en los partenotes activados por Sr^{2+} .

Los movimientos de alta velocidad tampoco se desencadenaron y los movimientos de FC se disminuyeron mucho en óvulos activados por Sr^{2+} inyectados con cabezas de espermatozoide inactivados por calor. Por tanto, el espermatozoide puede contribuir bien a proteínas que facilitan los movimientos de FC y los movimientos citoplasmáticos que se inactivan por tratamiento por calor. También es posible que las diferencias observadas entre cigotos normales y embriones inyectados con espermatozoide inactivado seguido de activación por Sr^{2+} pueda ser debido a las características alteradas de las propias transiciones de Ca^{2+} . Las dinámicas de picos de Ca^{2+} inducidos

por Sr^{2+} típicos difieren de aquellas de picos de Ca^{2+} desencadenados por la fecundación. Además, la frecuencia de las oscilaciones de Ca^{2+} inducidas por Sr^{2+} era muy alta bajo nuestras condiciones y esto parecía afectar negativamente a la generación de picos de velocidad de alta amplitud.

5 Encontramos que el ritmo y el patrón de los movimientos citoplasmáticos proporcionan un indicador poderoso de la calidad del embrión. Nuestros datos muestran que los embriones con baja velocidad basal media (por debajo de 10 nm/s; indica mala calidad del citoesqueleto de actomiosina), así como embriones con picos de velocidad muy frecuentes (intervalo inter-pico por debajo de 10 min; reflejando transiciones de Ca^{2+} frecuentes), se desarrollan raramente hasta la fase de blastocisto *in vitro* o a término completo *in vivo*. Este resultado concuerda con los descubrimientos de que tanto el citoesqueleto de actina funcional como el patrón correcto de transiciones de Ca^{2+} (especialmente el tiempo total de elevación de Ca^{2+}) son cruciales para el desarrollo^{12,15,16,37-39}. Sin embargo, estos factores no se pueden usar en las instalaciones de investigación y médicas para seleccionar embriones de buena calidad ya que implican procedimientos invasivos usando colorantes fluorescentes e irradiación nociva. Por tanto, la actual práctica en la clínica de fecundación *in vitro* es valorar la viabilidad de los embriones el día 3 a partir de su morfología y crecimiento o el día 5, debido a la falta de fiabilidad de la valoración del día 3⁴⁰⁻⁴². Se puede ofrecer una ventaja considerable tomando imágenes y haciendo el seguimiento de una serie de parámetros durante los primeros dos días de desarrollo⁴³. Se puede valorar la vitalidad del embrión y su capacidad de tener éxito en el desarrollo usando la toma de imágenes no invasiva durante un periodo de tiempo más corto, justo 2 horas alrededor del tiempo de fecundación.

20 En conclusión, hemos identificado la importancia del espermatozoide en el desencadenamiento de un comportamiento oscilatorio dinámico del citoesqueleto de actomiosina en la fecundación. Los consiguientes movimientos tienen un patrón y ritmo que proporciona un método poderoso de valoración de la capacidad de un óvulo para alcanzar su potencial de desarrollo completo. Así nuestro método tiene considerable potencial en encontrar la aplicación práctica en la clínica de reproducción asistida.

Tabla 1
Amplitudes medias de picos de velocidad y movimientos de después en cigotos tratados con inhibidor y controles

		Amplitud media de picos de velocidad +/- s.d. (nm/s)	Amplitud media de movimientos de después +/- s.d. (nm/s)
Cigotos control*	Fase 1 [‡] (18 cigotos, 45 picos)	29,7 +/- 19,4	8,7 +/- 2,8
	Fase 2 (32 cigotos, 108 picos)	44,9 +/- 25,0	12,3 +/- 5,0
	Fase 3 (55 cigotos, 88 picos)	12,2 +/- 10,0	17,7 +/- 6,4
Cigotos tratados con nocodazol	Fase 1 (3 cigotos, 7 picos)	20,6 +/- 11,2	11,1 +/- 3,9
	Fase 2 (17 cigotos, 46 picos)	35,2 +/- 19,3 [§]	16,6 +/- 6,8 [¶]
	Fase 3 (66 cigotos, 115 picos)	10,4 +/- 8,5	21,5 +/- 6,7 [¶]
Cigotos tratados con taxol	Fase 1 (3 cigotos, 6 picos)	18,0 +/- 5,0 [¶]	7,9 +/- 4,3
	Fase 2 (15 cigotos, 37 picos)	29,9 +/- 21,0 [¶]	11,1 +/- 5,3
	Fase 3 (18 cigotos, 33 picos)	11,5 +/- 6,5	14,3 +/- 5,8 [¶]
Cigotos tratados con jasplaquinolida	Fase 1 [†] (1 cigoto, 3 picos)	20,9 +/- 10,1	5,2 +/- 2,1
	Fase 2 (22 cigotos, 50 picos)	14,5 +/- 8,3 [¶]	4,2 +/- 1,9 [¶]
	Fase 3 (57 cigotos, 102 picos)	10,8 +/- 7,6	3,8 +/- 2,8 [¶]

*Las amplitudes medias de picos de velocidad y movimientos de después difieren significativamente entre las fases analizadas.

[‡]Las fases post-fecundación están descritas en el texto principal.

[†]Las estadísticas no se aplicaron a valores desde la Fase 1 de cigotos tratados con jasplaquinolida debido al bajo número de estos picos/embriones.

[§]p<0,05 frente a control, [¶]p<0,01 frente a control, ^{||}p<0,0001 frente a control.

Tabla 2
Influencia de quelación de Ca²⁺ e inhibidores del citoesqueleto y sobre la velocidad citoplasmática basal en óvulos de ratón fecundados

	Cigotos control (n=82)	Óvulos no fecundados (n=55)	Cigotos tratados con BAPTA (n=20)	Cigotos tratados con nocodazol (n=38)	Cigotos tratados con taxol (n=27)	Cigotos tratados con Citocalasina D (n=21)	Cigotos tratados con jasplakinolida 3,0 +/- 0,4	Cigotos tratados con ML-7 (n=17)
Velocidad citoplasmática basal media +/- s.d. (nm/s)	9,0 +/- 1,9	4,3 +/- 1,0	15,3 +/- 3,3	11,0 +/- 1,5	7,7 +/- 1,7	3,1 +/- 0,6	A. 5,1 +/- 1,39 B. 8,3 +/- 1,1	

A – velocidad basal media antes de la transición fase M/interfase
 B – velocidad basal media después de la transición fase M/interfase
 *p<0,001 frente a cigotos control, *p<0,001 frente a cigotos control, *p<0,05 frente a cigotos control, *p<0,0001 entre valores marcados

Tabla 3
Amplitudes medias de picos de velocidad y después de movimientos de después en embriones obtenidos por ICSI o por activación con SrCl₂

Embriones obtenidos por:	Fases post-fecundación	Amplitud media de picos de velocidad +/- s.d. (nm/s)	Amplitud media de movimientos de después +/- s.d. (nm/s)
ICSI bajo la corteza	Fase 1* (6 cigotos, 9 picos)	19,5 +/- 11,1	10,7 +/- 5,9
	Fase 2 (14 cigotos, 66 picos)	34,1 +/- 15,4	12,8 +/- 5,0
	Fase 1 prolongada [†] (14 cigotos, 75 picos)	32,3 +/- 15,7	12,5 +/- 5,1
ICSI dentro del citoplasma central	Fase 3 (16 cigotos, 28 picos)	14,3 +/- 9,4	13,6 +/- 4,9
	Fase 1 prolongada [†] (31 cigotos, 209 picos)	14,6 +/- 8,2 [#]	10,5 +/- 14,7
	Fase 3 (31 cigotos, 37 picos)	10,3 +/- 6,8	12,4 +/- 3,5
Activación con SrCl ₂ [§]	Fase 1 prolongada [†] (45 partenotes, 337 picos [†])	7,4 +/- 4,0 ^{#,¶,}	7,7 +/- 2,9 ^{#,***}
ICSI con el espermatozoide inactivado y activación con SrCl ₂	Fase 1 (10 cigotos, 30 picos)	8,8 +/- 8,8	7,9 +/- 3,0
	Fase 2 (16 cigotos, 71 picos)	8,6 +/- 5,4 [#]	10,1 +/- 3,5 ^{#,††}
	Fase 3 (19 cigotos, 71 picos)	7,1 +/- 4,3 [#]	13,0 +/- 7,0

*Las fases post-fecundación están descritas en el texto principal.

[†]La fase 2 (es decir, FC completamente formado) no estaba presente en óvulos inyectados con espermatozoide dentro del citoplasma central o óvulos activados con SrCl₂, por tanto, el nombre de "Fase 1 prolongada" se refiere al periodo entre el comienzo de la formación de 2PB y la formación de pronúcleos.

[†]En el caso de óvulos activados con SrCl₂, se muestra un número total de picos de velocidad y, si los picos de velocidad estaban ausentes, movimientos de después.

[§]Picos de velocidad y movimientos de después parados en óvulos activados con SrCl₂ antes de que los pronúcleos lleguen a ser visibles, por tanto, la Fase 3 no está analizada.

[#]p<0,001 frente a una fase análoga en cigotos obtenidos por ICSI bajo la corteza; ^{||}p<0,05 frente a la Fase 1 en cigotos obtenidos por ICSI bajo la corteza; [¶]p<0,001 frente a cigotos obtenidos por ICSI dentro del citoplasma central; ^{**}p<0,01 frente a cigotos obtenidos por ICSI dentro del citoplasma central; ^{††}p<0,001 frente a Fase 1 prolongada en óvulos activados por SrCl₂.

5

Tabla 4
Dirección de vectores durante los picos de velocidad en diferentes fases post-fecundación

Fases post-fecundación [†]	Nº Total de picos de velocidad analizados	Nº de picos de velocidad con vectores que apuntan en una dirección especificada* (%):			Nº de dirección predominante
		Hacia 2PB	Entre 2PB y FC	Hacia FC	
Fase 1 (11 cigotos)	25	17 [‡] (66,7)	6 (25,9)	2 [§] (7,4)	0
Fase 2 (19 cigotos)	65	1 [‡] (1,5)	22 (33,8)	42 [§] (64,6)	0
Fase 3 (19 cigotos)	34	7 (20,6)	4 (11,8)	8 (23,5)	15 (44,1)

*La dirección del movimiento se juzgó como se describe en el Material y Métodos, [†]Fases del desarrollo del cigoto como se describe en el texto principal.

^{‡,§} p<0,0001

10

Tabla 5
Influencia de quelación de Ca²⁺ e inhibidores de citoesqueleto sobre la finalización de la meiosis en óvulos de ratón fecundados *in vivo*

5

	Nº total de cigotos*	Cigotos que no consiguieron extrudir 2PB (%)	Cigotos que extrudieron 2PB (%)
Cigotos control	52	0	52 (100)
Cigotos tratados con BAPTA	6	2 (33,3)	4 (66,7)
Cigotos tratados con nocodazol	12	7 (58,3)	5 (41,7)
Cigotos tratados con taxol	12	12 (100)	0
Cigotos tratados con Citocalasina D	10	10 (100)	0
Cigotos tratados con jasplaquinolida	23	23 (100)	0
Cigotos tratados con ML-7	13	4 (30,8)	9 (69,2)

*Se incluyeron a este análisis solamente cigotos que no extrudieron 2PB antes del comienzo del registro.

Tabla 6. Comparación entre la calidad prevista y el potencial de desarrollo real de los embriones

Nº	Nº de embriones transferidos	Velocidad basal media (nm/s)	Intervalo medio entre picos de velocidad (mm)	Nº previsto de células después de 4 días de cultivo (media +/-s.d.)	Probabilidad prevista de alcanzar la fase de blastocisto después de 4 días de cultivo (%) (media +/-s.d.)	Probabilidad estimada de éxito de desarrollo (alta o baja)	Tiempo de disección (dpc)	Nº de crías de embriones	Nº de resorciones	Eficiencia de la transferencia (%)
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	5	11,2 12,3 11,1 13,2 16,0 14,1	21,4 19,1 25,9 20,1 20,3 33,2	28 29 32 33 39-40 52 (36+/-9)	35-40 40 45-50 50-55 65-70 85-90 (56+/-19)	alta	6,5	5	-	83,3
2	6	6,7 8,6 10,5 10,4 11,2 9,4	9,4 13,6 9,2 13,1 9,7 23,2	9-10 15-16 17 19 19 23-24 (17+/-5)	0-5 5-10 5-10 10-15 10-15 20-25 (11+/-7)	baja	6,5	1	-	16,7
3	5	12,5 11,4 14,0 13,5 13,5	15,3 18,7 13,1 16,1 18,1	25-26 26 27-28 29-30 31-32 (28+/-3)	30-35 30-35 35-40 40-45 45-50 (39+/-7)	alta	19,5	4	-*	80
4	9	11,2 11,4 9,8 12,8 13,9 13,8 14,7 16,2 16,8	18,8 17,8 24,6 16,7 17 17,9 17,3 17,2 19,1	25-26 25-26 26-27 28-29 31 32 33-34 36 38-39 (31+/-5)	25-30 25-30 30-35 35-40 45-50 50 50-55 60-65 65-70 (45+/-15)	alta	19,5	7	-*	77,8
5	5	18,2 17,2 15,6	14,6 17,6 20,0	35-40 38 38-39	60-70 65-70 65-70	alta	19,5	5	-*	100

	16,2	20,7	40-41	70-75					
	15,9	29,7	53-54 (42+/-7)	80-90 (72+/-8)					
6	5	20,5	30-31	40-45	alta	19,5	5	-*	100
		12,7	33	50					
		13,7	33-34	55-55					
		12,4	35-36	55-60					
		12,8	36-37 (34+/-2) ²	55-60 (52+/-6)					
7	5	10,0	10-15	5	baja	19,5	3	0	60
		11,3	18	10					
		10,4	18	10					
		10,2	21-22	15-20					
		10,5	22-23 (19+/-4)	20 (13+/-6)					
8	6	8,1	11-12	0-5	baja	19,5	1	2	16,7
		9,4	13-14	0-5					
		9,2	18-19	10-15					
		10,1	20-21	15-20					
		10,2	20-21	15-20					
		13,3	21-22 (18+/-4)	20 (12+/-8)					
9	4	9,5	10	0-5	baja	19,5	1*	1	25
		9,2	14-15	0-5					
		9,8	14-15	5-10					
		7,2	18-19 (14+/-3)	10-15 (6+/-5)					
10	4	6,6	13-14	0-5	baja	19,5	1*	3	25
		10,1	14-15	0-5					
		13,5	19-20	10-20					
		12,1	20-22 (17+/-4)	15-20 (9+/-8)					

* Administrado naturalmente sobre 19,5 dpc.

²Encontrado muerto después de 2 días.

