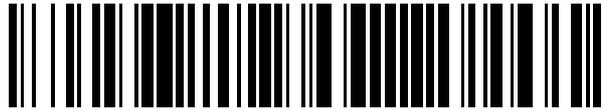


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 657 927**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.02.2012 PCT/US2012/026328**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.08.2012 WO12116185**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.02.2012 E 12749372 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.10.2017 EP 2678675**

54 Título: **Métodos de detección de aneuploidía en embriones humanos**

30 Prioridad:

**23.02.2011 US 201161445863 P**  
**21.09.2011 US 201161537336 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**07.03.2018**

73 Titular/es:

**THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND  
STANFORD JUNIOR UNIVERSITY (100.0%)  
Office of the General Counsel, Building 170, 3rd  
Floor, Main Quad, P.O. Box 20386  
Stanford, CA 94305-2038, US**

72 Inventor/es:

**CHAVEZ, SHAWN L.;  
LOEWKE, KEVIN E.;  
BEHR, BARRY y  
REIJO PERA, RENEE A.**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 657 927 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 de detección de aneuploidía en embriones humanos

**Campo de la invención**

5 Esta invención se refiere al campo de las pruebas biológicas y clínicas y, particularmente, a la formación de imágenes y evaluación de embriones humanos con el fin de detectar la aneuploidía.

**Antecedentes de la invención**

10 Casi el 10-15% de las parejas en nuestra población que están en edad reproductiva son infértiles. Como resultado, muchas parejas infértiles han optado por la Fertilización In Vitro (FIV), que se introdujo en los Estados Unidos (EE.UU.) a principios de los años ochenta. De acuerdo con los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades, más de 140.000 ciclos de FIV se realizaron solo en los EE.UU. en 2006 y esto aumentó a casi 150.000 ciclos en 2008 (cdc.gov/art). Esto sugiere que el número de parejas que buscan FIV está en aumento y puede persistir si la población en general continúa posponiendo tener hijos. A partir de estos ciclos de FIV, se estima que se produjeron más de un millón de embriones anualmente, a menudo con un potencial variable y poco definido para la implantación y el desarrollo satisfactorios a término. Además, se ha publicado que la tasa promedio de nacidos vivos por ciclo después de la FIV es solo del 30% y este porcentaje no ha cambiado significativamente desde la introducción de la FIV humana hace más de 30 años (cdc.gov/art). Aunque es probable que la(s) posible(s) causa(s) de la FIV sean diversas, se cree que las anomalías cromosómicas, o aneuploidía, han contribuido al éxito nominal de la FIV y las tasas de nacidos vivos (Munne et al., 2003 *Reprod Biomed Online*, 7: 91-97; Olgilvie (2008) *Obstetrician & Gynaecol* 10: 88-92).

20 Estudios previos han demostrado que la aneuploidía está presente en 50-70% de los embriones humanos en la etapa de escisión (Vanneste et al. (2009) *Nat Med*, 15: 577 - 583; Johnson et al. (2010) *Hum Reprod* 25: 1066-1075). Si bien se han realizado intentos para correlacionar la morfología con la aneuploidía, es bien sabido que los embriones aneuploides a menudo parecen normales y adecuados para la transferencia según las técnicas tradicionales de evaluación de la FIV (Baltaci et al. (2006) *Reprod Biomed Online* 12: 77-82). Actualmente, el método más utilizado frecuentemente para diagnosticar la aneuploidía es la detección genética preimplantacional (PGS) de los blastómeros biopsiados del día 3, que es invasivo para el embrión, sufre de mosaicismo y es utilizado solo para una pequeña proporción de pacientes de reproducción asistida (Kuo et al. al., (1998) *J. Assist Reprod Genet*, 15: 276 - 280, Baart et al., (2006) *Hum Repro* 21: 223 - 233). También se han utilizado métodos alternativos, tales como el cultivo prolongado de embriones para la etapa del blastocito y el análisis del estado cromosómico mediante la biopsia del trofoctodermo, para evaluar la aneuploidía. Sin embargo, se cree que los riesgos potenciales adicionales que incluyen la introducción de cambios epigenéticos, detención embrionaria y otros factores que interrumpen la integridad embrionaria están asociados con el cultivo embrionario prolongado (Khosla et al, (2001) *Hum Reprod Update*, 7: 419-427; Katari, et al. (2009) *Hum Mol Genet*, 18: 3769 - 3778; Lim et al, (2009) *Hum Reprod* 24: 741 - 747; Fernández-González et al, (2009) *Reproduction* 137: 271-283).

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

Más recientemente, se ha implementado un análisis de imágenes a intervalos para monitorear embriones humanos en desarrollo y evaluar potencialmente su viabilidad (Mio & Maeda (2008) *Am J. Obstet Gynecol* 199: 660-665; Nakahara et al, (2010) *J Assist Reprod Genet*, 27: 93-96). Además de proporcionar un enfoque no invasivo para evaluar el desarrollo embrionario temprano y evitar otras limitaciones como el mosaicismo, todos los pacientes con FIV pueden disponer de acceso a la detección y medición de parámetros dinámicos de imágenes en embriones humanos. En estos estudios, los eventos de desarrollo que incluyeron fertilización, escisión, formación de blastocisto y eclosión de embriones, se analizaron y se correlacionaron con los criterios de morfología de FIV tradicionales el día 3. Sin embargo, no se correlacionaron los parámetros de imagen con la formación del blastocisto o los resultados del embarazo. Otros métodos han considerado el inicio de la primera escisión como un indicador para predecir la viabilidad de los embriones humanos (Fenwick, et al. (2002) *Human Reproduction*, 17: 407-412; Lundin, et al. (2001) *Human Reproduction* 16: 2652 - 2657). Sin embargo, estos métodos no reconocen la importancia de la duración de la citocinesis o los intervalos de tiempo entre las primeras divisiones.

Otros métodos también han utilizado imágenes a intervalos para medir el momento y el alcance de las divisiones celulares durante el desarrollo temprano del embrión (documento WO/2007/144001). Sin embargo, estos métodos revelan solamente un método básico y general para imágenes a intervalos de embriones bovinos, que son sustancialmente diferentes de los embriones humanos en términos de potencial de desarrollo, comportamiento morfológico, programas moleculares y epigenéticos y parámetros de tiempo que rodean la transferencia. Por ejemplo, los embriones bovinos tardan mucho más en implantarse en comparación con los embriones humanos (30 días y 9 días, respectivamente). (Taft, (2008) *Theriogenology* 69 (1): 10-16. Además, no se describen parámetros de imagen o intervalos de tiempo específicos que puedan ser predictivos de la viabilidad del embrión humano.

Más recientemente, se han utilizado imágenes a intervalos para observar el desarrollo del embrión humano durante las primeras 24 horas posteriores a la fertilización (Lemmen et al. (2008) *Reproductive BioMedicine Online* 17 (3): 385-391). La sincronía de los núcleos después de la primera división se correlacionó con los resultados del embarazo. Sin embargo, este trabajo concluyó que la primera escisión no era un parámetro predictivo importante, lo que contradice los estudios previos (Fenwick, et al. (2002) *Human Reproduction* 17: 407-412; Lundin, et al. (2001) *Human Reproduction* 16: 2652 - 2657).

Finalmente, ningún estudio ha validado los parámetros de imagen a través de la correlación con los programas moleculares o la composición cromosómica de los embriones. Los métodos de evaluación de embriones humanos carecen de varios aspectos y se pueden mejorar con los métodos actuales, que implican nuevas aplicaciones de microscopía a intervalos, análisis de imágenes y correlación de los parámetros de formación de imágenes con perfiles moleculares y composición cromosómica. Sorprendentemente, los inventores han descubierto que ciertos parámetros de imágenes del ciclo celular no solo predicen la viabilidad embrionaria, sino también la aneuploidía que incluye el mosaicismo simple y complejo, monosomías y trisomías en embriones humanos mediante la correlación del comportamiento de formación de imágenes con la composición cromosómica de los embriones formados.

## Sumario de la invención

La presente invención es como se reivindica en las reivindicaciones 1-15.

En algunos aspectos descritos en este documento se proporcionan métodos para determinar el potencial de desarrollo de un embrión o célula pluripotente. En tales aspectos, se miden uno o más parámetros celulares de un embrión o célula pluripotente para llegar a una medición de parámetro celular. El parámetro celular se emplea luego para proporcionar una determinación del potencial de desarrollo del embrión o célula pluripotente, cuya determinación puede usarse para guiar un curso clínico de acción. En algunas realizaciones, el parámetro de célula es un evento morfológico que se puede medir mediante microscopía a intervalos. En algunas realizaciones, p.ej. cuando se analiza un embrión, uno o más parámetros celulares son: la duración de un evento de citocinesis, p.ej. citocinesis 1; el intervalo de tiempo entre la citocinesis 1 y la citocinesis 2; y el intervalo de tiempo entre la citocinesis 2 y la citocinesis 3. En ciertas realizaciones, la duración del ciclo celular 1 también se utiliza como un parámetro celular. En algunas realizaciones, la medición del parámetro celular se emplea comparándola con una medición del parámetro de célula comparable de un embrión de referencia, y usando el resultado de esta comparación para proporcionar una determinación del potencial de desarrollo del embrión. En algunas realizaciones, el embrión es un embrión humano. En algunas realizaciones, el parámetro celular es un nivel de expresión génica que se mide para llegar a una medición de la expresión génica. En algunas realizaciones, la medición de la expresión génica se emplea comparándola con una medición de la expresión génica de una célula pluripotente o embrión de referencia o una o más células de la misma, donde el resultado de esta comparación se emplea para proporcionar una determinación del potencial de desarrollo de la célula pluripotente o embrión. En algunas realizaciones, el embrión se produce por fertilización in vitro de un ovocito in vitro. En otras realizaciones, el embrión se produce por inyección intracitoplasmática de espermatozoides de un ovocito in vitro. En algunas realizaciones, los ovocitos se maduran in vitro. En otras realizaciones, los ovocitos se maduran in vivo. En algunas realizaciones, el embrión es aneuploide.

En algunos aspectos descritos en este documento, se proporcionan métodos para transferir un embrión que se ha encontrado que tiene un potencial de desarrollo favorable para una mujer. En algunos aspectos, el embrión se cultiva bajo condiciones que son favorables para promover el desarrollo y se miden uno o más parámetros celulares para llegar a una medición de parámetro celular. El parámetro celular se emplea luego para proporcionar una

- determinación del potencial de desarrollo del embrión. En algunas realizaciones, el parámetro de célula es un evento morfológico que se puede medir mediante microscopía a intervalos. En algunas realizaciones, p.ej. cuando se analiza un embrión, uno o más parámetros celulares son: la duración de un evento de citocinesis, p.ej. citocinesis 1; el intervalo de tiempo entre la citocinesis 1 y la citocinesis 2; y el intervalo de tiempo entre la citocinesis 2 y la citocinesis 3. En ciertas realizaciones, la duración del ciclo celular 1 también se utiliza como un parámetro celular. En algunas realizaciones, se proporcionan métodos para transferir uno o más embriones que demuestran un potencial de desarrollo favorable en una mujer. En algunas realizaciones, el embrión es un embrión humano. En algunas realizaciones, el embrión se produce por fertilización in vitro de un ovocito in vitro. En otras realizaciones, el embrión se produce por inyección intracitoplasmática de esperma de un ovocito in vitro. En algunas realizaciones, los ovocitos se maduran in vitro. En otras realizaciones, los ovocitos se maduran in vivo. En algunas realizaciones, el embrión se cultiva bajo condiciones que son favorables para promover el desarrollo en una placa de cultivo. En algunas realizaciones, la placa de cultivo contiene uno o más micropocillos. En realizaciones adicionales, un embrión que se determina que tiene un potencial de desarrollo favorable se elimina primero de la placa de cultivo antes de la transferencia del embrión a un receptor femenino que lo necesite.
- En algunos aspectos de la invención, se proporcionan métodos para detectar aneuploidía en un embrión. En dichos aspectos descritos en este documento, se proporcionan métodos para determinar primero el potencial de un embrión para alcanzar el blastocisto seguido de determinar la presencia o ausencia y/o el nivel de fragmentación en un embrión en el que la presencia de fragmentación, particularmente un alto nivel de fragmentación, es indicativo de un embrión aneuploide. En algunas realizaciones, el potencial para alcanzar el blastocisto se mide determinando uno o más parámetros celulares. En ciertos aspectos, los parámetros celulares incluyen la duración de la primera citocinesis, el intervalo de tiempo entre la citocinesis 1 y la citocinesis 2, el intervalo de tiempo entre la citocinesis 2 y la citocinesis 3, el tiempo hasta la primera división celular, la morfología del embrión, los patrones de expresión génica, o cualquier otro método conocido en la técnica para determinar el potencial de un embrión para alcanzar el blastocisto y combinaciones de los mismos.
- La invención proporciona métodos para detectar aneuploidía en un embrión. Uno o más parámetros celulares de un embrión se miden para llegar a una medición del parámetro celular. La medición del parámetro celular se utiliza para proporcionar una determinación de si el embrión es aneuploide, cuya determinación puede usarse para guiar un curso clínico de acción. En algunas realizaciones, el parámetro de célula es un evento morfológico que se puede medir mediante microscopía a intervalos. En algunas realizaciones, p.ej. cuando se analiza un embrión, uno o más parámetros celulares son: la duración de un evento de citocinesis, p.ej. citocinesis 1; el intervalo de tiempo entre la citocinesis 1 y la citocinesis 2; y el intervalo de tiempo entre la citocinesis 2 y la citocinesis 3. En ciertas realizaciones, la duración del ciclo celular 1 también se utiliza como un parámetro celular. En algunas realizaciones, se proporcionan métodos para determinar si un embrión que se determina que es aneuploide debido a errores mitóticos o meióticos. El embrión es un embrión humano. En algunas realizaciones, el embrión es aneuploide. En algunas realizaciones, la aneuploidía es una trisomía. En algunas realizaciones, la trisomía es trisomía 21. En otras realizaciones, la aneuploidía es monosomía. En algunas realizaciones, la monosomía es monosomía 22. El embrión es un embrión humano. En algunas realizaciones, el embrión se produce por fertilización in vitro de un ovocito in vitro. En otras realizaciones, el embrión se produce por inyección intracitoplasmática de esperma de un ovocito in vitro. En algunas realizaciones, los ovocitos maduran in vitro. En otras realizaciones, los ovocitos se maduran in vivo.
- En algunas realizaciones, los embriones se congelaron antes de medir los parámetros celulares. En otras realizaciones, los embriones no se congelaron antes de medir los parámetros celulares.
- En algunos aspectos descritos en este documento, se proporcionan métodos para seleccionar un embrión con un recuento de cromosomas normal. En tales aspectos, se miden uno o más parámetros celulares de un embrión o célula pluripotente para llegar a una medición del parámetro celular. El parámetro celular se emplea luego para proporcionar una determinación de si el embrión tiene un recuento de cromosomas normal, cuya determinación se puede usar para guiar un curso clínico de acción. En algunas realizaciones, el parámetro celular es un evento morfológico que se puede medir mediante microscopía a intervalos. En algunas realizaciones, p.ej. cuando se analiza un embrión, uno o más parámetros celulares son: la duración de un evento de citocinesis, p.ej. citocinesis 1; el intervalo de tiempo entre la citocinesis 1 y la citocinesis 2; y el intervalo de tiempo entre la citocinesis 2 y la citocinesis 3. En ciertas realizaciones, la duración del ciclo celular 1 también se utiliza como un parámetro celular. En algunas realizaciones, el embrión es un embrión humano. En algunas realizaciones, el embrión se produce por fertilización in vitro de un ovocito in vitro. En otras realizaciones, el embrión se produce por inyección intracitoplasmática de esperma de un ovocito in vitro. En algunas realizaciones, los ovocitos se maduran in vitro. En otras realizaciones, los ovocitos se maduran in vivo. En algunas realizaciones, el embrión se cultiva bajo condiciones que son favorables para promover el desarrollo en una placa de cultivo antes de la medición de los parámetros celulares. En algunas realizaciones, la placa de cultivo contiene uno o más micropocillos. En realizaciones adicionales, un embrión que se determina que tiene un recuento de cromosomas normal se retira de la placa de cultivo. En una realización adicional, el embrión que se determina que tiene un recuento de cromosomas normal se implanta adicionalmente en un receptor femenino después de que se ha retirado de la placa de cultivo.
- En algunos aspectos descritos en la presente memoria, se proporcionan métodos para seleccionar un embrión con un recuento de cromosomas normal. En tales aspectos, se proporcionan métodos para determinar primero el potencial de un embrión para alcanzar el blastocisto seguido de determinar la presencia o ausencia y/o el nivel de fragmentación en un embrión, en donde la presencia de un nivel de fragmentación, y particularmente uno alto, es

indicativa de un embrión aneuploide y la fragmentación de la ausencia es indicativa de un embrión con un recuento cromosómico normal. Un bajo nivel de fragmentación es indicativo de un menor riesgo de aneuploidía que los embriones con un alto nivel de fragmentación y un mayor riesgo de aneuploidía que los embriones sin fragmentación en absoluto. Dicho de otra manera, cuanto menor sea el nivel de fragmentación, menos probable es que el embrión sea aneuploide y cuanto mayor sea el nivel de fragmentación, más probable será que el embrión sea aneuploide. En algunas realizaciones, el potencial para alcanzar el blastocisto se mide determinando uno o más parámetros celulares. En ciertos aspectos, los parámetros celulares incluyen la duración de la primera citocinesis, el intervalo de tiempo entre la citocinesis 1 y la citocinesis 2, el intervalo de tiempo entre la citocinesis 2 y la citocinesis 3, el tiempo hasta la primera división celular, la morfología del embrión, los patrones de expresión génica, o cualquier otro método conocido en la técnica para determinar el potencial de un embrión para alcanzar el blastocisto y combinaciones de los mismos.

En algunos aspectos descritos en este documento, se proporcionan métodos para transferir un embrión que se encuentra que tiene un recuento de cromosomas normal en una mujer. En algunos aspectos, el embrión se cultiva bajo condiciones que son favorables para promover el desarrollo y se miden uno o más parámetros celulares para llegar a una medición del parámetro celular. El parámetro celular se emplea luego para proporcionar una determinación de si el embrión tiene o no un recuento de cromosomas normal. En algunas realizaciones, el parámetro celular es un evento morfológico que se puede medir mediante microscopía a intervalos. En algunas realizaciones, p.ej. cuando se analiza un embrión, uno o más parámetros celulares son: la duración de un evento de citocinesis, p.ej. citocinesis 1; el intervalo de tiempo entre la citocinesis 1 y la citocinesis 2; y el intervalo de tiempo entre la citocinesis 2 y la citocinesis 3. En ciertas realizaciones, la duración del ciclo celular 1 también se utiliza como un parámetro celular. En algunas realizaciones, se proporcionan métodos para transferir uno o más embriones que tienen un recuento de cromosomas normal en una mujer. En algunas realizaciones, el embrión es un embrión humano. En algunas realizaciones, el embrión se produce por fertilización in vitro de un ovocito in vitro. En otras realizaciones, el embrión se produce por inyección intracitoplasmática de espermatozoides de un ovocito in vitro. En algunas realizaciones, los ovocitos se maduran in vitro. En otras realizaciones, los ovocitos se maduran in vivo. En algunas realizaciones, los embriones se congelaron antes de medir los parámetros celulares. En otras realizaciones, los embriones no se congelaron antes de medir los parámetros celulares.