Tabla 7 Especificaciones ópticas de los sistemas de toma de imagen usados en los experimentos

	Zeiss LSM 510 Meta	Zeiss Axiovert	Deltavision
Aumento del objetivo	20x*	20x	20x
Objetivo NA	0,75	0,75	0,75
Condensador NA	0,55	0,55	0,55
Tamaño de chip de la cámara (píxeles)	-#	1024x1344	512x512
<i>Binning</i>	-	2x2	1x1

*Se incrementó el área del escaneado digitalmente antes de escanear 0,7x (aumento final 14x)
 #Se escanearon las imágenes con resolución de 1.800x1.800 píxeles.

Referencias

5 1. Roegiers, F., McDougall, A. & Sardet, C. "The sperm entry point defines the orientation of the calcium-induced contraction wave that directs the first phase of cytoplasmic reorganization in the ascidian egg". *Development* 121, 3.457-3.466 (1995).

10 2. Sardet, C., Paix, A., Prodon, F., Dru, P. & Chenevert, J. "From oocyte to 16-cell stage: cytoplasmic and cortical reorganizations that pattern the ascidian embryo". *Dev Dyn* 236, 1.716-1.731 (2007).

3. Speksnijder, J.E., Sardet, C. & Jaffe, L.F. "The activation wave of calcium in the ascidian egg and its role in ooplasmic segregation". *J Cell Biol* 110, 1.589-1.598 (1990).

4. Stack, C., Lucero, A.J. & Shuster, C.B. "Calcium-responsive contractility during fertilization in sea urchin eggs". *Dev Dyn* 235, 1.042-1.052 (2006).

15 5. Weaver, C. & Kimelman, D. "Move it or lose it: axis specification in *Xenopus*". *Development* 131, 3.491-3.499 (2004).

6. Gerhart, J. y col. "Cortical rotation of the *Xenopus* egg: consequences for the anteroposterior pattern of embryonic dorsal development". *Development* 107 Supl, 37-51 (1989).

20 7. Abbott, A.L. & Ducibella, T. "Calcium and the control of mammalian cortical granule exocytosis". *Front Biosci* 6, D792-806 (2001).

8. FitzHarris, G., Marangos, P. & Carroll, J. "Cell cycle-dependent regulation of structure of endoplasmic reticulum and inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca²⁺ release in mouse oocytes and embryos". *Mol Biol Cell* 14, 288-301 (2003).

25 9. Sun, Q.Y. y col. "Translocation of active mitochondria during pig oocyte maturation, fertilization and early embryo development in vitro". *Reproduction* 122, 155-163 (2001).

10. Ducibella, T. & Fissore, R. "The roles of C²⁺, downstream protein kinases, and oscillatory signaling in regulating fertilization and the activation of development". *Dev Biol* 315, 257-279 (2008).

11. Tombes, R.M., Simerly, C., Borisy, G.G. & Schatten, G. "Meiosis, egg activation, and nuclear envelope breakdown are differentially reliant on C²⁺, whereas germinal vesicle breakdown is Ca²⁺ independent in the mouse oocyte". *J. Cell Biol.* 117, 799-811 (1992).

30 12. Toth, S., Huneau, D., Banrezes, B. & Ozil, J.P. "Egg activation is the result of calcium signal summation in the mouse". *Reproduction* 131, 27-34 (2006).

13. Ozil, J.P. y col. "Egg activation events are regulated by the duration of a sustained [Ca²⁺]cyt signal in the mouse". *Dev. Biol.* 282, 39-54 (2005).

35 14. Ducibella, T. y col. "Egg-to-embryo transition is driven by differential responses to Ca(2+) oscillation number". *Dev. Biol.* 250, 280-291 (2002).

15. Ozil, J.P., Banrezes, B., Toth, S., Pan, H. & Schultz, P.M. "Ca²⁺ oscillatory pattern in fertilized mouse eggs affects gene expression and development to term". *Dev. Biol.* 300, 534-544 (2006).

40 16. Ozil, J.P. & Huneau, D. "Activation of rabbit oocytes: the impact of the Ca²⁺ signal regime on development". *Development* 128, 917-928 (2001).

17. Maro, B., Johnson, M.H., Nickering, S.J. & Flach, G. "Changes in actin distribution during fertilization of the mouse egg". *J. Embryol Exp. Morphol.* 81, 211-237 (1984).

18. Maro, B., Johnson, M.H., Webb, M. & Flach, G. "Mechanism of polar body formation in the mouse oocyte: an interaction between the chromosomes, the cytoskeleton and the plasma membrane". *J. Embryol Exp. Morphol.* 92, 11-32 (1986).

45 19. Gray, D. y col. "First cleavage of the mouse embryo responds to change in egg shape at fertilization". *Curr. Biol.* 14, 397-405 (2004).

20. Deguchi, R., Shirakawa, H., Oda, S., Mohri, T. & Miyazaki, S. "Spatiotemporal analysis of Ca(2+) waves in relation to the sperm entry site and animal-vegetal axis during C(2+) oscillations in fertilized mouse eggs". *Dev. Biol.* 218, 299-313 (2000).

50 21. Raffel, M., Willert, C.E. & Kompenhans, J. (Springer, 1998).

22. Willert, C.E. & Gharib, M. "Digital particle image velocimetry". *Exp. Fluids* 10, 181-193 (1991).

23. Keane, R.D. & Adrian, R. J. "Theory of cross-correlation analysis of PIV images". *Appl. Sci. Res.* 49, 191-215 (1992).

55 24. Westerweel, J. "Fundamental of digital particle image velocimetry". *Measurement Science and Technology* 8, 1.379-1.392 (1997).

25. Simerly, C., Nowak, G., de Lanerolle, P. & Schatten, G. "Differential expression and functions of cortical myosin IIA and IIB isotopes during meiotic maturation, fertilization, and mitosis in mouse oocytes and embryos".

- Mol. Biol. Cell* 9, 2.509-2.525 (1998).
26. Schuh, M. & Ellenberg, J. "A new model for asymmetric spindle positioning in mouse oocytes". *Curr. Biol.* 18, 1.986-1.992 (2008).
- 5 27. Tinevez, J.Y. y col. "Role of cortical tension in bleb growth". *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 106, 18.581-18.586 (2009).
28. Deng, M., Williams, C.J. & Schultz, P.M. "Role of MAP kinase and myosin light chain kinase in chromosome-induced development of mouse egg polarity". *Dev. Biol.* 278, 358-366 (2005).
29. Swann, K. & Ozil, J.P. "Dynamics of the calcium signal that triggers mammalian egg activation". *Int. Rev. Cytol.* 152, 183-222 (1994).
- 10 30. Gline, D. & Kline, J.T. "Repetitive calcium transients and the role of calcium in exocytosis and cell cycle activation in the mouse egg". *Dev. Biol.* 149, 80-89 (1992).
31. Furuta, A. y col. "Microtubule disruption with BAPTA and dimethyl BAPTA by a calcium chelation-independent mechanism in 3T3-L1 adipocytes". *Endocr. J.* 56, 235-243 (2009).
- 15 32. Xu, N., Luo, K.Q. & Chang, D.C. "Ca²⁺ signal blockers can inhibit M/A transition in mammalian cells by interfering with the spindle checkpoint". *Biochem Biophys Res Commun* 306, 737-745 (2003).
33. Deng, M., Suraneni, P., Schultz, R.M. & Li, R. "The Ran GTPase mediates chromatin signaling to control cortical polarity during polar body extrusion in mouse oocytes". *Dev. Cell* 12, 301-308 (2007).
34. Halet, G., Unwell, R., Parkinson, S.J. & Carroll, J. "Conventional PKCs regulate the temporal pattern of Ca²⁺ oscillations at fertilization in mouse eggs". *J. Cell Biol.* 164, 1.033-1.044 (2004).
- 20 35. Markoulaki, S., Matson, S. & Ducibella, T. "Fertilization stimulates long-lasting oscillations of CaMKII activity in mouse eggs". *Dev. Biol.* 272, 15-25 (2004).
36. Markoulaki, S., Mation, S., Abbott, A.L. & Ducibella, T. "Oscillatory CaMKII activity in mouse egg activation". *Dev. Biol.* 258, 464-474 (2003).
- 25 37. Shawlot, W., Deng, J.M., Fohn, L.E. & Behringer, R.R. "Restricted beta-galactosidase expression of a hygromycinlacZ gene targeted to the beta-actin locus and embryonic lethality of beta-actin mutant mice". *Transgenic Res* 7, 95-103 (1998).
38. Shmerling, D. y col. "Strong and ubiquitous expression of transgenes targeted into the beta-actin locus by Cre/lox cassette replacement". *Genesis* 42, 229-235 (2005).
39. Bunnell, T.M. & Ervasti, J.M. "Delayed embryonic development and impaired Cell growth and survival in Actg1 null mice". *Cytoskeleton* (Hoboken) 67, 564-572.
- 30 40. Scott, L. "Embryological strategies for overcoming recurrent assisted reproductive technology treatment failure, Hum Fertil (Camb) 5, 206-214 (2002).
41. Bromer, J.G. & Seli, E. "Assessment of embryo viability in assisted, reproductive technology: shortcomings of current approaches and the emerging role of metabolomics". *Curr. Opin Obstet Gynecol* 20, 234-241 (2008).
- 35 42. Scott, L. "The biological basis of non-invasive strategies for selection of human oocytes and embryos". *Hum. Reprod. Update* 9, 237-249 (2003).
43. Wong, C.C. y col. "Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage". *Hat Biotechnol* 28, 1.115-1.121.
- 40 44. Plusa, B. y col. "Downregulation of Par3 and aPKC function directs cells towards the ICM in the preimplantation mouse embryo". *J. Cell Sci.* 118, 505-515 (2005).
45. Fraser, L. "C²⁺ is required for mouse sperm capacitation and fertilization in vitro". *J. Androl* 3, 412-419 (1982).
46. Kamm, K.E. & Stull, J.T. "Dedicated myosin light chain kinases with diverse cellular functions". *J. Biol. Chem.* 276, 4.527-4.530 (2001).
47. Sveen, J. "An introduction to MatPIV v. 1.6.1". *Mechanics and Applied Mathematics* 27 (2004).
- 45 48. Westerweel, J. "Theoretical analysis of the measurement precision in particle image velocimetry". *Exp. Fluids* 29, S3-S12 (2000).
49. Kimura, Y. & Yanagimachi, R. "Intracytoplasmic sperm injection in the mouse". *Biol. Reprod.* 52, 709-720 (1995).
- 50 50. Meilhac, S.M. y col. "Active cell movements coupled to positional induction are involved in lineage segregation in the mouse blastocyst". *Dev. Biol.* 331, 210-221 (2009).
51. Lawless, J. "Negative binomial and mixed Poisson regression". *Canadian Journal of Statistics* 15, 209-225 (1987).
- 55 52. Saunders CM, Larman MG, Parrington J, Cox LJ, Royse J, Blayney LM, Swann K, Lai FA. "PLC ζ : a spermspecific trigger of Ca²⁺ oscillations in eggs and embryo development". *Development* 2002; 129:3.533-3.544.
53. Swann K, Saunders CM, Rogers N, Lai FA. "PLC ζ (zeta): A sperm protein that triggers Ca²⁺ oscillations and egg activation in mammals". *Sem. Cell & Dev. Biol.* 2006; 17:264-73.
54. Yu Y, Saunders CM, Lai FA, Swann K. "Preimplantation development of mouse oocyte activated by different levels of human phospholipase C ζ ". *Hum. Reprod.* 2008; 23:365-373.
- 60 55. Rogers NT, Hobson E, Pickering S., Lai FA, Braude P, Swann K. "PLC ζ causes Ca²⁺ oscillations and parthenogenetic activation of human oocytes". *Reproduction* 2004; 128:697-702.
56. Yoneda A, Kashima M, Yoshida S, Terada K, Nakagwa S, Sakamoto A, Hayakawa K, Suzuki K, Ueda J, Watanabe, T. "Molecular cloning, testicular expression and oocyte activation potential of porcine phospholipase C zeta". *Reproduction* 2006; 132:393-401.
- 65 57. Ross P.J., Beyhan Z., Iager A.E., Yoon S.Y., Schellander K., Fissore R.A., Cibelli J.B. "Parthenogenetic activation of bovine oocytes using bovine and murine phospholipase C zeta". *BMC Dev. Biol.* 2008; 8:16.
58. Ajduk A., Ilozue T., Windsor S., Yu Y., Seres K.B., Bomphrey R.J., Tom B.D., Swann K., Thomas A., Graham

- C., ZernickaGoetz M. "Rhythmic actomyosin-driven contractions induced by sperm entry predict mammalian embryo viability". *Nature Commun* 2011; 2:417.
59. Summers M.C., Bhatnagar P.R., Lawitts J.A., Biggers J.D. "Fertilization in vitro of mouse ova from inbred and outbred strains: complete preimplantation embryo development in glucose-supplemented KSOM". *Biol. Reprod.* 1995; 53:431-7.
- 5 60. Nomikos M., Blayney L.M., Larman M.G., Campbell K., Rossbach A., Saunders C.M., Swann K., Lai F.A." Role of Phospholipase C- ζ Domains in Ca²⁺-dependent Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate Hydrolysis and Cytoplasmic Ca²⁺ Oscillations". *J. Biol. Chem.* 2011;280:31.011-31.018.
- 10 61. Nomikos M., Elgmati K., Theodoridou M., Calver B.L., Combes B., Nounesis G., Swann K., Lai F.A. "Male infertilitylinked point mutation disrupts the Ca²⁺ oscillation-inducing and PIP(2) hydrolysis activity of sperm PLCzeta". *Biochem J.* 2011; 434:211-217.
62. Nomikos M., Elgmati K., Theodoridou M., Calver B.L., Nounesis G., Swann K., Lai F.A. "Phospholipase C ζ binding to PtdIns(4,5)P₂ requires the XY-linker region". *J. Cell Sci.* 2011; 124:2582-90.

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* de valoración del potencial de desarrollo de un embrión de mamífero, por ejemplo, un embrión de mamífero que ha sido fecundado *in vitro*, comprendiendo el método
- 5 (a) tomar mediciones de los movimientos citoplasmáticos en el embrión en la fase de una célula y, opcionalmente tomar más mediciones adicionales de cambios periódicos en la forma del embrión en la fase de una célula y
- 10 (b) usar las mediciones para predecir el potencial de desarrollo del embrión.
2. El método según la reivindicación 1, en el que (i) las mediciones de los movimientos citoplasmáticos son mediciones de la velocidad citoplasmática promedio en el embrión unicelular o (ii) los cambios periódicos en la forma del embrión son pulsaciones del cono de fecundación (pulsaciones de FC).
- 15 3. El método según la reivindicación 2, en el que las mediciones son tomadas durante un periodo de tiempo que es suficiente para identificar dos picos de velocidad sucesivos o pulsaciones de FC y calculándose el intervalo de tiempo entre los dos picos de velocidad o pulsaciones de FC, por ejemplo, correlacionándose un intervalo más largo o un intervalo promedio más largo entre picos de velocidad o pulsaciones de FC con una predicción de mayor potencial de desarrollo.
- 20 4. El método según la reivindicación 3, en el que el potencial de desarrollo del embrión se predice comparando el intervalo o el intervalo promedio entre picos de velocidad o pulsaciones de FC con uno o más valores de referencia predeterminados, por ejemplo, siendo los picos de velocidad o pulsaciones de FC sincrónicos con transiciones de Ca^{2+} en el embrión.
- 25 5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en donde la velocidad citoplasmática promedio se mide antes de que se registre el primer pico de velocidad, entre los picos de velocidad y/o después del último pico de velocidad registrado, la velocidad promedio se calcula a lo largo del tiempo, siendo esta la velocidad citoplasmática basal promedio, por ejemplo, en donde una velocidad citoplasmática basal promedio más rápida se correlaciona con una predicción de mayor potencial de desarrollo, y, opcionalmente, prediciéndose el potencial de desarrollo del embrión comparando la velocidad citoplasmática basal promedio con uno o más valores de referencia predeterminados.
- 30 6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el embrión unicelular está en una fase de desarrollo entre la fecundación y la formación de los pronúcleos, por ejemplo, estando el embrión unicelular en un fase de desarrollo entre la fecundación y la regresión del cono de fecundación, por ejemplo, estando el embrión de mamífero en una fase de desarrollo en la que el cono de fecundación está completamente formado, y, opcionalmente, basándose la predicción del potencial de desarrollo en las mediciones tomadas durante todo el periodo cuando está presente el cono de fecundación.
- 35 40 7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde tomar las mediciones comprende la captura de imágenes a intervalos de tiempo seguido del análisis de imagen cuantitativa, por ejemplo, en el que las imágenes se capturan a partir (i) de un solo plano a través del embrión unicelular, (ii) un plano a través del centro del embrión unicelular y/o (iii) un plano que corta el cono de fecundación del embrión unicelular.
- 45 8. El método según la reivindicación 7, en el que las imágenes del embrión se toman mientras se le está manteniendo en una pequeña gota de medio y, opcionalmente, siendo el embrión uno de un grupo compacto de embriones unicelulares en la pequeña gota de medio.
- 50 9. El método según la reivindicación 7 o la reivindicación 8, en donde la captura de imágenes se realiza dentro de las 4 horas siguientes a la fecundación, por ejemplo, después de 2 horas desde la fecundación.
10. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en donde
- 55 (i) el análisis de imágenes cuantitativo usa velocimetría de imágenes de partícula (PIV); y/o
- (ii) en donde la toma de las mediciones es no invasiva; y/o
- (iii) en donde las mediciones son tomadas en ausencia de colorante citoplasmático en el embrión; y/o
- (iv) en donde la toma de las mediciones no interfiere con la función del citoesqueleto; y/o
- (v) en donde la toma de las mediciones no interfiere con la formación del cono de fecundación; y/o
- 60 (vi) en donde la predicción del potencial de desarrollo comprende la determinación de la probabilidad de que el embrión se desarrollará hasta la fase de blastocisto; y/o
- (vii) en donde el potencial de desarrollo comprende la tasa de división celular del embrión en un cultivo posterior; y/o
- (viii) en donde el potencial de desarrollo comprende el número de células en el embrión que se desarrollará después de cuatro días de un cultivo posterior; y/o
- 65 (ix) en donde la predicción del potencial de desarrollo comprende determinar la probabilidad de que el embrión se desarrollará a término completo después de transferirse a un receptor materno; y/o

(x) en donde el método se realiza dentro de las 24 horas siguientes a la fecundación; y/o
 (xi) en donde el método se realiza dentro de las 4 horas siguientes a la fecundación; y/o
 (xii) en donde solamente las mediciones de los movimientos citoplasmáticos y/o las pulsaciones del cono de fecundación en el embrión se usan para valorar el potencial de desarrollo del embrión.

5 11. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde adicionalmente los embriones se cultivan, y opcionalmente en donde el grado del desarrollo y/o la morfología del embrión en cultivo son usados además para valorar el potencial de desarrollo del embrión.

10 12. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el embrión de mamífero es (i) un embrión de mamífero no humano, (ii) un embrión de ratón, (iii) un embrión de animal de ganado o (iv) un embrión humano.

15 13. Un método de fecundación *in vitro*, que comprende la fecundación de un óvulo de mamífero y la valoración del potencial de desarrollo del embrión resultante según el método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

20 14. Un método de selección entre una pluralidad de embriones de uno o más embriones adecuados para su uso en un método de reproducción asistida, comprendiendo el método la valoración del potencial de desarrollo de cada embrión según el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 y la selección de uno o más embriones basándose en su potencial de desarrollo previsto.

25 15. Un método de clasificación de uno o más embriones en una población de embriones según el potencial de desarrollo, comprendiendo el método la valoración del potencial de desarrollo de cada embrión en la población según el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, y la clasificación de cada embrión basándose en su potencial de desarrollo previsto y opcionalmente la selección adicional entre la pluralidad de embriones de uno o más embriones adecuados para su uso en un método de reproducción asistida basándose en su potencial de desarrollo previsto;

30 por ejemplo, en donde tener un intervalo calculado o un intervalo promedio entre picos de velocidad o pulsaciones de FC que es mayor, por ejemplo, al menos la mitad de una desviación estándar mayor o al menos una desviación estándar mayor, que el intervalo medio de población o el intervalo promedio entre picos de velocidad y/o tener una velocidad citoplasmática basal promedio que es más rápida, por ejemplo, al menos la mitad de una desviación estándar más rápida o al menos 1 desviación estándar más rápida, que la velocidad citoplasmática basal promedio media de la población es indicativo de un embrión que tiene alto potencial de desarrollo.

35 16. Un sistema para llevar a cabo el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, comprendiendo el sistema uno o más sensores para capturar imágenes a intervalos de tiempo de los embriones y al menos un procesador en comunicación con el al menos un sensor, estando programado el procesador con instrucciones legibles por ordenador para llevar a cabo un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores para capturar y transformar dichas imágenes en una predicción del potencial de desarrollo del embrión.

40 17. El sistema según la reivindicación 16:

45 (i) que comprende una cámara climática para controlar la temperatura y/o la exposición a pH del embrión;
 (ii) que comprende una fase calentada para controlar la temperatura del embrión; y/o
 (iii) en el que el uno o más sensores se configuran para usar luz transmitida blanca para capturar las imágenes a intervalos de tiempo.

Fig. 1A

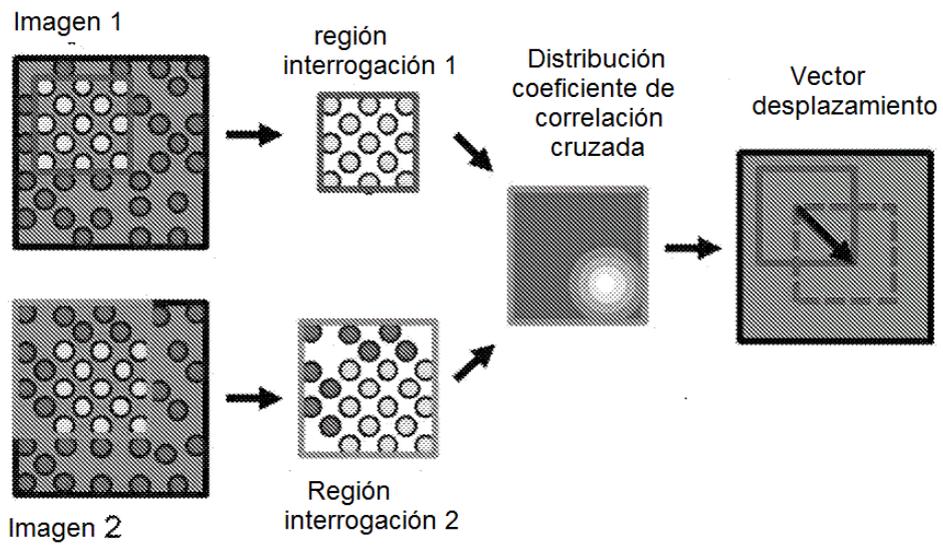


Fig. 1B

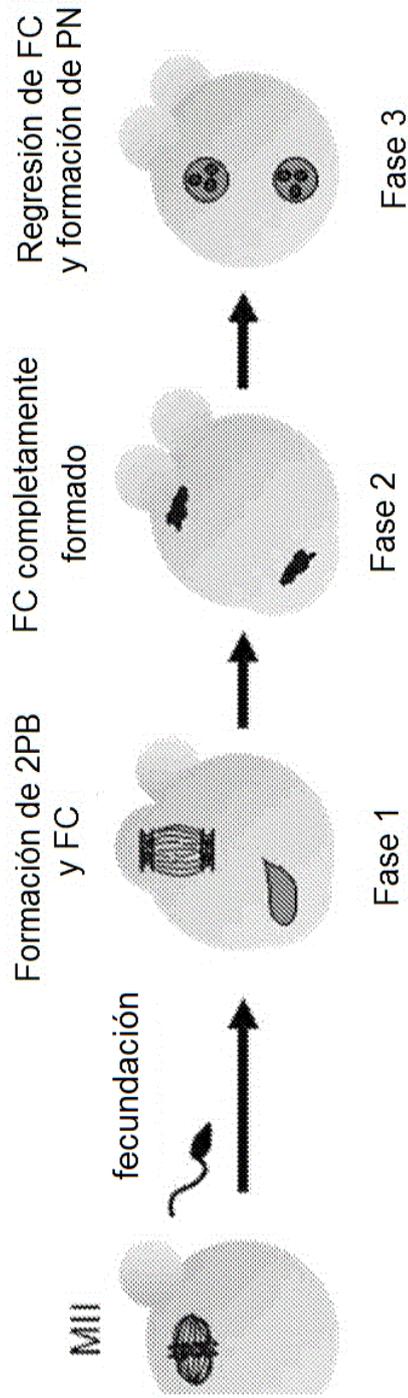


Fig. 1C

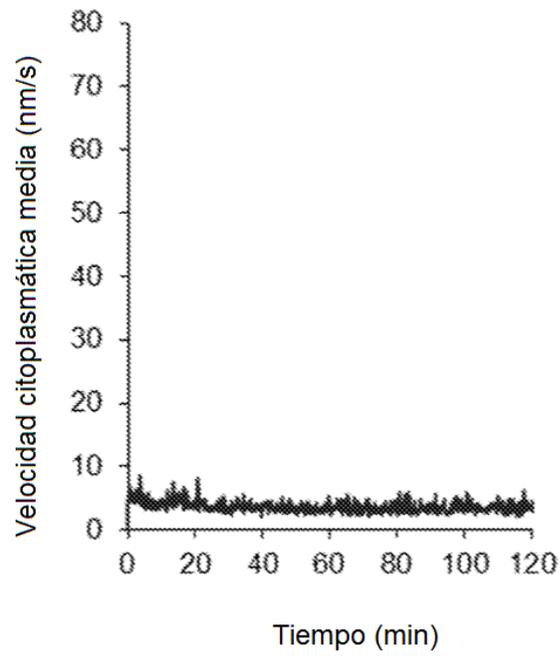


Fig. 1D

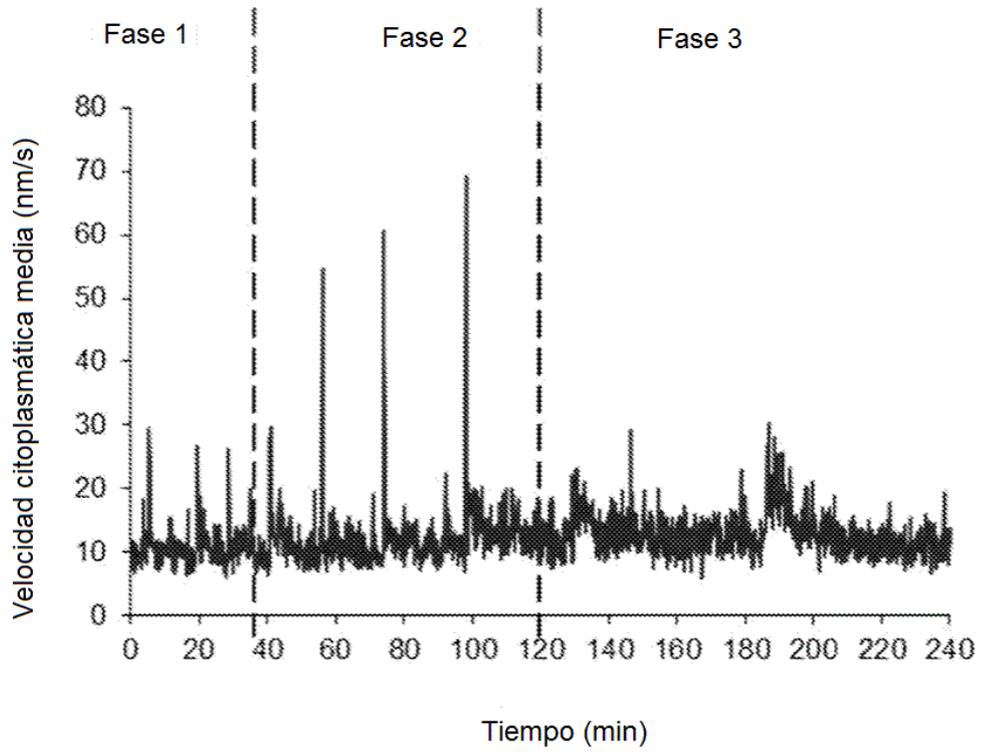


Fig. 1E

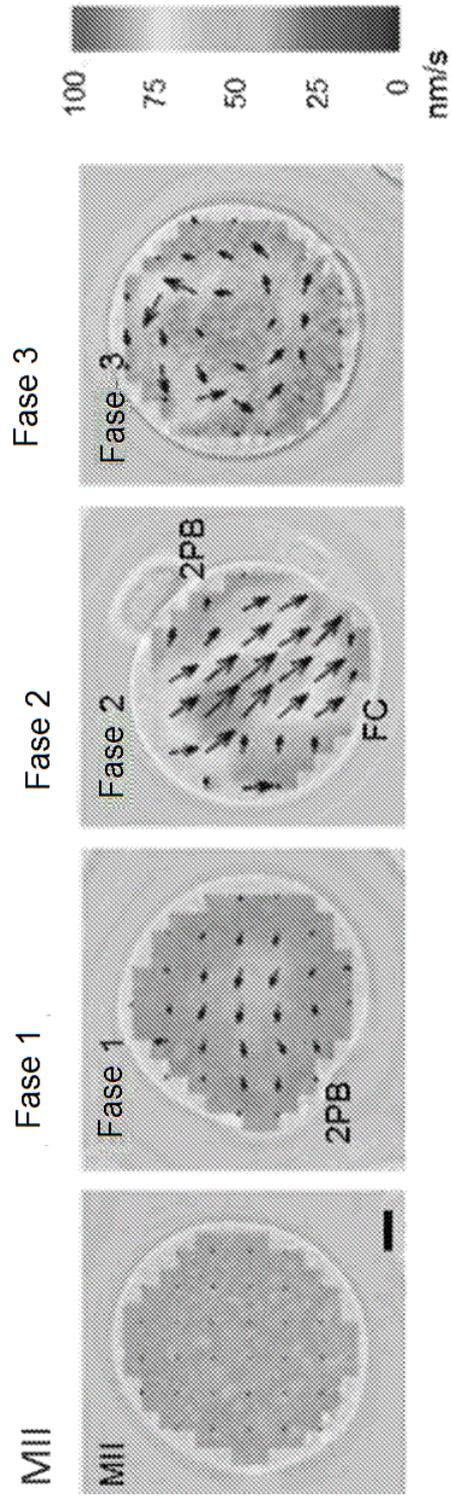
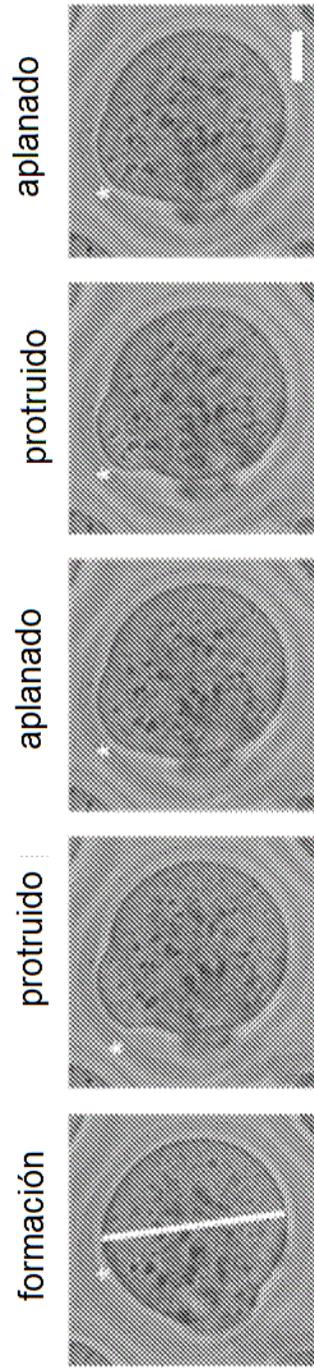