En algunos aspectos descritos en este documento, se proporcionan métodos para clasificar embriones o células pluripotentes por su contenido de cromosomas con relación a los otros embriones o células pluripotentes en el grupo. En dichas realizaciones, se mide uno o más parámetros celulares de los embriones o células pluripotentes en el grupo para llegar a una medición del parámetro celular para cada uno de los embriones o células pluripotentes. Las mediciones del parámetro celular se emplean luego para determinar el contenido cromosómico de cada uno de los embriones o células pluripotentes en el grupo uno respecto del otro, cuya determinación se puede usar para guiar un curso clínico de acción. En algunas realizaciones, el parámetro celular es un evento morfológico que se puede medir mediante microscopía a intervalos. En algunas realizaciones, p.ej. cuando se clasifican los embriones, uno o más parámetros celulares son la duración de un evento de citocinesis, p.ej. citocinesis 1; el intervalo de tiempo entre la citocinesis 1 y la citocinesis 2; y el intervalo de tiempo entre la citocinesis 2 y la citocinesis 3. En ciertas realizaciones, también se mide la duración del ciclo celular 1. En algunas realizaciones, los embriones se clasifican como que tienen un recuento de cromosomas normal, aneuploides debido a errores mitóticos o aneuploides debido a errores meióticos. En algunas realizaciones, la una o más mediciones de parámetros celulares se emplean comparando las mediciones de parámetros celulares de cada uno de los embriones o células pluripotentes en el grupo entre sí para determinar el contenido cromosómico de los embriones o células pluripotentes entre sí. En algunas realizaciones, la una o más mediciones de parámetros celulares se emplean comparando cada medición de parámetro celular con una medición de parámetro celular de un embrión de referencia o célula pluripotente para determinar el recuento cromosómico de cada embrión o célula pluripotente, y comparando los recuentos cromosómicos para determinar el recuento cromosómico de los embriones o células pluripotentes uno con relación al otro.

### Breve descripción de los dibujos

La invención se comprende mejor a partir de la siguiente descripción detallada cuando se lee junto con los dibujos adjuntos. Se enfatiza que, de acuerdo con la práctica común, las diversas características de los dibujos no son a escala. Por el contrario, las dimensiones de las diversas características se amplían o reducen arbitrariamente para mayor claridad. Incluido en los dibujos son las siguientes figuras.

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

La Figura 2 es una serie de fotografías que muestran la escisión y división celular durante un período de 6 días. Las imágenes se etiquetan desde el día 1 hasta el día 6. La barra de escala representa 50  $\mu\text{m}$ .

La Figura 3 es un gráfico de barras que muestra los porcentajes del desarrollo exitoso en blastocistos de embriones monocelulares (cigotos). En el transcurso de 4 experimentos separados, se observó un total de 100 embriones hasta el día 5 a 6 a través de microscopía a intervalos. Se muestra el porcentaje de células que alcanzan cada etapa indicada (blastocito, 8 células, de 4 a 7 células, de 2 a 3 células y 1 célula).

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

5 La Figura 5 es un diagrama que muestra los tiempos transcurridos entre las etapas utilizadas para las evaluaciones actuales, incluida la duración de la primera citocinesis, el tiempo entre la primera y la segunda división (medido como el intervalo de tiempo entre la resolución de la citocinesis 1 y el inicio de la citocinesis 2), y el tiempo entre la 2ª y la 3ª mitosis (medido como el intervalo de tiempo entre el inicio de la citocinesis 2 y el inicio de la citocinesis 3).

10 La Figura 6 es un gráfico en 3-D que muestra la medición de tres eventos, incluida la duración de la primera citocinesis, el intervalo de tiempo entre la primera y la segunda división celular (medido como el intervalo de tiempo entre la resolución de la citocinesis 1 y el inicio de citocinesis 2), y el intervalo de tiempo entre la segunda y la tercera división celular (medidas como el intervalo de tiempo entre el inicio de la citocinesis 2 y el inicio de la citocinesis 3), para un gran grupo de embriones. Los embriones que alcanzan la etapa de blastocisto (marcados con círculos) se agrupan en el gráfico tridimensional, mientras que los embriones que se detienen (marcados con X) antes de llegar al blastocisto se dispersan por todas partes.

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

15 La Figura 8 es un gráfico de radar que muestra los niveles de expresión génica de 52 genes de 6 embriones de 1 a 2 células detenidos y 5 embriones de 1 a 2 células normales. La diferencia en los niveles de expresión entre los embriones normales y anormales fue estadísticamente significativa para los genes destacados en amarillo y señalados con un asterisco, según lo determinado por la prueba de Mann-Whitney.

20 La Figura 9 es un gráfico de barras que muestra los niveles de expresión de genes diferentes en un embrión de 2 células detenido y en embriones de 2 células normales. En la parte superior se muestra un número selecto de imágenes a intervalos para el embrión de 2 células detenido.

La Figura 10 es un gráfico de barras que muestra una comparación de los mismos genes presentados en la Figura 9, en un embrión de 4 células detenido y en embriones de 4 células normales. En la parte superior se muestra un número selecto de imágenes a intervalos para el embrión de 4 células detenido.

25 La Figura 11 es una serie de gráficos de barras que muestran patrones de expresión génica (ESSP) que tienen 4 patrones distintos. Se indican los tiempos de transferencia temprana antes de la activación del gen embrionario (día 2) y la expresión típica en el día 3.

30 La Figura 12 muestra la expresión génica de genes de blastómeros individuales en diferentes etapas. (A) Expresión génica de dos genes, CTNNB1 y CDX2 de blastómeros individuales representados gráficamente en diferentes etapas de la célula y que muestran cambios en estos niveles de expresión génica en diferentes etapas, p.ej. 2 células, 3 células, mórula y blastocito. (B) Firmas de expresión génica en barras que representan genes expresados en el programa materno en comparación con genes expresados a partir del programa zigótico.

La Figura 13 es un dibujo de un modelo para usar el análisis de imágenes a intervalos y el análisis molecular correlacionado para evaluar la viabilidad del embrión.

35 La Figura 14 es una serie de fotografías que muestran tres etapas de desarrollo durante la maduración de ovocitos in vitro.

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

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

40 La Figura 17 es un diagrama de flujo que muestra los procesos utilizados para evaluar las células madre y las células madre pluripotentes.

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

45 La Figura 19 es una tabla de las categorías en las que los genes analizados para el nivel de expresión pueden clasificarse, incluido el número de genes por categoría.

La Figura 20 es una tabla de los cuatro Patrones Específicos de Etapas Embrionarias (ESSP) que se identificaron durante el análisis de expresión génica de 141 embriones únicos y blastómeros individuales desarrollados normalmente, y la categorización de los genes en cada una de estas categorías.

50 La Figura 21 muestra un análisis de imagen automatizado que demuestra la capacidad de los parámetros de formación de imágenes para predecir la formación de blastocistos. (A) Muestra los resultados del algoritmo de seguimiento para un solo embrión. (B) Muestra un conjunto de 14 embriones que se analizaron. (C) Muestra la comparación del análisis de imagen manual con el análisis de imagen automatizado durante la duración de la

citocinesis. (D) Muestra la comparación del análisis de imagen manual para el tiempo entre la primera y la segunda mitosis. (E) Muestra la comparación de una buena morfología de blastocisto con una morfología de blastocisto mala.

La Figura 22 es un dibujo esquemático de un microscopio de campo oscuro; el recuadro de la izquierda muestra una configuración de parche de campo oscuro mecanizado con láser.

- 5 La Figura 23 es un dibujo esquemático de una matriz de tres microscopios, tal como se ilustra en la Figura 22, montada sobre un soporte para su instalación en una incubadora y para conexiones informáticas. La Figura 23A muestra los microscopios, y la Fig. 23B muestra los microscopios dentro y la incubadora.

La Figura 24 es una captura de pantalla del software de captura de imágenes utilizado en el presente trabajo, que muestra imágenes de embriones de 3 canales.

- 10 La Figura 25 de la A a la D es una serie de cuatro fotografías que muestran la imagen a intervalos seleccionada del experimento 2, estación 2. Las Figs. 25A y 25B son imágenes capturadas antes del cambio de medios, y las Figs. 25C y 25D son imágenes capturadas después del cambio de medios.

- 15 La Figura 26 A a D es una serie de cuatro fotografías que muestran imágenes a intervalos seleccionadas del experimento 1, estación 2. Las Figs. 26A y 26B son imágenes capturadas antes del cambio de medios, y las Figs. 26C y 26D son imágenes capturadas después del cambio de medios.

La Figura 27 A y B son dibujos de una placa Petri personalizada con micropozos. La Figura 27A muestra un dibujo de la placa con dimensiones, y la Fig. 27B muestra una vista en 3D de los micropozos.

- 20 La Figura 28 A y B son gráficos que muestran la actividad celular con y sin registro previo de la imagen. Las Figs. 28A y 28B juntas muestran que el registro limpia los resultados y elimina los picos debido al cambio o rotación del embrión.

La Figura 29 A y B son gráficos (izquierda) y fotografías celulares (derecha) que muestran la actividad celular de embriones normales y anormales. Juntas, la Fig. 29A y la Fig. 29B muestran que, en el día 3, los embriones tienen una morfología similar, pero sus gráficos de actividad celular son drásticamente diferentes y solo uno de ellos se convierte en un blastocisto.

- 25 La Figura 30 es un gráfico que muestra la diferencia en las intensidades de píxeles entre pares sucesivos de imágenes durante el desarrollo del embrión. Esto puede usarse por sí solo para evaluar la viabilidad embrionaria, o como una forma de mejorar otros algoritmos, tal como un filtro de partículas, al determinar cuántas partículas (modelos de embriones predichos) deberían usarse.

- 30 La Figura 31 A-G es una serie de siete fotografías que muestran los resultados del seguimiento en 2D en varias etapas de la célula. Las células progresan según lo indicado por los números del cuadro asociados con cada par de imágenes: Cuadro 15 (Fig. 31A), 45 (B), 48 (C), 189 (D), 190 (E), 196 (F) y 234 (G). La fila inferior muestra las imágenes simuladas superpuestas. Los contornos son membranas celulares visibles, y las líneas blancas punteadas son membranas ocluidas. Los marcos de imagen se capturan cada 5 minutos, y solo se muestran unos pocos.

- 35 La Figura 32 A y B es una serie de fotografías y dibujos que muestran dos casos exitosos de rastreo de células 3D. Las ilustraciones debajo de cada foto de un embrión muestran la vista de arriba hacia abajo del modelo 3D, excepto para el marco 314 y el marco 228, que muestran vistas laterales de los modelos en el marco 314 y el marco 228, respectivamente. Los marcos de las imágenes fueron capturados cada 5 minutos.

- 40 La Figura 33 es una representación diagramática de los resultados del filtro de partículas para una división de 1 célula a 2 células. Los puntos de datos son la ubicación 3D de los centros celulares. Los puntos se muestran para modelos de 1 célula, modelos de 2 células, modelos de 3 células y modelos de 4 células. La fila superior muestra las partículas después de la predicción, y la fila inferior muestra las partículas después del nuevo muestreo.

La Figura 34 A y B son gráficos que muestran una comparación del análisis de imagen automático frente a manual para un conjunto de 14 embriones. La Figura 34A muestra la comparación de la duración de la primera citocinesis, y la Fig. 34B muestra la comparación del tiempo entre la 1ª y 2ª mitosis.

- 45 La Figura 35 es un diagrama de flujo que muestra cómo se usa el análisis de imágenes para modelar embriones y medir ciertos parámetros morfológicos.

La Figura 36 A, B y C son gráficas tridimensionales que muestran cada uno de los parámetros de tiempo individuales y la agrupación de embriones normales y aneuploides mitóticos y aneuploides meióticos basados en cada uno de los parámetros de tiempo.

- 50 La Figura 37 A es un gráfico de tres dimensiones que muestra cada uno de los parámetros de tiempo individuales y la agrupación de embriones normal, triploide normal, monosomía 22, monosomía otra, trisomía 21 y trisomía otra en función de cada uno de los parámetros de tiempo. B muestra el número de copias de cada cromosoma en

embriones normales, de trisomía y de monosomía. El número de copias se basa en la relación  $\log_2$  de los valores CGH normalizados de la señal promedio del cromosoma 1 sobre el cromosoma 2.

5 La Figura 38 A muestra el número de copias de cada cromosoma en mosaico bajo y embriones de mosaico alto. El número de copias se basa en la relación  $\log_2$  de los valores CGH normalizados de la señal promedio del cromosoma 1 sobre el cromosoma 2. B es un gráfico tridimensional que muestra cada uno de los parámetros de tiempo individuales y la agrupación de embriones de mosaico bajo y alto mosaico en función de cada uno de los parámetros de tiempo.

10 La Figura 39 es un gráfico tridimensional que muestra cada uno de los parámetros de tiempo individuales y el agrupamiento de embriones normal, triploide normal, bajo mosaico, mosaico alto, monosomía 22, monosomía otra, trisomía 21 y trisomía otra en función de cada uno de los parámetros de tiempo.

La Figura 40 es una tabla que muestra el análisis de parámetros temporales individuales para embriones normales, embriones con errores mitóticos y embriones con errores meióticos.

15 La Figura 41 A es un gráfico tridimensional que muestra cada uno de los parámetros de tiempo individuales y la agrupación de embriones euploides sin fragmentación, embriones aneuploides sin fragmentación, embriones euploides con fragmentación, embriones aneuploides con fragmentación, embriones triploides normales sin fragmentación y embriones triploides normales con fragmentación; B es un gráfico tridimensional que muestra cada uno de los parámetros de tiempo individuales y la agrupación de embriones normales con fragmentación, embriones triploides normales con fragmentación, embriones aneuploides debido a errores meióticos con fragmentación y embriones aneuploides debido a errores mitóticos con fragmentación; C es un gráfico tridimensional que muestra cada uno de los parámetros de tiempo individuales y la agrupación de embriones normales con fragmentación, embriones triploides normales con fragmentación, embriones de bajo mosaico con fragmentación; y embriones de mosaico alto con fragmentación; D es un gráfico tridimensional que muestra cada uno de los parámetros de tiempo individuales y la agrupación de embriones con altos niveles de fragmentación y bajos niveles de fragmentación; E es un gráfico tridimensional que muestra cada uno de los parámetros de tiempo individuales y la agrupación de embriones que tienen inicio de fragmentación en la etapa de 1 célula, la etapa de 2 células y la etapa de 3 o más células.

La Figura 42 es un diagrama de flujo que muestra los procesos utilizados para evaluar embriones en busca de anomalías cromosómicas.

30 La Figura 43 muestra la correlación entre el borrado epigenético y la activación del transposón durante el desarrollo previo a la implantación.

La Figura 44 muestra que el momento de la fragmentación es indicativo de anomalías cromosómicas en un embrión. A muestra cuadros individuales tomados de una secuencia a intervalos; B muestra un gráfico tridimensional que muestra la relación entre el tiempo de fragmentación y los parámetros de formación de imágenes del ciclo celular; C muestra un modelo propuesto para el origen de la aneuploidía embrionaria humana basada en el tiempo de los fragmentos, la reabsorción y las anomalías cromosómicas subyacentes.

40 La Figura 45 muestra evidencia del secuestro de cromosomas dentro de fragmentos celulares. A muestra un gráfico tridimensional que muestra la relación entre el número de copias del cromosoma correcto y el número de copias del cromosoma incorrecto más o menos la fragmentación; B muestra imágenes confocales de un embrión en etapa de escisión libre de zona pelúcida que exhibe fragmentación celular; C muestra el modelado tridimensional de otro embrión fragmentado representado por contraste de imagen diferencial; D muestra el último cuadro de una secuencia de imágenes a intervalos que muestra un embrión en la etapa de 4 células con fragmentación.

### Descripción detallada de la invención

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

50 Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, hasta la décima parte de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto indique claramente lo contrario, entre los límites superiores e inferiores de ese intervalo también se describe específicamente.

Cada intervalo más pequeño entre cualquier valor declarado o valor intermedio en un intervalo establecido y cualquier otro valor establecido o intermedio en ese intervalo indicado está abarcado dentro de la invención.

Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños se pueden incluir o excluir de forma independiente en el intervalo, y cada intervalo en el que alguno, ninguno o ambos de los dos límites está incluido en los intervalos más pequeños también está incluido dentro de la invención, sujeto a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo establecido. Cuando el intervalo indicado incluye uno o ambos límites, los intervalos que excluyen uno o ambos de los límites incluidos también se incluyen en la invención.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que entiende comúnmente cualquier experto habitual en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque puede usarse cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en la presente memoria en la práctica o prueba de la presente invención, a continuación se describen algunos métodos y materiales potenciales y preferidos.

Debe observarse que, tal como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno/a" y "el/la" incluyen los referentes en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "una célula" incluye una pluralidad de tales células y la referencia a "el péptido" incluye la referencia a uno o más péptidos y equivalentes de los mismos, p.ej. polipéptidos, conocidos por los expertos en la técnica, y así sucesivamente.

Las publicaciones discutidas en este documento se proporcionan únicamente para su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada en el presente documento debe interpretarse como una admisión de que la presente invención no tiene derecho a anteceder a dicha publicación en virtud de la invención anterior. Además, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes de las fechas de publicación reales que pueden necesitar confirmación independiente.

#### Definiciones

Se proporcionan métodos para determinar la presencia de anomalías cromosómicas en uno o más embriones. Estos métodos se utilizan para identificar embriones y ovocitos in vitro que son más útiles en el tratamiento de la infertilidad en humanos. Estos y otros objetos, ventajas y características de la invención resultarán evidentes para los expertos en la materia al leer los detalles de los métodos y composiciones objeto tal como se describe más detalladamente a continuación.

Las expresiones "potencial de desarrollo" y "competencia del desarrollo" se usan en este documento para referirse a la habilidad o capacidad de un embrión o célula pluripotente saludable para crecer o desarrollarse.