Fig. 2A



Cambios en forma de FC:

Fig. 2B

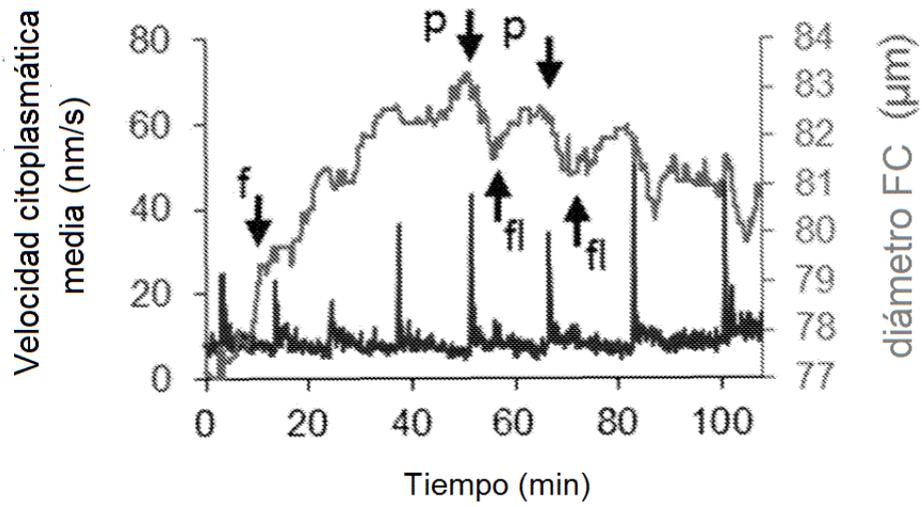


Fig. 2C

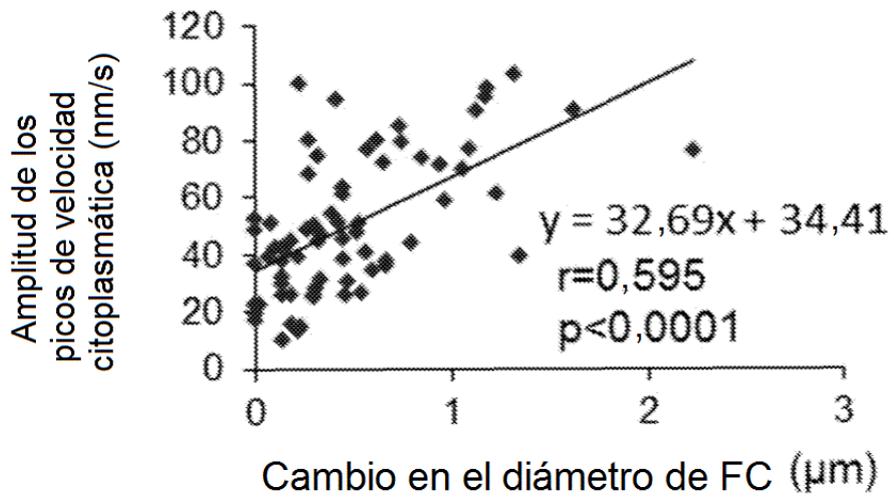


Fig. 2D

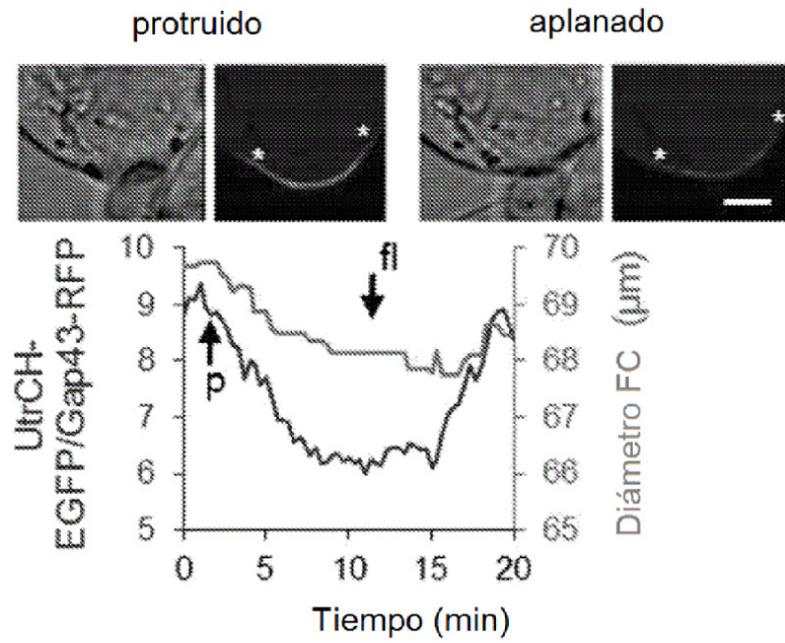


Fig. 2E

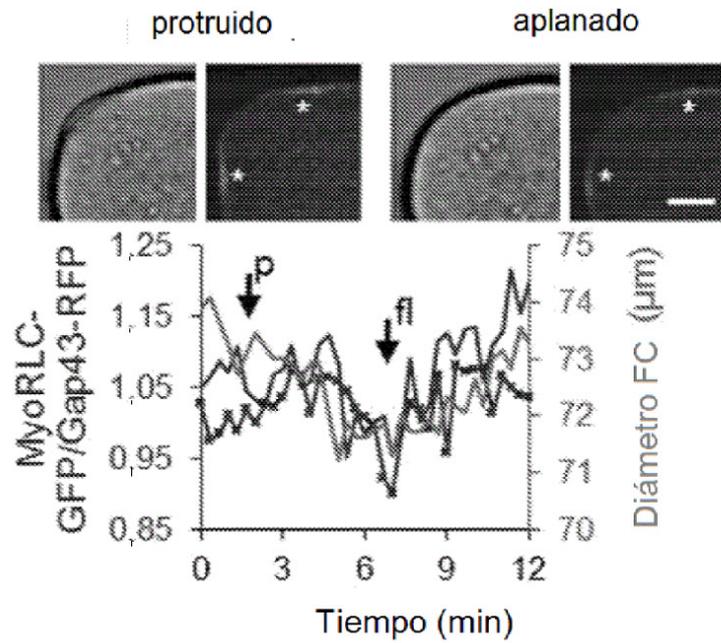


Fig. 2F

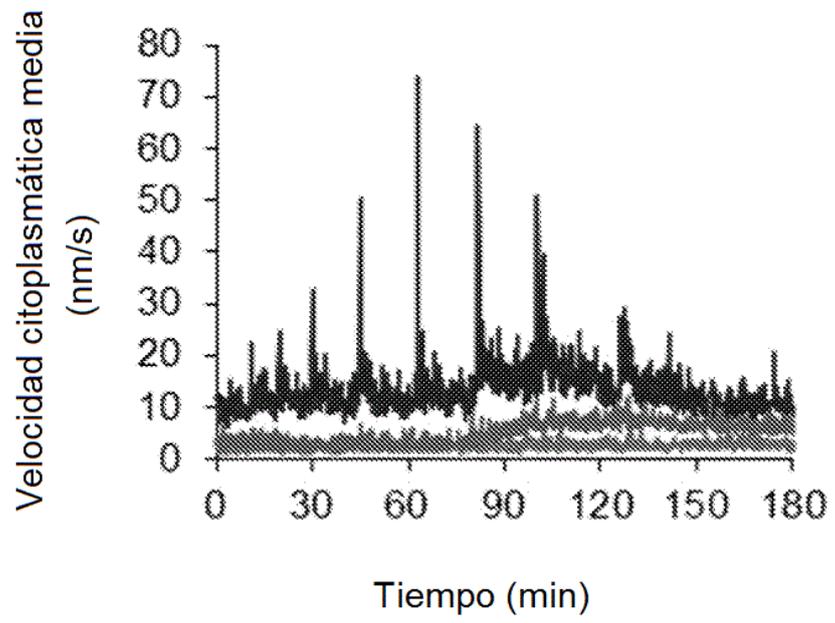


Fig. 2G

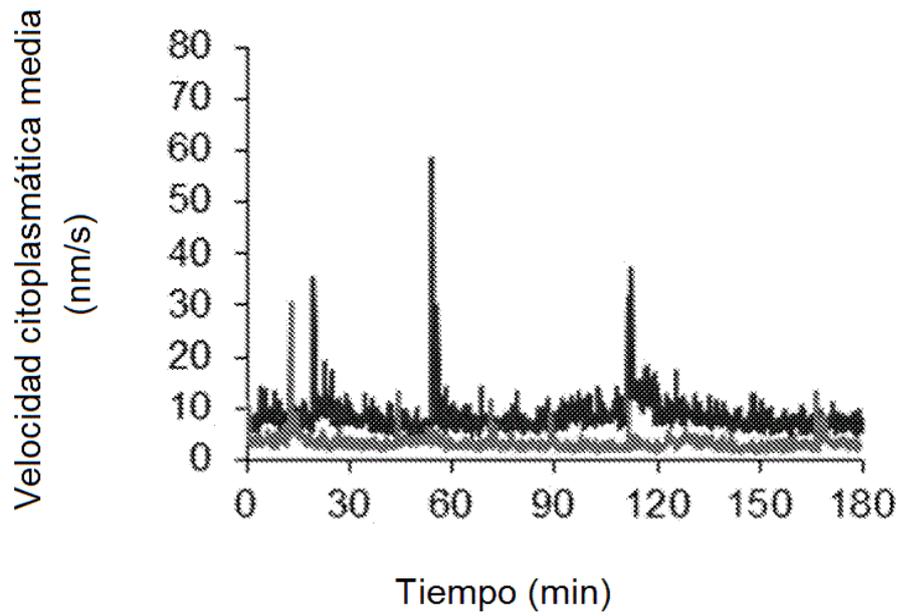


Fig. 3A

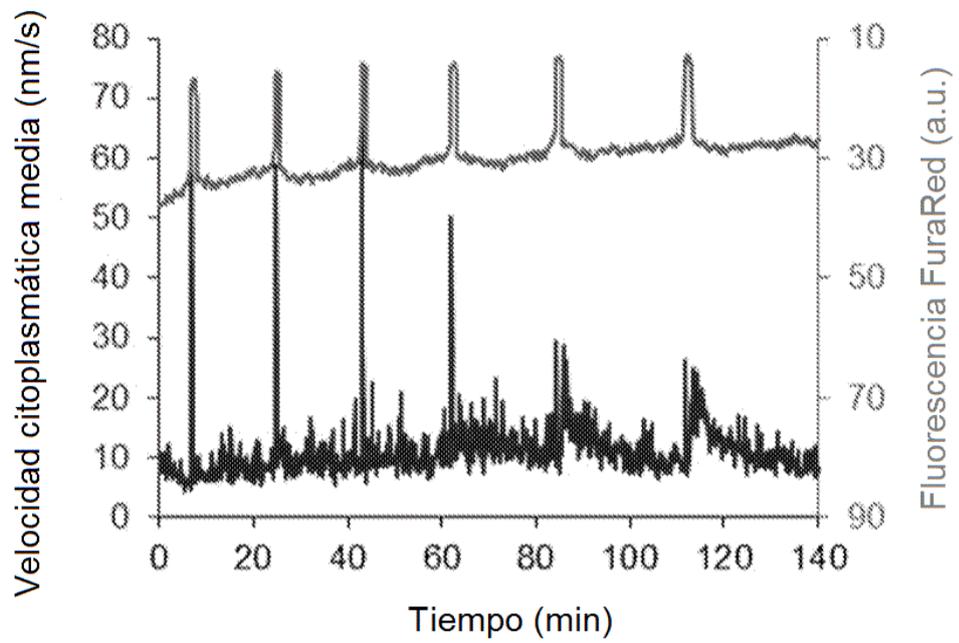


Fig. 3B

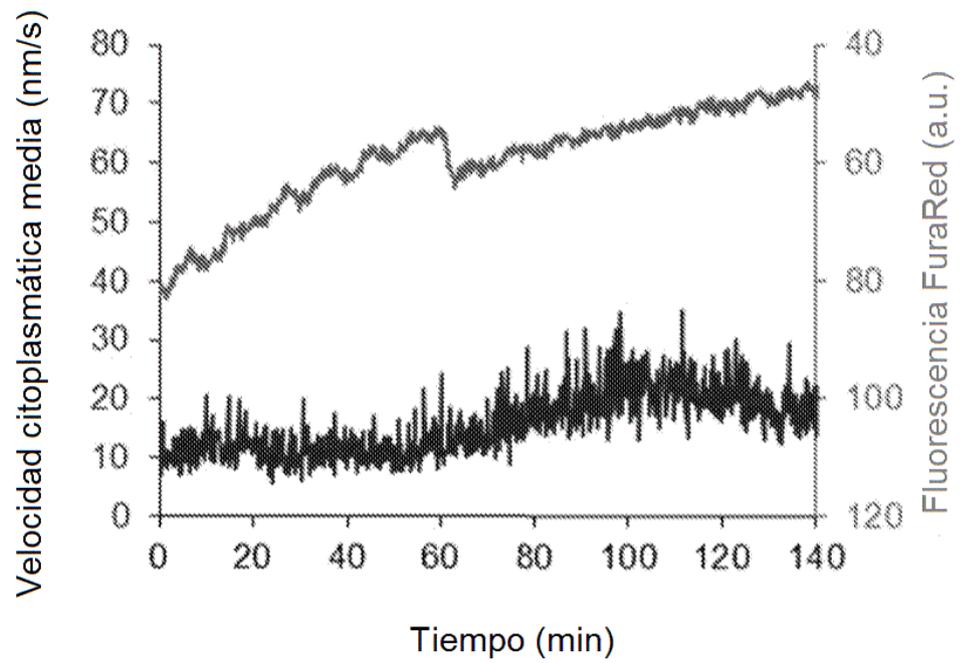


Fig. 3C

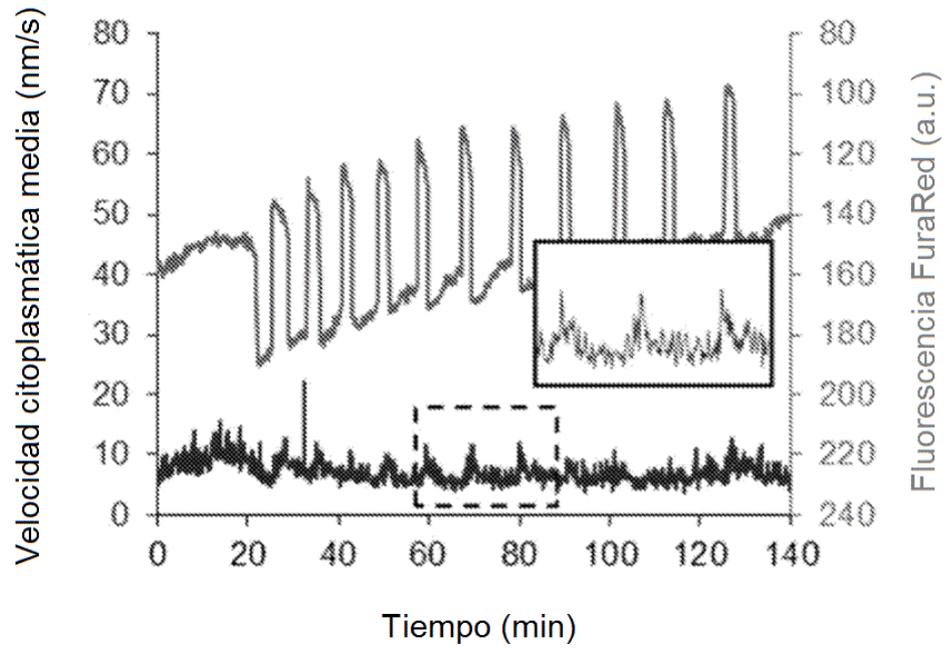


Fig. 4A

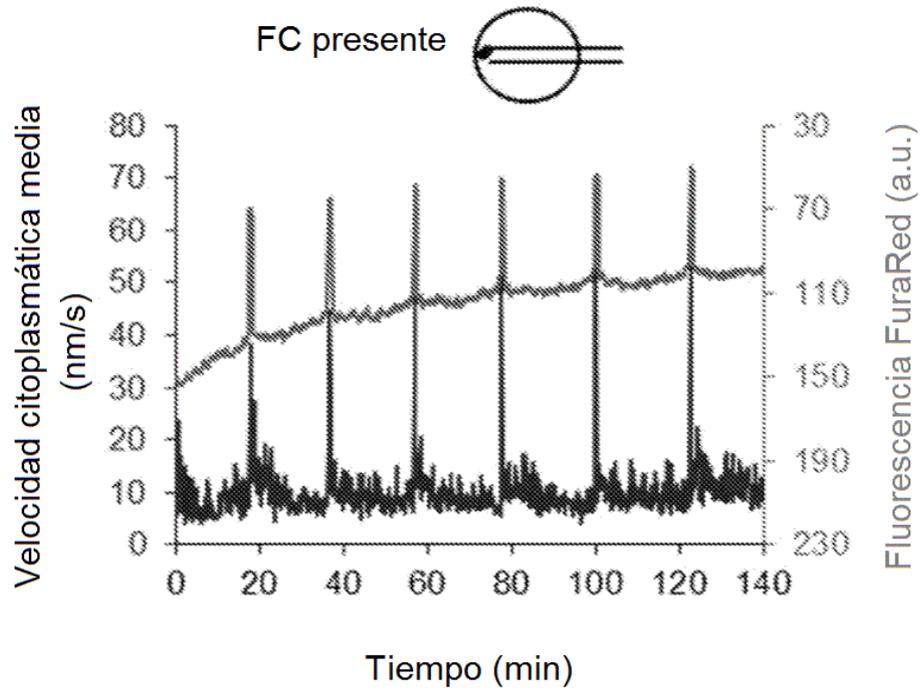


Fig. 4B

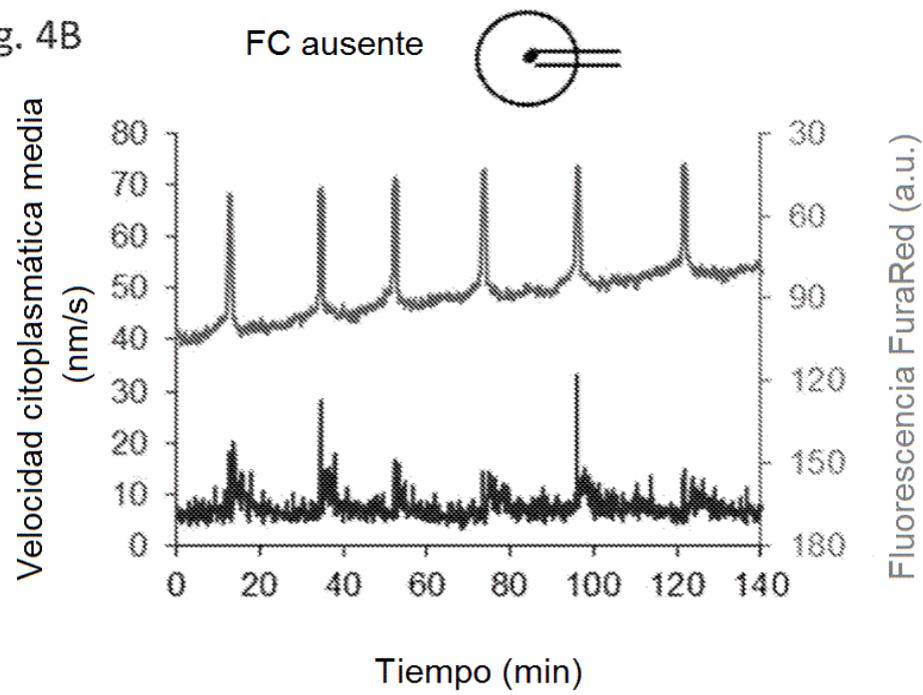


Fig. 4C

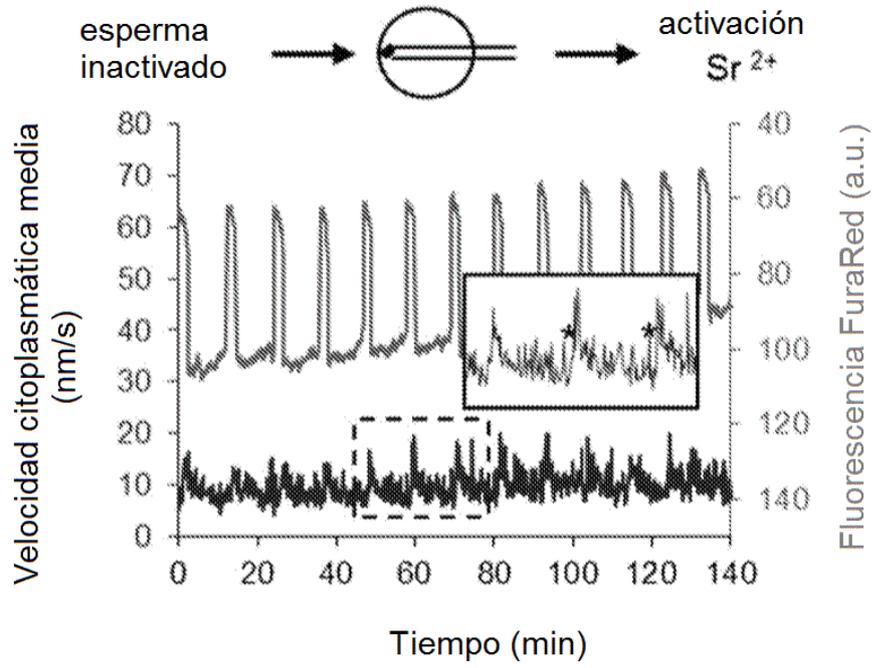


Fig. 4D

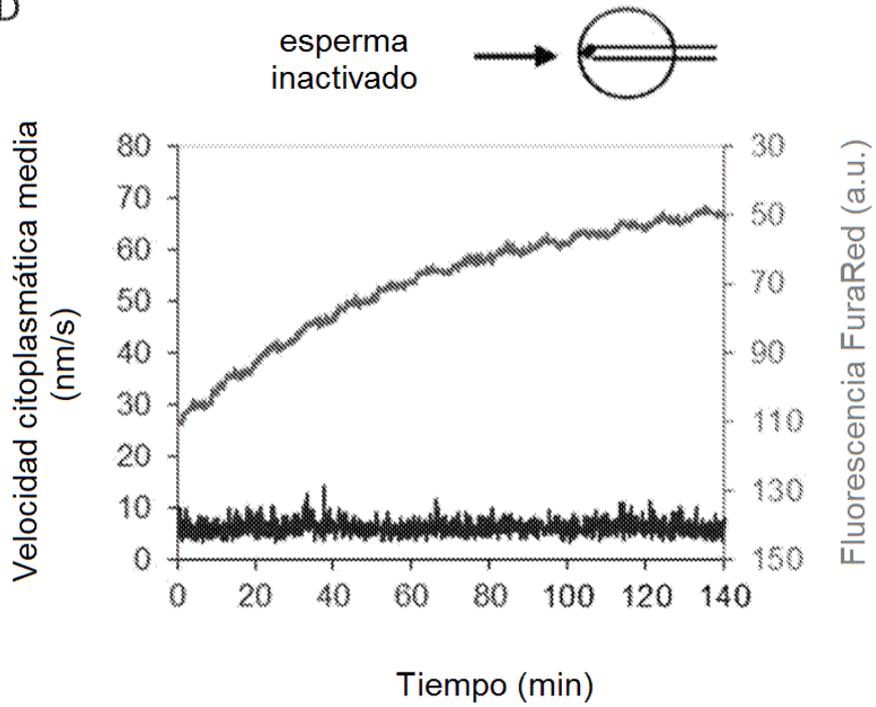


Fig. 5A

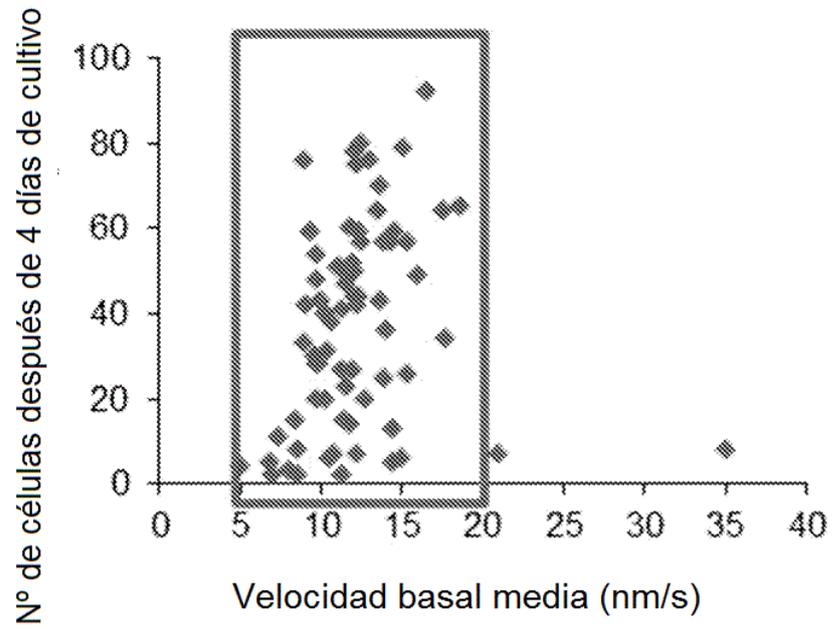


Fig. 5B