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

La expresión "célula pluripotente" se usa en este documento para referirse a cualquier célula que tiene la capacidad de diferenciarse en múltiples tipos de células en un organismo. Los ejemplos de células pluripotentes incluyen células madre, ovocitos y embriones de 1 célula (es decir, cigotos).

La expresión "célula madre" se usa en el presente documento para referirse a una célula o a una población de células que: (a) tiene la capacidad de autorrenovarse, y (b) tiene el potencial de dar lugar a diversos tipos de células diferenciadas. Con frecuencia, una célula madre tiene el potencial de dar origen a múltiples linajes de células. Como se usa en el presente documento, una célula madre puede ser una célula madre totipotente, p.ej. un ovocito fertilizado, que da lugar a todos los tejidos embrionarios y extraembrionarios de un organismo; una célula madre pluripotente, p.ej. una célula madre embrionaria (ES), una célula de germen embrionario (EG) o una célula madre pluripotente inducida (iPS), que da lugar a todos los tejidos embrionarios de un organismo, es decir, linajes de endodermo, mesodermo y ectodermo; una célula madre multipotente, p.ej. una célula madre mesenquimal, que da lugar a al menos dos de los tejidos embrionarios de un organismo, es decir, al menos dos de los linajes endodermo, mesodermo y ectodermo, o puede ser una célula madre específica de tejido, lo que da lugar a múltiples tipos de células diferenciadas de un tejido particular. Las células madre específicas de tejido incluyen células embrionarias específicas de tejido, que dan lugar a las células de un tejido particular, y células madre somáticas, que residen en tejidos adultos y pueden dar lugar a las células de ese tejido, p.ej. las células madre neurales, que dan lugar a todas las células del sistema nervioso central, las células satélite, que dan lugar al músculo esquelético, y las células madre hematopoyéticas, que dan lugar a todas las células del sistema hematopoyético.

El término "ovocito" se usa en el presente documento para referirse a una célula germinal femenina no fertilizada o gameto. Los ovocitos de la aplicación en cuestión pueden ser ovocitos primarios, en cuyo caso están posicionados para atravesar o atraviesan la meiosis I, o los ovocitos secundarios, en cuyo caso están posicionados para atravesar o atraviesan la meiosis II.

Por "meiosis" se entiende los eventos del ciclo celular que resultan en la producción de gametos. En el primer ciclo celular meiótico, o meiosis I, los cromosomas de una célula se duplican y se dividen en dos células hijas. Estas

células hijas luego se dividen en un segundo ciclo celular meiótico, o meiosis II, que no va acompañado de síntesis de ADN, lo que da como resultado gametos con un número haploide de cromosomas.

5 Por la etapa de "vesícula germinal" se entiende la etapa de maduración de un ovocito primario que se correlaciona con la profase I del ciclo celular de la meiosis I, es decir, antes de la primera división del material nuclear. Los ovocitos en esta etapa también se llaman "ovocitos de vesículas germinales", para el núcleo característicamente grande, llamado vesícula germinal. En un ovocito humano normal cultivado in vitro, la vesícula germinal ocurre alrededor de 6-24 horas después del inicio de la maduración.

10 Por la etapa de "metafase I" se entiende la etapa de maduración de un ovocito primario que se correlaciona con la metafase I del ciclo celular de la meiosis I. En comparación con los ovocitos de vesículas germinales, los ovocitos en metafase I no tienen un núcleo grande y claramente definido. En un ovocito humano normal cultivado in vitro, la metafase I ocurre alrededor de 12-36 horas después del inicio de la maduración.

15 Por la etapa "metafase II" se entiende la etapa de maduración del ovocito secundaria que se correlaciona con la metafase II del ciclo celular de meiosis II. La metafase II se distingue por la extrusión del primer cuerpo polar. En un ovocito humano normal cultivado in vitro, la metafase II ocurre alrededor de 24-48 horas después del inicio de la maduración.

20 Por un "ciclo celular mitótico" se entiende los eventos en una célula que resultan en la duplicación de los cromosomas de una célula y la división de esos cromosomas y la materia citoplásmica de una célula en dos células hijas. El ciclo celular mitótico se divide en dos fases: interfase y mitosis. En la interfase, la célula crece y replica su ADN. En la mitosis, la célula inicia y completa la división celular, dividiendo primero su material nuclear, y luego dividiendo su material citoplasmático y su material nuclear dividido (citocinesis) en dos células separadas.

25 Por un "primer ciclo celular mitótico" o "ciclo celular 1" se entiende el intervalo de tiempo desde la fertilización hasta la finalización del primer evento de citocinesis, es decir, la división del ovocito fertilizado en dos células hijas. En los casos en los que los ovocitos se fecundan in vitro, el intervalo de tiempo entre la inyección de gonadotropina coriónica humana (HCG) (generalmente administrada antes de la recuperación de ovocitos) hasta la finalización del primer evento de citocinesis se puede usar como un intervalo de tiempo sustituto.

30 Por un "segundo ciclo celular mitótico" o "ciclo celular 2" se entiende el segundo evento del ciclo celular observado en un embrión, el intervalo de tiempo entre la producción de células hijas de un ovocito fertilizado por mitosis y la producción de un primer conjunto de células nietas de una de esas células hijas (la "célula hija principal", o célula hija A) por mitosis. Al finalizar el ciclo celular 2, el embrión consta de 3 células. En otras palabras, el ciclo celular 2 puede identificarse visualmente como el tiempo entre el embrión que contiene 2 células y el embrión que contiene 3 células.

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

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

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

45 Por "tercer evento de escisión" se entiende el tercer conjunto de divisiones, es decir, las divisiones de todas las células nietas. Tras la finalización del tercer evento de escisión, el embrión normalmente consta de 8 células.

50 Por "citocinesis" o "división celular" se entiende aquella fase de la mitosis en la que una célula se somete a división celular. En otras palabras, es la etapa de la mitosis en la que el material nuclear particionado de una célula y su material citoplásmico se dividen para producir dos células hijas. El período de citocinesis es identificable como el período, o intervalo, de tiempo entre cuando se observa por primera vez una constricción de la membrana celular (un "surco de escisión") y la resolución de ese evento de constricción, es decir, la generación de dos células hijas. El inicio del surco de escisión puede identificarse visualmente como el punto en el que la curvatura de la membrana celular cambia de convexa (redondeada hacia afuera) a cóncava (curvada hacia adentro con una abolladura o indentación). Esto se ilustra en la Fig.4 panel superior con flechas blancas que apuntan a 2 surcos de escisión. El inicio del alargamiento celular también se puede usar para marcar el inicio de la citocinesis, en cuyo caso el período de citocinesis se define como el período de tiempo entre el inicio del alargamiento celular y la resolución de la división celular.

55

Por "primera citocinesis" o "citocinesis 1" se entiende el primer evento de división celular después de la fertilización, es decir, la división de un ovocito fertilizado para producir dos células hijas. La primera citocinesis generalmente ocurre aproximadamente un día después de la fecundación.

5 Por "segunda citocinesis" o "citocinesis 2", se entiende el segundo evento de división celular observado en un embrión, es decir, la división de una célula hija del ovocito fertilizado (la "célula hija principal" o hija A) en un primer conjunto de dos nietas.

Por "tercera citocinesis" o "citocinesis 3" se entiende el tercer evento de división celular observado en un embrión, es decir, la división de la otra hija del ovocito fertilizado (la "célula hija rezagada", o hija B) en un segundo conjunto de dos nietas.

10 La expresión "marcador fiduciario" o "marcador fiducial" es un objeto utilizado en el campo de visión de un sistema de imágenes que aparece en la imagen producida, para usar como punto de referencia o medida. Puede ser algo colocado dentro o sobre el sujeto de la imagen, o una marca o conjunto de marcas en la retícula de un instrumento óptico.

15 El término "micro-pocillo" se refiere a un recipiente que está dimensionado en una escala celular, preferiblemente para proporcionar acomodo de una única célula eucariótica.

20 Por "aneuploidía" se entiende un tipo de anomalía cromosómica caracterizada por un número anormal de cromosomas. Los embriones aneuploides pueden tener uno o más cromosomas faltantes y/o uno o más cromosomas adicionales. La aneuploidía puede ser el resultado de un "error mitótico" o un "error meiótico". Un "embrión aneuploide" es un embrión que contiene una aneuploidía. Los términos "aneuploide" y "anormal" o "recuento de cromosomas anormales" se usan indistintamente en este documento.

Por "euploide" se entiende un embrión que se caracteriza por ser cromosómicamente normal. Los embriones euploides o normales tienen la cantidad adecuada de pares de cromosomas. Un embrión humano euploide, por ejemplo, tiene 23 pares de cromosomas para un total de 46 cromosomas. Los términos "euploide" y "normal" o "recuento cromosómico normal" se usan indistintamente en este documento.

25 Por "error mitótico" se entiende un tipo de aneuploidía causada por un error de separación cromosómica durante la mitosis.

Por "error meiótico" se entiende un tipo de aneuploidía causada por un error de separación cromosómica durante la meiosis.

30 Por "trisomía" se entiende un tipo de aneuploidía en la que hay tres copias de un cromosoma en particular en lugar de dos. Un "embrión de trisomía" es un embrión en el cual el recuento de cromosomas es anormal y contiene tres copias de uno o más cromosomas en lugar de dos copias.

Por "monosomía" se entiende un tipo de aneuploidía en la que hay una copia de un cromosoma en particular en lugar de dos. Un "embrión de monosomía" es un embrión en el que el recuento de cromosomas es anormal y contiene una copia de uno o más cromosomas en lugar de dos copias.