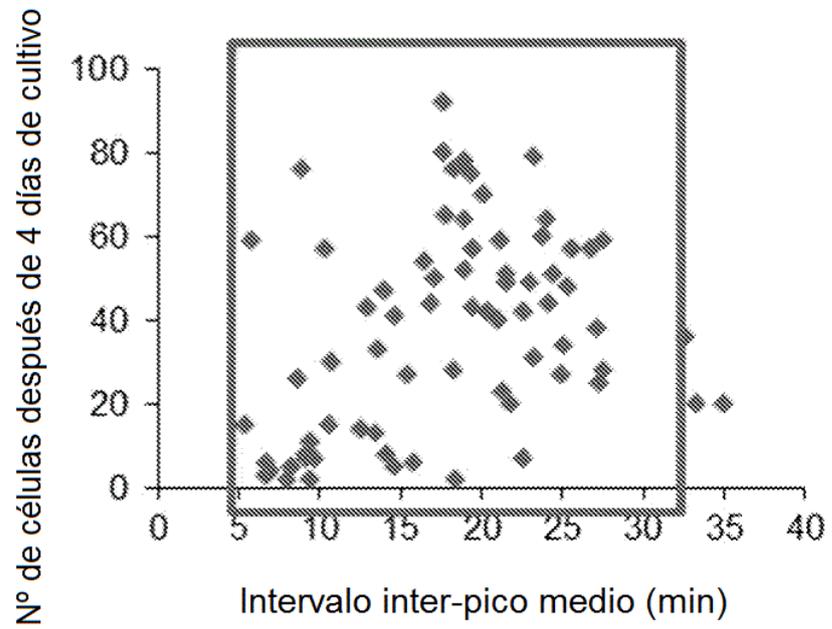


Fig. 5C

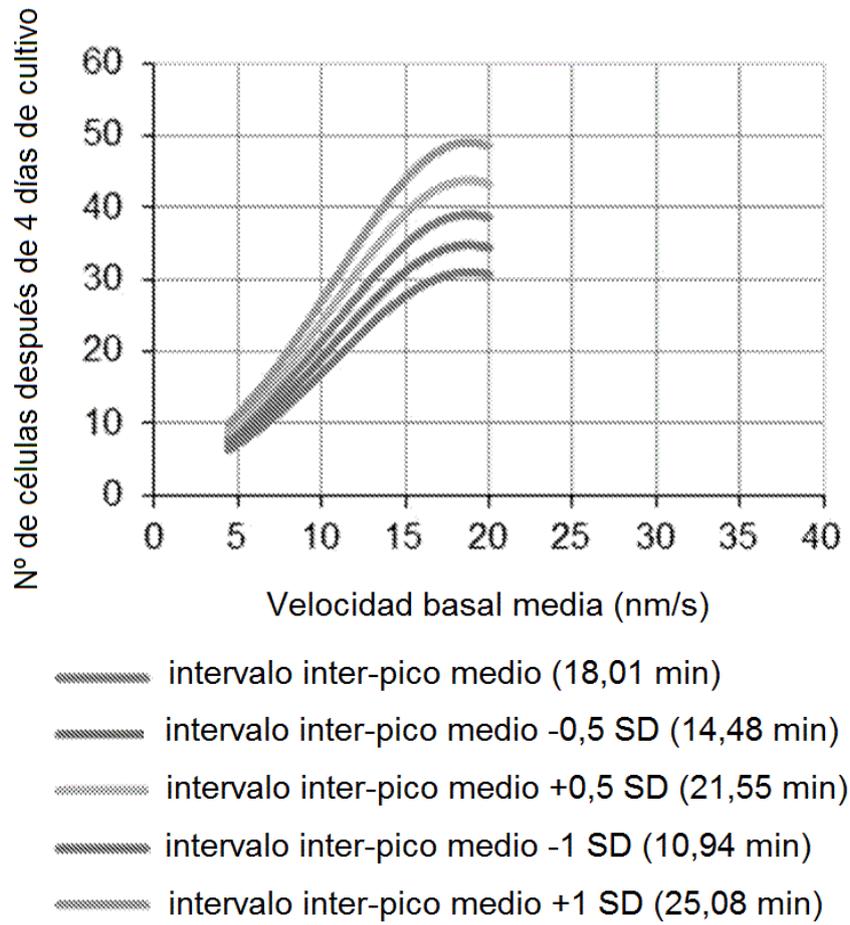


Fig. 5D

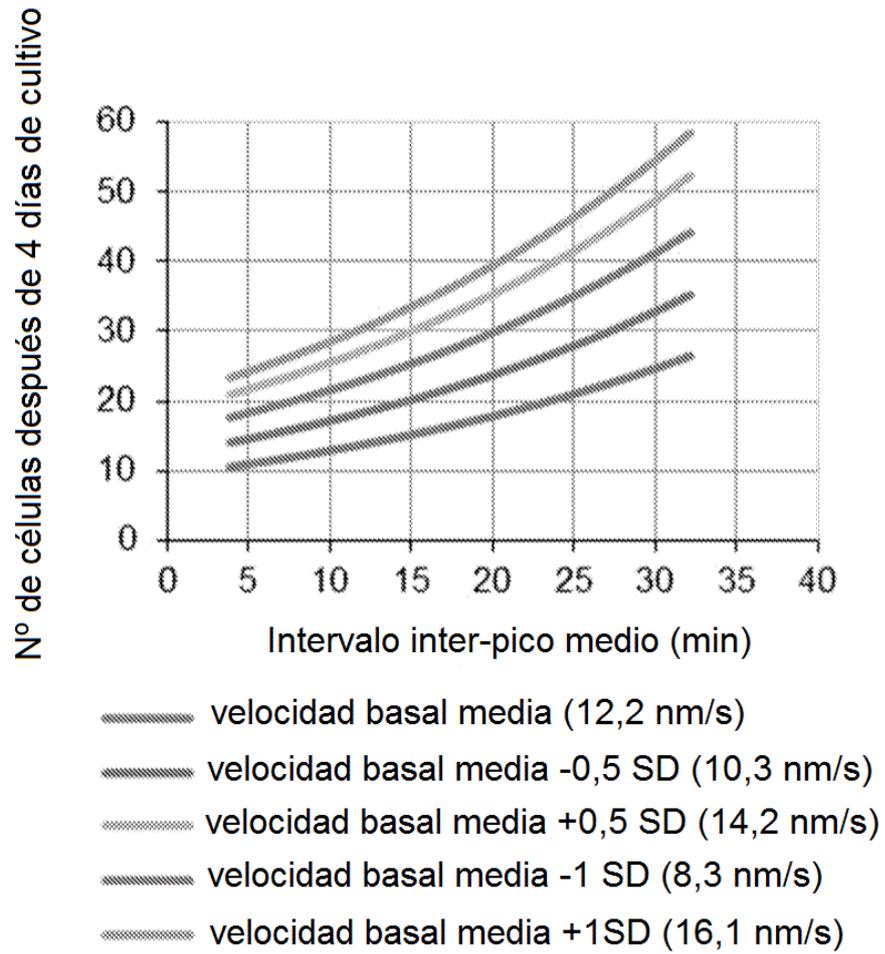


Fig. 5E

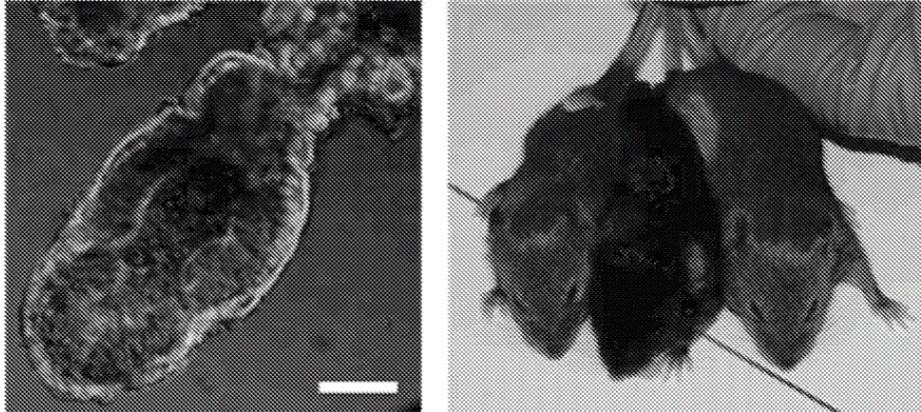


Fig. 5F

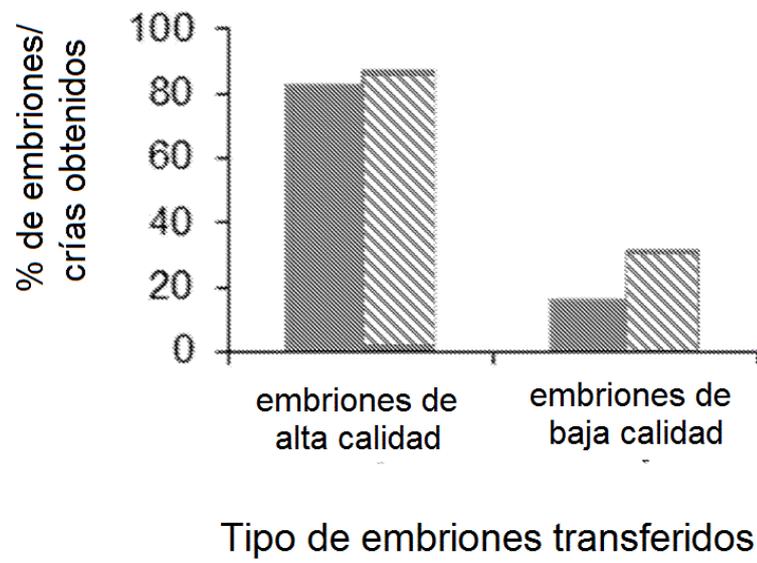


Fig. 6A

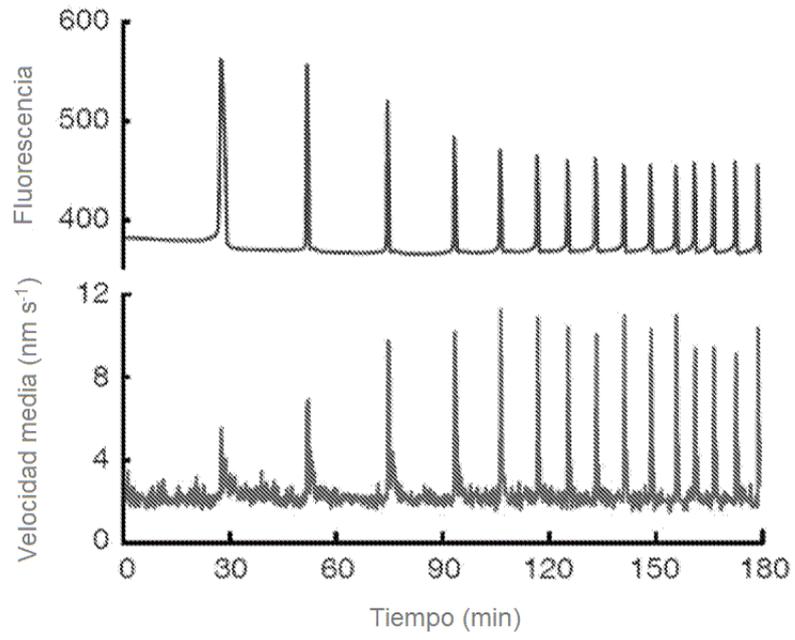


Fig. 6B

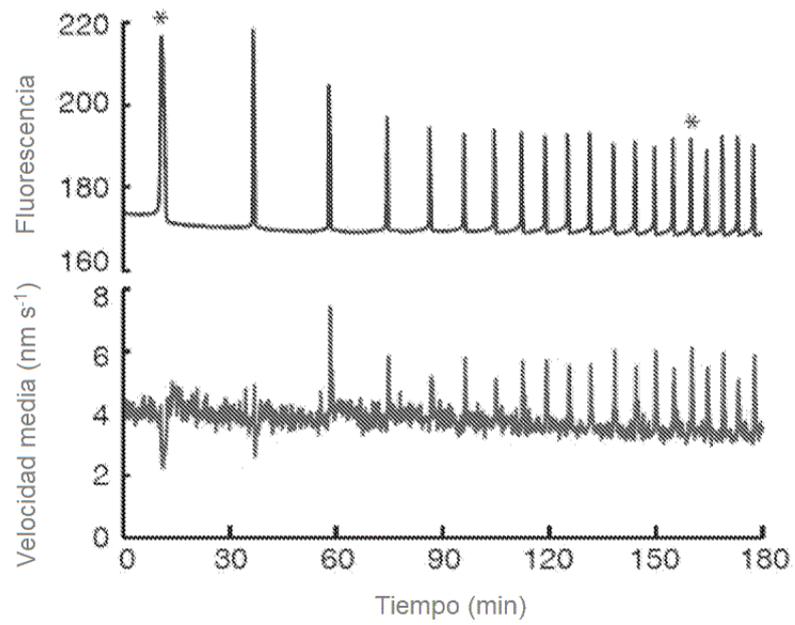
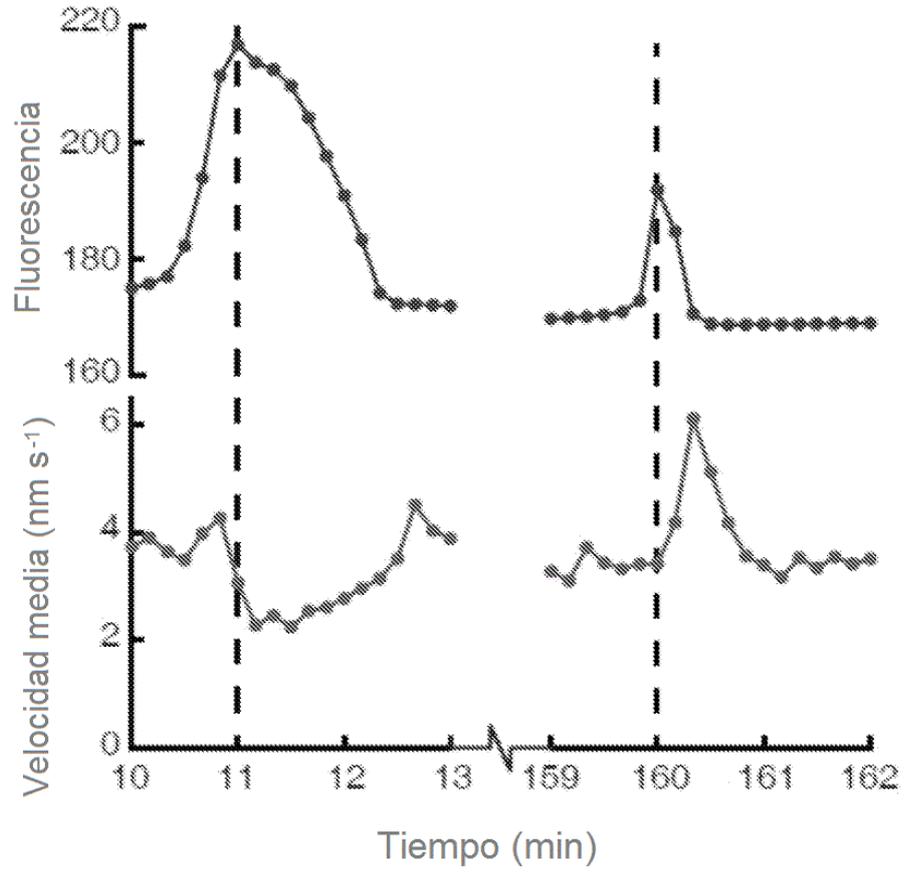


Fig. 7



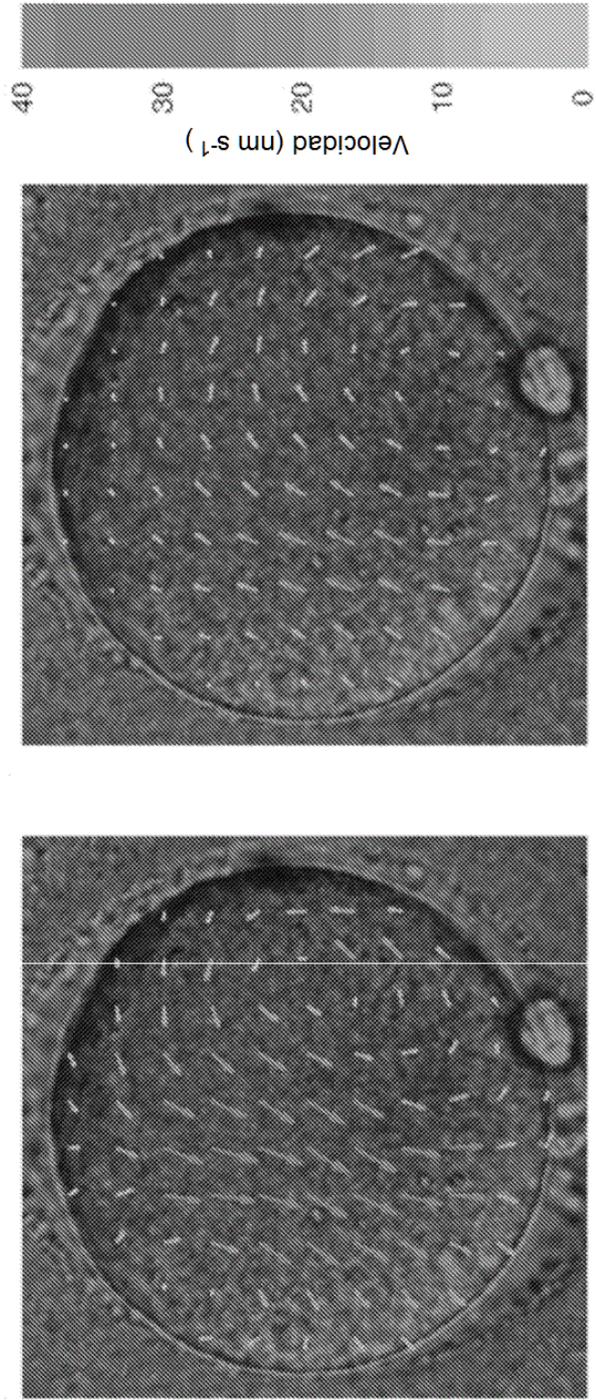


Fig. 8

Fig. 9B

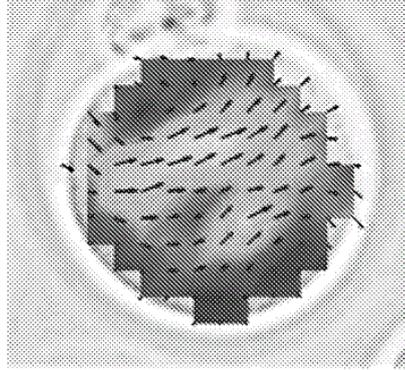


Fig. 9A

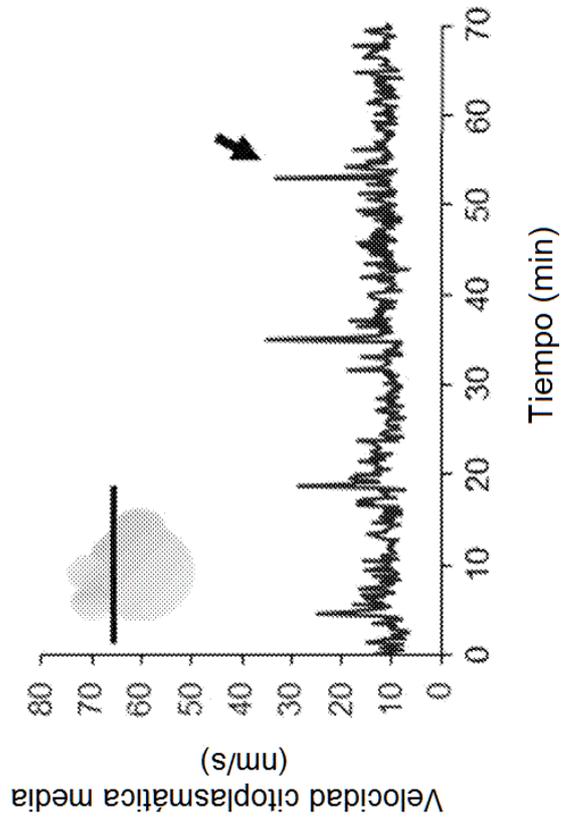


Fig. 9D

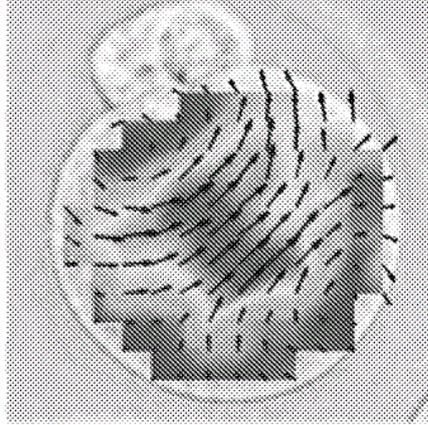


Fig. 9C

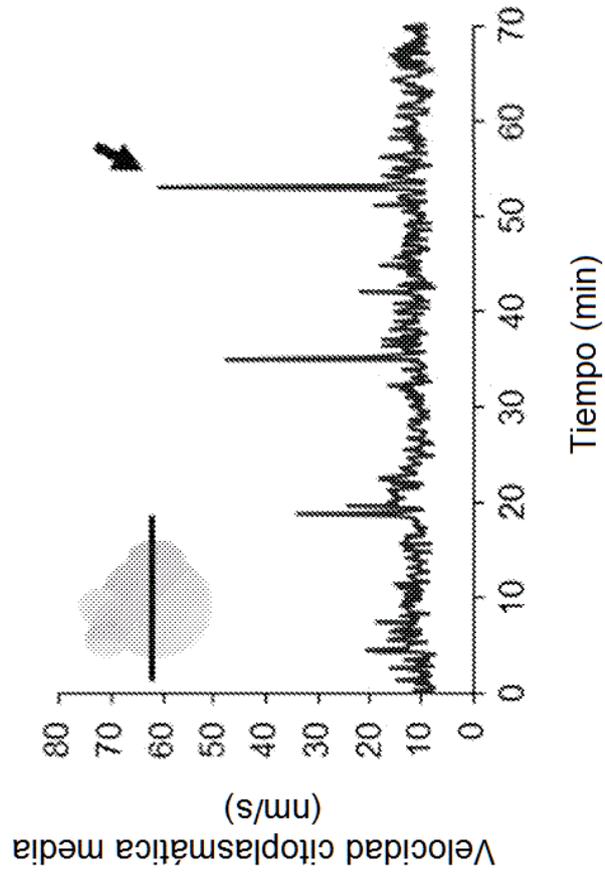


Fig. 9F

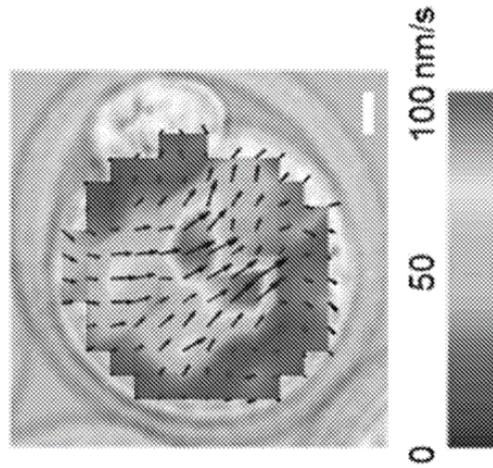


Fig. 9E

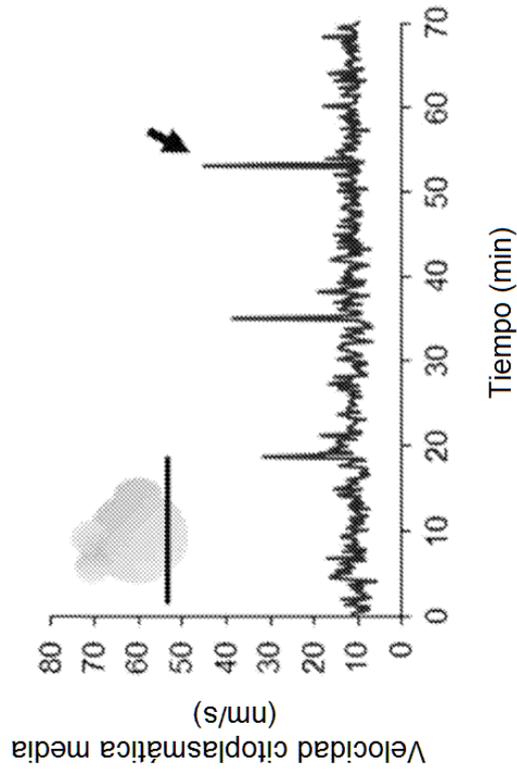


Fig. 9G

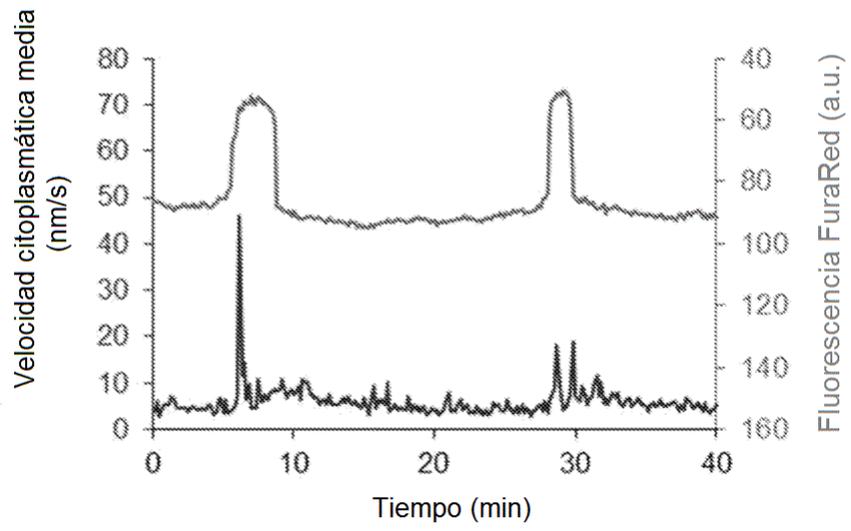


Fig. 10