35 Por "recuento cromosómico normal" se entiende dos copias de cada uno de los 23 cromosomas para humanos.

Por "mosaico" o "mosaicismo" se entiende una población de células con diferente contenido cromosómico. Un "embrión de mosaico" es un embrión que contiene poblaciones de células con diferente contenido cromosómico.

Por "bajo mosaico" se entiende una población de células con diferente contenido cromosómico en el que se ven afectados cuatro o menos cromosomas que surgieron de un error mitótico.

40 Por "alto mosaico" se entiende una población de células con diferente contenido cromosómico en el que se ven afectados más de cuatro cromosomas que surgieron de un error mitótico.

Por "altos niveles de fragmentación" se entiende más de aproximadamente 25% de fragmentación por volumen de citoplasma.

45 Por "bajos niveles de fragmentación" se quiere decir aproximadamente un 25% o menos de fragmentación por volumen de citoplasma.

Por "fragmentación" se entiende porciones de citoplasma unido a la membrana que pueden contener o no ADN nuclear.

#### Células pluripotentes y embriones de interés

50 En los métodos de la invención, se evalúa uno o más embriones por su potencial de desarrollo, aneuploidía y/o contenido cromosómico midiendo uno o más parámetros celulares del embrión o embriones y empleando estas

mediciones para determinar el potencial de desarrollo, la aneuploidía y/o el contenido cromosómico del embrión o los embriones. La información así derivada puede usarse para guiar decisiones clínicas, p.ej. si transferir o no un embrión fertilizado in vitro, si transplantar o no una célula o células cultivadas.

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

10 Los ejemplos de células pluripotentes que pueden evaluarse mediante los métodos descritos en este documento incluyen células madre totipotentes, p.ej. ovocitos, tales como ovocitos primarios y ovocitos secundarios; células madre pluripotentes, p.ej. células ES, células EG, células iPS y similares; células multipotentes, p.ej. células madre mesenquimales; y células madre específicas de tejidos. Pueden ser de cualquier etapa de la vida, p.ej. embrionaria, neonatal, juvenil o adulta, y de cualquier sexo, es decir XX o XY.

15 Los embriones se pueden derivar de cualquier organismo, p.ej. cualquier especie de mamífero, p.ej. ser humano, primate, equino, bovino, porcino, canino, felino, etc. Preferiblemente se derivan de un ser humano. Se pueden congelar previamente, p.ej. embriones criopreservados en la etapa de 1 célula y luego ser descongelados, u ovocitos y células madre congelados y descongelados. Alternativamente, pueden estar recién preparados, por ejemplo, embriones recién preparados a partir de ovocitos mediante fertilización in vitro o técnicas de inyección intracitoplásmica de esperma; ovocitos recién recolectados y/o recién madurados mediante técnicas de maduración in vitro o que se derivan de células madre pluripotentes diferenciadas in vitro en células germinales y maduras en ovocitos; células madre recién preparadas a partir de la disociación y cultivo de tejidos por métodos conocidos en la técnica; y similares. Se pueden cultivar en cualquier condición conveniente conocida en la técnica para promover la supervivencia, el crecimiento y/o el desarrollo de la muestra a evaluar, p.ej. para embriones, en condiciones tales como las utilizadas en la técnica de la fertilización in vitro o la inyección de esperma intracitoplasmática; véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 6.610.543, la Patente de Estados Unidos N° 6.130.086, la Patente de Estados Unidos N° 5.837.543; para ovocitos, en condiciones tales como las usadas en la técnica para promover la maduración de ovocitos; véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.882.928 y la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.281.013; para células madre en condiciones tales como las usadas en la técnica para promover la proliferación, véase, p.ej. la Patente de Estados Unidos N° 6.777.233, Patente de Estados Unidos N° 7037892, Patente de Estados Unidos N° 7.029.913, Patente de Estados Unidos N° 5.843.780, y Patente de Estados Unidos N° 6.200.806, Solicitud de Estados Unidos N° 2009/0047263; Solicitud de Estados Unidos N° 2009/0068742.

25 A menudo, los embriones se cultivan en un medio comercialmente disponible tal como KnockOut DMEM, DMEM-F12 o medio de Dulbecco modificado de Iscoves que se ha suplementado con suero o sustitutos de suero, aminoácidos y factores de crecimiento adaptados a las necesidades del embrión particular que está siendo evaluado.

#### 35 Análisis de imágenes a intervalos

En algunas realizaciones, los embriones se evalúan midiendo los parámetros de las células mediante la formación de imágenes a intervalos. Los embriones se pueden cultivar en placas de cultivo estándar. Alternativamente, los embriones se pueden cultivar en placas de cultivo personalizadas, p.ej. placas de cultivo personalizadas con micropocillos de calidad óptica como se describe en el presente documento. En tales placas de cultivo personalizadas, cada micropozo contiene un único embrión, y la superficie inferior de cada micropocillo tiene un acabado de calidad óptica, de modo que todo el grupo de embriones dentro de una sola placa puede ser fotografiado simultáneamente por un solo microscopio en miniatura con resolución suficiente para seguir los procesos de mitosis celular. Todo el grupo de micropozos comparte la misma caída de medios en la placa de cultivo, y también puede incluir una pared exterior colocada alrededor de los micropozos para estabilizar la caída de los medios, así como marcadores fiduciales colocados cerca de los micropozos. La hidrofobicidad de la superficie se puede ajustar con grabado con plasma u otro tratamiento para evitar que se formen burbujas en los micropocillos cuando se llenan con medios. Independientemente de si se utiliza una placa de cultivo estándar o una placa de cultivo personalizada, durante el cultivo, uno o más embriones en desarrollo pueden cultivarse en el mismo medio de cultivo, p.ej. entre 1 y 25 embriones pueden ser cultivados por placa.

Las imágenes se adquieren a lo largo del tiempo, y luego se analizan para llegar a las mediciones de uno o más parámetros celulares. Las imágenes a intervalos se pueden realizar con cualquier microscopio controlado por computadora que esté equipado para el almacenamiento y análisis de imágenes digitales, por ejemplo, microscopios invertidos equipados con etapas calentadas y cámaras de incubación, o arreglos de microscopios en miniatura personalizados que caben dentro de una incubadora convencional. El conjunto de microscopios en miniatura permite el cultivo simultáneo de múltiples placas de muestras en la misma incubadora, y es escalable para acomodar múltiples canales sin limitaciones en el intervalo de tiempo mínimo entre la captura de imágenes sucesivas. El uso de microscopios múltiples elimina la necesidad de mover la muestra, lo que mejora la precisión del sistema y la confiabilidad general del sistema. Los microscopios individuales en la incubadora pueden aislarse parcial o

totalmente, proporcionando a cada placa de cultivo su propio entorno controlado. Esto permite que las placas se transfieran hacia y desde las estaciones de imágenes sin alterar el entorno de las otras muestras.

El sistema de imágenes para imágenes a intervalos puede emplear iluminación de campo claro, iluminación de campo oscuro, contraste de fase, contraste de modulación Hoffman, contraste de interferencia diferencial o fluorescencia. En algunas realizaciones, la iluminación de campo oscuro se puede usar para proporcionar un contraste de imagen mejorado para la posterior extracción de características y el análisis de imágenes. Además, se pueden usar fuentes de luz roja o casi infrarroja para reducir la fototoxicidad y mejorar la relación de contraste entre las membranas celulares y la parte interna de las células.

Las imágenes que se adquieren se pueden almacenar de forma continua, como en video en vivo, o de manera intermitente, como en la fotografía a intervalos, donde un sujeto se visualiza repetidamente en una imagen fija. Preferiblemente, el intervalo de tiempo entre las imágenes debe estar entre 1 y 30 minutos para capturar eventos morfológicos significativos como se describe a continuación. En una realización alternativa, el intervalo de tiempo entre imágenes podría variarse dependiendo de la cantidad de actividad celular. Por ejemplo, durante los periodos activos, las imágenes se pueden tomar con una frecuencia de unos pocos segundos o cada minuto, mientras que durante los periodos inactivos las imágenes se pueden tomar cada 10 ó 15 minutos o más. El análisis de imágenes en tiempo real en las imágenes capturadas podría usarse para detectar cuándo y cómo variar los intervalos de tiempo. En los métodos de los inventores, se estima que la cantidad total de luz recibida por las muestras es equivalente a aproximadamente 24 minutos de exposición continua a la luz de bajo nivel durante 5 días de imágenes. La intensidad de luz para sistemas de imágenes a intervalos es significativamente menor que la intensidad de luz típicamente utilizada en un microscopio de reproducción asistida debido a la baja potencia de los LED (por ejemplo, usando un LED de 1W en comparación con una típica bombilla halógena de 100W) y alta sensibilidad del sensor de la cámara. Por lo tanto, la cantidad total de energía de luz recibida por un embrión usando el sistema de formación de imágenes a intervalos es comparable o menor que la cantidad de energía recibida durante la manipulación de rutina en una clínica de FIV. Además, el tiempo de exposición se puede acortar significativamente para reducir la cantidad total de exposición a la luz en el embrión/célula pluripotente. Durante 2 días de imágenes, con imágenes capturadas cada 5 minutos a 0,5 segundos de exposición a la luz por imagen, la cantidad total de exposición a la luz de bajo nivel es inferior a 5 minutos.

Después de la adquisición de imágenes, las imágenes se extraen y analizan para obtener los diferentes parámetros celulares, por ejemplo, tamaño de célula, grosor de la zona pelúcida, grado de fragmentación, simetría de las células hijas resultante de una división celular, intervalos de tiempo entre las primeras mitosis y duración de la citocinesis.

Los parámetros celulares que pueden medirse mediante imágenes a intervalos son generalmente eventos morfológicos. Por ejemplo, en la evaluación de embriones, se puede usar formación de imágenes a intervalos para medir la duración de un evento de citocinesis, p.ej. citocinesis 1, citocinesis 2, citocinesis 3 o citocinesis 4, donde la duración de un evento de citocinesis se define como el intervalo de tiempo entre la primera observación de un surco de escisión (el inicio de la citocinesis) y la resolución del surco de escisión en dos células hijas (es decir, la producción de dos células hijas). Otro parámetro de interés es la duración de un evento de ciclo celular, p.ej. ciclo celular 1, ciclo celular 2, ciclo celular 3 o ciclo celular 4, donde la duración de un evento del ciclo celular se define como el intervalo de tiempo entre la producción de una célula (para el ciclo celular 1, la fertilización de un óvulo; para ciclos celulares posteriores, a la resolución de la citocinesis) y la producción de dos células hijas de esa célula. Otros parámetros de interés de la célula que se pueden medir mediante imágenes a intervalos incluyen intervalos de tiempo que se definen por estos eventos celulares, p.ej. (a) el intervalo de tiempo entre la citocinesis 1 y la citocinesis 2, definible como uno cualquiera del intervalo entre el inicio de la citocinesis 1 y el inicio de la citocinesis 2, el intervalo entre la resolución de citocinesis 1 y la resolución de citocinesis 2, el intervalo entre el inicio de la citocinesis 1 y la resolución de la citocinesis 2; o el intervalo entre la resolución de la citocinesis 1 y el inicio de la citocinesis 2; o (b) el intervalo de tiempo entre la citocinesis 2 y la citocinesis 3, definible como uno cualquiera del intervalo entre el inicio de la citocinesis 2 y el inicio de la citocinesis 3, o el intervalo entre la resolución de la citocinesis 2 y la resolución de la citocinesis 3; o el intervalo entre el inicio de la citocinesis 2 y la resolución de la citocinesis 3, o el intervalo entre la resolución de la citocinesis 2 y el inicio de la citocinesis 3.

Para los fines de la fertilización *in vitro* y la inyección intracitoplásmica de esperma, se considera ventajoso que el embrión se transfiera al útero al principio del desarrollo, p.ej. en el día 2 o día 3, es decir, hasta la etapa de 8 células, para reducir la pérdida de embriones debido a las desventajas de las condiciones de cultivo en relación con el entorno *in vitro* y para reducir los posibles resultados adversos asociados con errores epigenéticos que pueden ocurrir durante el cultivo (Katari et al. (2009) *Hum Mol Genet.* 18(20): 3769 - 78; Sepúlveda et al. (2009) *Fertil Steril.* 91(5): 1765-70). Por consiguiente, es preferible que la medición de los parámetros celulares tenga lugar dentro de los 2 días siguientes a la fertilización, aunque períodos de análisis más largos, p.ej. aproximadamente 36 horas, aproximadamente 54 horas, aproximadamente 60 horas, aproximadamente 72 horas, aproximadamente 84 horas, aproximadamente 96 horas, o más, también se contemplan por los presentes métodos.

Los ejemplos de parámetros de células en un ovocito en maduración que pueden evaluarse mediante la formación de imágenes a intervalos incluyen, sin limitación, cambios en la morfología de la membrana del ovocito, p.ej. la tasa y el grado de separación de la zona pelúcida; cambios en la morfología del núcleo del ovocito, p.ej. la iniciación, la finalización y la tasa de ruptura de vesículas germinales (GVBD); la velocidad y la dirección del movimiento de los

gránulos en el citoplasma y el núcleo; la citocinesis del ovocito y el primer cuerpo polar y el movimiento y/o la duración de la extrusión del primer cuerpo polar. Otros parámetros incluyen la duración de la citocinesis del ovocito secundario maduro y el segundo cuerpo polar.

5 Se describen en este documento ejemplos de parámetros celulares en una célula madre o población de células madre que pueden evaluarse mediante imágenes a intervalos que incluyen, sin limitación, la duración de eventos de citocinesis, el tiempo entre eventos de citocinesis, tamaño y forma de las células madre antes y durante los eventos de citocinesis, el número de células hijas producidas por un evento de citocinesis, orientación espacial del surco de escisión, la tasa y/o el número de divisiones asimétricas observadas (es decir, donde una célula hija mantiene una célula madre mientras que la otra se diferencia), la tasa y/o el número de divisiones simétricas observadas (es decir, donde ambas células hijas permanecen como células madre o ambas se diferencian), y el intervalo de tiempo entre la resolución de un evento de citocinesis y cuando una célula madre comienza a diferenciarse.

15 Los parámetros pueden medirse manualmente o pueden medirse automáticamente, p.ej. por el software de análisis de imágenes. Cuando se emplea un software de análisis de imágenes, se pueden usar algoritmos de análisis de imágenes que emplean una técnica de estimación de modelos probabilísticos basada en el método secuencial de Monte Carlo, p.ej. generando distribuciones de modelos hipotéticos de embriones/células pluripotentes, simulando imágenes basadas en un modelo óptico simple y comparando estas simulaciones con los datos de imágenes observados. Cuando se emplean tales estimaciones del modelo probabilístico, las células se pueden modelar con cualquier forma apropiada, p.ej. como colecciones de elipses en el espacio 2D, colecciones de elipsoides en el espacio 3D y similares. Para tratar las oclusiones y las ambigüedades de profundidad, el método puede imponer  
20 restricciones geométricas que corresponden al comportamiento físico esperado. Para mejorar la robustez, las imágenes se pueden capturar en uno o más planos focales.

#### Análisis de expresión génica

25 Se describen en este documento embriones que se evalúan midiendo la expresión génica. En dichas realizaciones, el parámetro celular es un nivel de expresión génica o perfil de expresión génica. La determinación de la expresión de uno o más genes, es decir, la obtención de un perfil de expresión o evaluación de la expresión, puede realizarse midiendo transcritos de ácidos nucleicos, p.ej. ARNm, de uno o más genes de interés, p.ej. un perfil de expresión de ácido nucleico; o midiendo los niveles de una o más proteínas/polipéptidos diferentes que son productos de expresión de uno o más genes de interés, p.ej. un perfil de expresión proteómica. En otras palabras, las expresiones "perfil de expresión" y "evaluación de expresión" se usan ampliamente para incluir un perfil de expresión génica a  
30 nivel del ARN o al nivel de la proteína.

35 En algunas realizaciones, la expresión de genes puede evaluarse obteniendo un perfil de expresión de ácido nucleico, donde se determina la cantidad o el nivel de uno o más ácidos nucleicos en la muestra, por ejemplo, la transcripción del ácido nucleico de uno o más genes de interés. En estas realizaciones, la muestra que se ensaya para generar el perfil de expresión es una muestra de ácido nucleico. La muestra de ácido nucleico incluye una pluralidad o población de ácidos nucleicos distintos que incluye la información de expresión de los genes de interés del embrión o célula que se evalúa. El ácido nucleico puede incluir ácidos nucleicos de ARN o ADN, por ejemplo, ARNm, ARNc, ADNc, etc., siempre que la muestra retenga la información de expresión de la célula o tejido huésped del que se obtiene. La muestra se puede preparar de varias maneras diferentes, como se conoce en la técnica, por ejemplo, mediante el aislamiento de ARNm de una célula, donde el ARNm aislado se usa como tal, se amplifica, se emplea para preparar ADNc, ARNc, etc., como es conocido en la técnica de la expresión diferencial. La muestra puede prepararse a partir de una sola célula, p.ej. una célula pluripotente de un cultivo de células pluripotentes de interés, o una sola célula (blastómero) de un embrión de interés; o desde varias células, p.ej. una fracción de un cultivo de células pluripotentes, o 2, 3 ó 4, o más blastómeros de un embrión de interés, usando protocolos estándar.

45 El perfil de expresión puede generarse a partir de la muestra de ácido nucleico inicial usando cualquier protocolo conveniente. Aunque se conocen diversas maneras diferentes de generar perfiles de expresión, tales como las empleadas en el campo del análisis diferencial de expresión génica, un tipo de protocolo representativo y conveniente para generar perfiles de expresión son los protocolos de generación de perfiles de expresión génica basados en matriz. Tales aplicaciones son ensayos de hibridación en los que se emplea un ácido nucleico que presenta ácidos nucleicos de "sonda" para cada uno de los genes a analizar/perfilar en el perfil que se va a generar.  
50 En estos ensayos, primero se prepara una muestra de ácidos nucleicos diana a partir de la muestra de ácido nucleico inicial ensayada, donde la preparación puede incluir marcar los ácidos nucleicos diana con un marcador, por ejemplo, un miembro del sistema de producción de señal. Después de la preparación de la muestra de ácido nucleico diana, la muestra se pone en contacto con la matriz en condiciones de hibridación, por lo que se forman complejos entre los ácidos nucleicos diana que son complementarios a las secuencias de sonda unidas a la superficie de la matriz. La presencia de complejos hibridados se detecta luego, ya sea cualitativa o  
55 cuantitativamente.