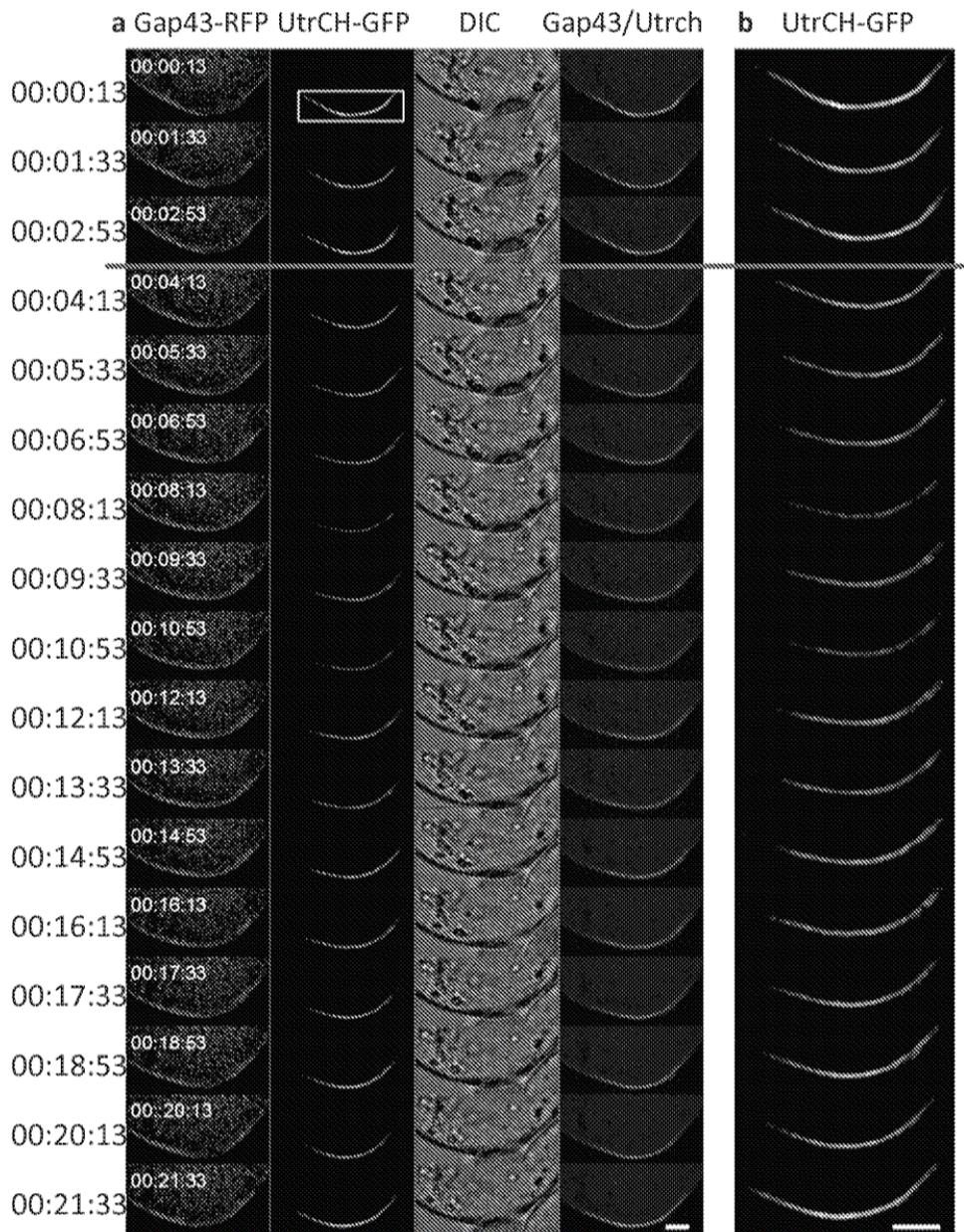


Fig. 11

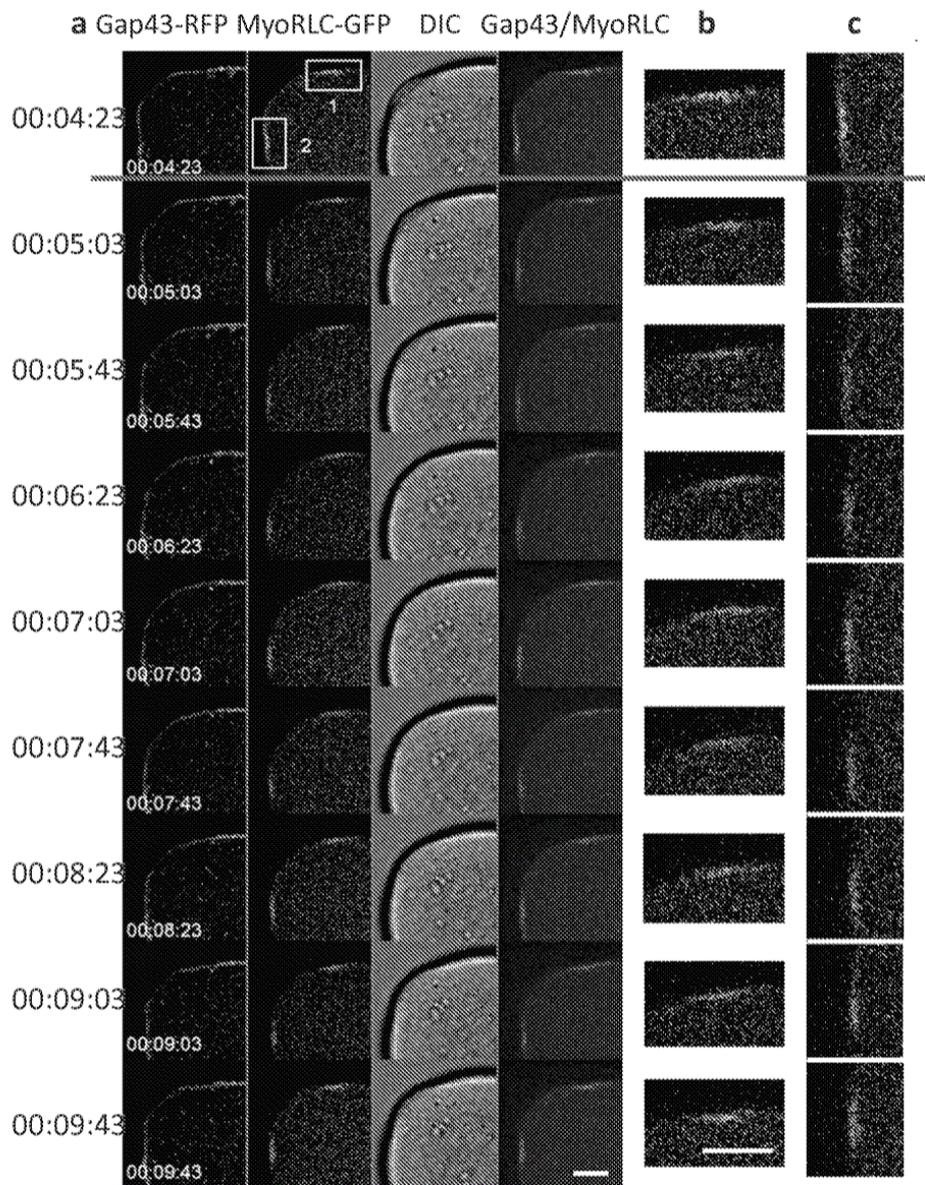


Fig. 12

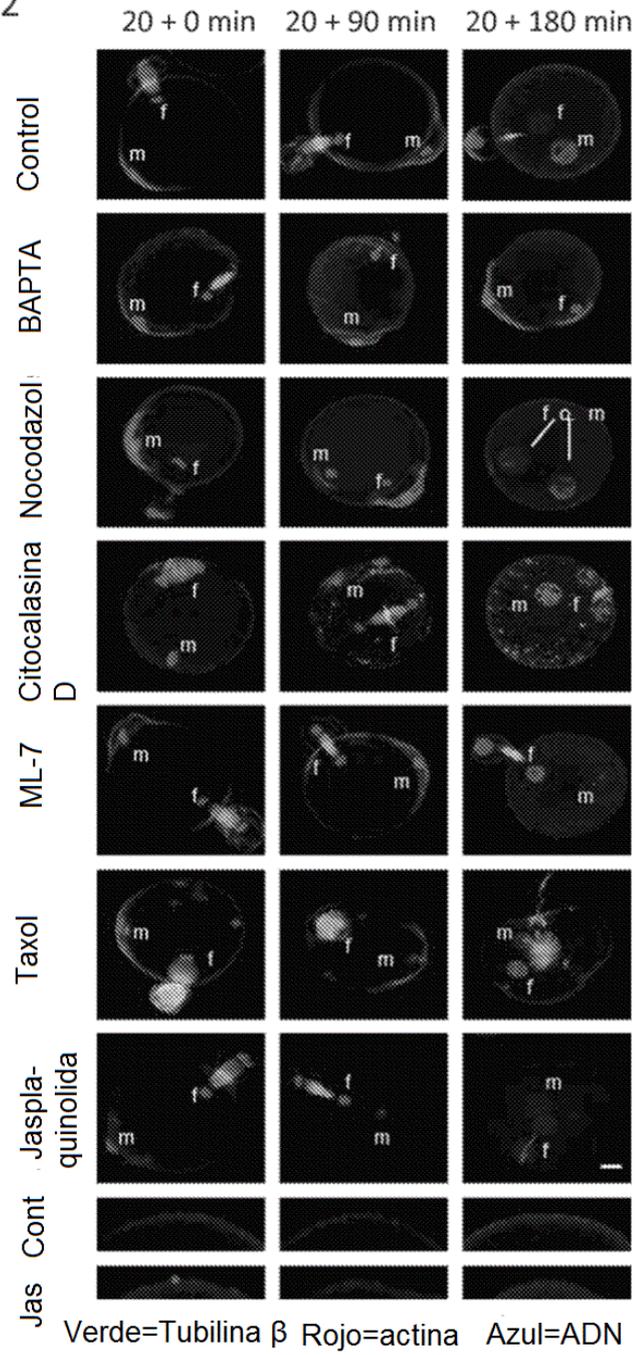


Fig. 13B

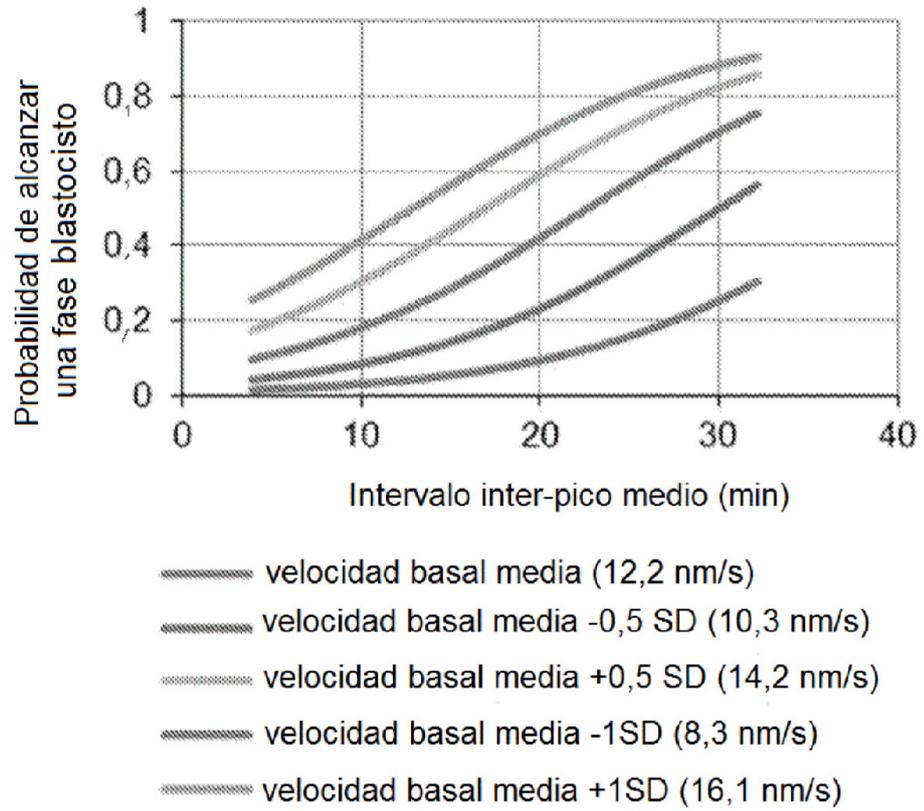


Fig. 13C

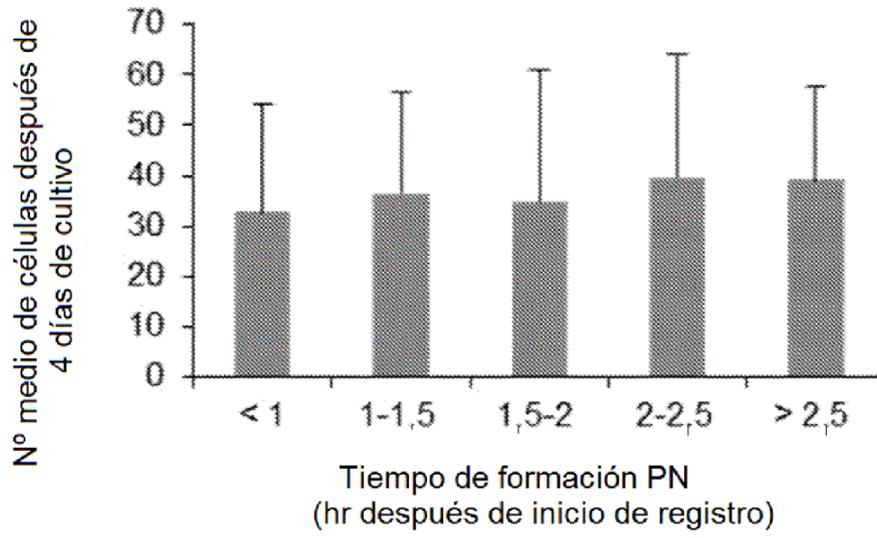


Fig. 13D

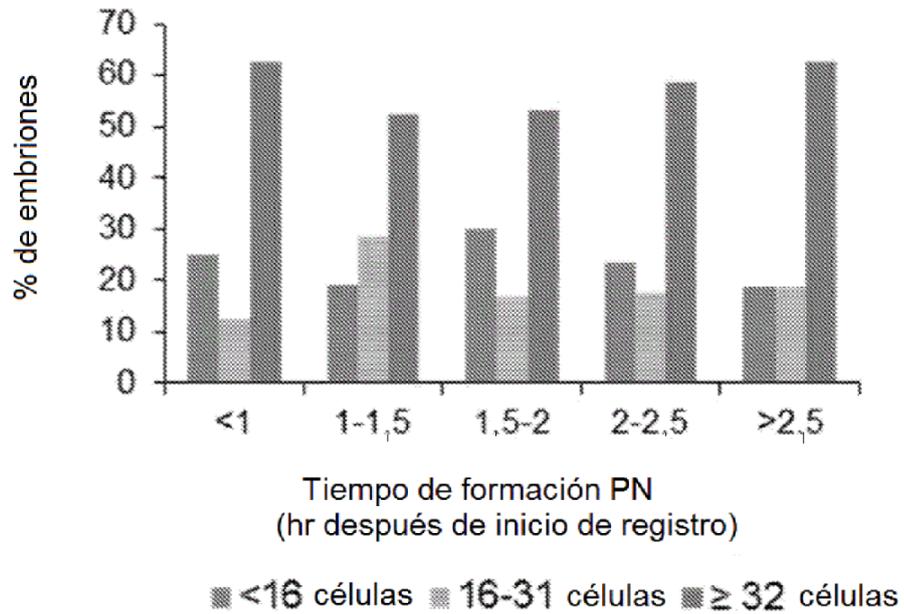


Fig. 13E

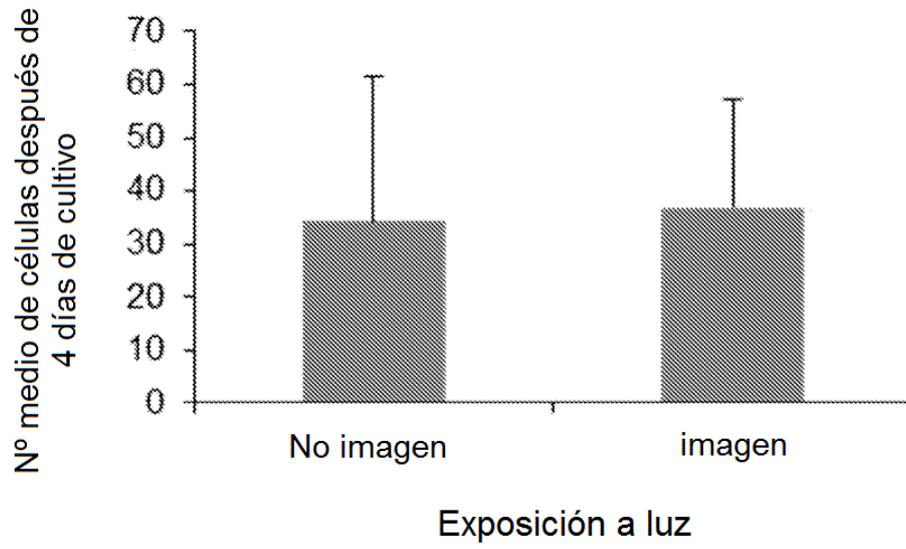


Fig. 13F

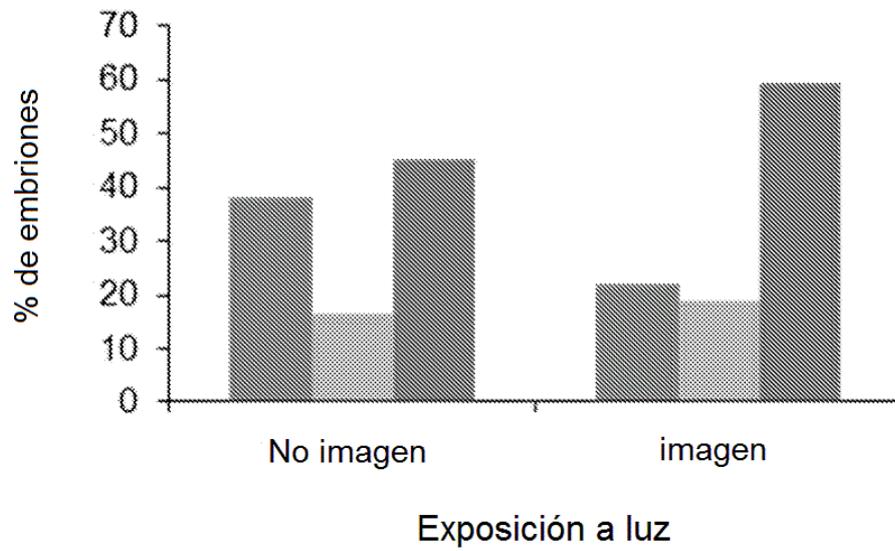


Fig. 14A

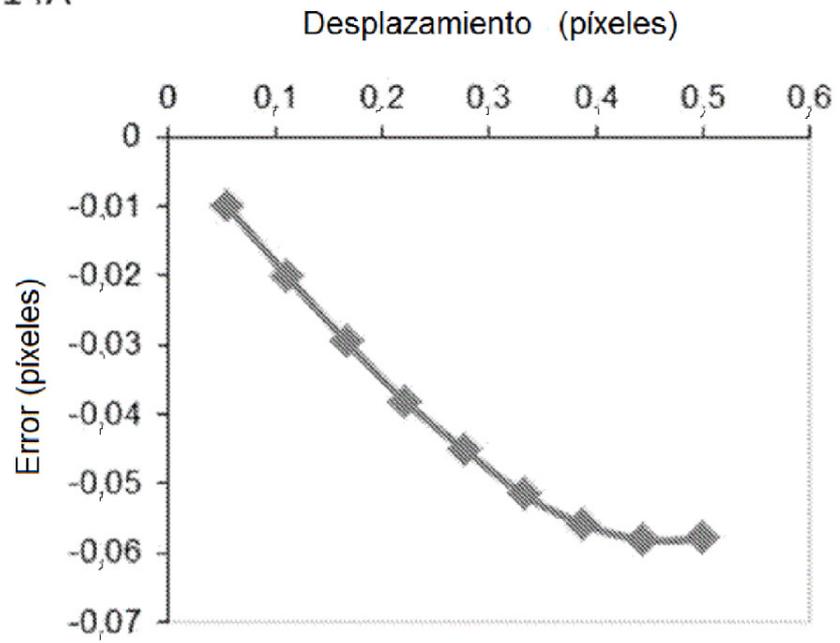


Fig. 14B