60 La tecnología de hibridación específica que se puede poner en práctica para generar los perfiles de expresión empleados en los presentes métodos incluye la tecnología descrita en las patentes de Estados Unidos números 5.143.854; 5.288.644; 5.324.633; 5.432.049; 5.470.710; 5.492.806; 5.503.980; 5.510.270; 5.525.464; 5.547.839; 5.580.732; 5.661.028; 5.800.992; así como los documentos WO 95/21265; WO 96/31622; WO 97/10365; WO

97/27317; EP 373 203; y EP 785 280. En estos métodos, un conjunto de ácidos nucleicos de "sonda" que incluye una sonda para cada uno de los genes determinantes de fenotipo cuya expresión se está ensayando se pone en contacto con ácidos nucleicos diana como se describió anteriormente. El contacto se lleva a cabo en condiciones de hibridación, por ejemplo, condiciones de hibridación rigurosas, y luego se elimina el ácido nucleico no unido. La expresión "condiciones de ensayo rigurosas" como se usa en el presente documento se refiere a condiciones que son compatibles para producir pares de unión de ácidos nucleicos, por ejemplo, ácidos nucleicos unidos en la superficie y en fase de disolución, de complementariedad suficiente para proporcionar el nivel de especificidad deseado en el ensayo mientras es menos compatible con la formación de pares de unión entre miembros de unión de complementariedad insuficiente para proporcionar la especificidad deseada. Las condiciones de ensayo rigurosas son la suma o combinación (totalidad) de las condiciones de hibridación y lavado.

El patrón resultante del ácido nucleico hibridado proporciona información con respecto a la expresión de cada uno de los genes que se han sondado, donde la información de expresión es en términos de si el gen se expresa o no y, típicamente, a qué nivel, donde los datos de expresión, es decir, el perfil de expresión (p.ej., en la forma de transcriptosoma) puede ser tanto cualitativo como cuantitativo.

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

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

Aunque se conocen en la técnica una diversidad de maneras diferentes de analizar los niveles de proteína, un tipo de protocolo representativo y conveniente para analizar los niveles de proteína es el ELISA. En los ensayos ELISA y basados en ELISA, se pueden inmovilizar uno o más anticuerpos específicos para las proteínas de interés sobre una superficie sólida seleccionada, preferiblemente una superficie que exhibe una afinidad de proteína tal como los pocillos de una placa de microtitulación de poliestireno. Después del lavado para eliminar el material adsorbido de forma incompleta, los pocillos de la placa de ensayo se recubren con una proteína "bloqueante" inespecífica que se sabe que es antigénicamente neutra con respecto a la muestra de prueba tal como albúmina de suero bovino (BSA), caseína o soluciones de leche en polvo. Esto permite el bloqueo de sitios de adsorción no específicos en la superficie de inmovilización, reduciendo de este modo la línea del fondo causada por la unión no específica del antígeno a la superficie. Después del lavado para eliminar la proteína de bloqueo no unida, la superficie de inmovilización se pone en contacto con la muestra que se analizará en condiciones que conducen a la formación de complejos inmunitarios (antígeno/anticuerpo). Tales condiciones incluyen diluir la muestra con diluyentes tales como BSA o gamma globulina bovina (BGG) en solución salina tamponada con fosfato (PBS)/Tween o PBS/Triton-X 100, que también tienden a ayudar en la reducción de las respuestas no específicas, y permitiendo a la muestra incubarse durante aproximadamente 2-4 horas a temperaturas del orden de aproximadamente 25° - 27°C (aunque se pueden usar otras temperaturas). Después de la incubación, la superficie contactada con antisuero se lava para eliminar el material no inmunocomplejado. Un procedimiento de lavado ejemplar incluye lavar con una solución tal como PBS/Tween, PBS/Triton-X 100 o tampón de borato. La aparición y cantidad de formación de inmunocomplejos se puede determinar entonces sometiendo los inmunocomplejos unidos a un segundo anticuerpo que tiene especificidad por el objetivo que difiere del primer anticuerpo y detectando la unión del segundo anticuerpo. En ciertas realizaciones, el segundo anticuerpo tendrá una enzima asociada, p.ej. ureasa, peroxidasa o fosfatasa alcalina, que generarán un precipitado de color al incubarse con un sustrato cromogénico apropiado. Por ejemplo, se puede emplear una ureasa o IgG antihumana conjugada con peroxidasa, durante un período de tiempo y en condiciones que favorezcan el desarrollo de la formación de inmunocomplejos (por ejemplo, incubación durante 2 horas a temperatura ambiente en una solución que contiene PBS tal como PBS/Tween). Después de dicha incubación con el segundo anticuerpo y lavado para eliminar el material no unido, se cuantifica la cantidad de marcador, por ejemplo mediante incubación con un sustrato cromogénico tal como urea y bromocresol púrpura en el caso de un marcador de ureasa o ácido 2,2'-azino-di-(3-etil-benzotiazolin)-6-sulfónico (ABTS) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en el caso de un marcador de peroxidasa. La cuantificación se logra luego midiendo el grado de generación de color, por ejemplo, usando un espectrofotómetro de espectro visible.

El formato anterior puede alterarse al unir primero la muestra a la placa de ensayo. Luego, el anticuerpo primario se incuba con la placa de ensayo, seguido por la detección del anticuerpo primario unido usando un segundo anticuerpo marcado con especificidad por el anticuerpo primario.

El sustrato sólido sobre el cual se inmovilizan el anticuerpo o anticuerpos puede estar hecho de una amplia variedad de materiales y en una amplia variedad de formas, por ejemplo, placa de microtitulación, microperlas, varilla de nivel, partícula de resina, etc. El sustrato se puede elegir para maximizar las relaciones de señal a ruido, para minimizar la

unión inespecífica, así como para facilitar la separación y el costo. Los lavados pueden efectuarse de la manera más apropiada para el sustrato que se usa, por ejemplo, retirando una perla o varilla de un depósito, vaciando o diluyendo un depósito tal como un pocillo de placa de microtitulación, o enjuagando una perla, partícula, columna cromatográfica o filtro con una solución de lavado o disolvente.

- 5 Alternativamente, pueden emplearse métodos no basados en ELISA para medir los niveles de una o más proteínas en una muestra. Los ejemplos representativos incluyen, pero no se limitan a, espectrometría de masas, matrices proteómicas, tecnología de microesferas xMAP™, citometría de flujo, transferencia Western e inmunohistoquímica.

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

Al generar el perfil de expresión, en algunas realizaciones se analiza una muestra para generar un perfil de expresión que incluye datos de expresión para al menos un gen/proteína, a veces una pluralidad de genes/proteínas, donde por pluralidad se entiende al menos dos genes/proteínas diferentes, y a menudo al menos aproximadamente 3, típicamente al menos aproximadamente 10 y más usualmente al menos aproximadamente 15 genes/proteínas diferentes o más, tales como 50 o más, o 100 o más, etc.

En el sentido más amplio, la evaluación de la expresión puede ser cualitativa o cuantitativa. Como tal, cuando la detección es cualitativa, los métodos proporcionan una lectura o evaluación, por ejemplo, evaluación, de si el analito objetivo, por ejemplo, el ácido nucleico o producto de expresión, está presente o no en la muestra que se está ensayando. En otras realizaciones más, los métodos proporcionan una detección cuantitativa de si el analito objetivo está presente en la muestra que se está ensayando, es decir, una evaluación o valoración de la cantidad real o abundancia relativa del analito objetivo, por ejemplo, el ácido nucleico o la proteína en la muestra que se está analizando. En dichas realizaciones, la detección cuantitativa puede ser absoluta o, si el método es un método para detectar dos o más analitos diferentes, por ejemplo, ácidos nucleicos diana o proteínas, en una muestra, relativos. Como tal, el término "cuantificar", cuando se usa en el contexto de la cuantificación de un analito diana, por ejemplo, ácido o ácidos nucleicos o proteína(s), en una muestra puede referirse a la cuantificación absoluta o relativa. La cuantificación absoluta puede lograrse mediante la inclusión de concentración(es) conocida(s) de uno o más analitos de control y referencia, es decir normalizando, el nivel detectado del analito objetivo con los analitos de control conocidos (por ejemplo, mediante la generación de una curva estándar). Alternativamente, la cuantificación relativa se puede lograr mediante la comparación de niveles detectados o cantidades entre dos o más analitos diana diferentes para proporcionar una cuantificación relativa de cada uno de los dos o más analitos diferentes, por ejemplo, uno con respecto al otro.

Los ejemplos de genes cuyos niveles de expresión son predictivos del potencial de desarrollo del cigoto incluyen Cofilin (NM\_005507), DIAPH1 (NM\_001079812, NM\_005219), ECT2 (NM\_018098), MYLC2/MYL5 (NM\_002477), DGCR8 (NM\_022720), Dicer/DICER1 (NM\_030621, NM\_177438), TARBP2 (NM\_004178, NM\_134323, NM\_134324), CPEB1 (NM\_001079533, NM\_001079534, NM\_001079535, NM\_030594), Symplekin/SYMPK (NM\_004819), YBX2 (NM\_015982), ZAR1 (NM\_175619), CTNNB1 (NM\_001098209, NM\_001098210, NM\_001098210, NM\_001904), DNMT3B (NM\_006892, NM\_175848, NM\_175849, NM\_175850), TERT (NM\_198253, NM\_198255), YY1 (NM\_003403), IFGR2/IFNGR2 (NM\_005534), BTF3 (NM\_001037637, NM\_001207) y NELF (NM\_001130969, NM\_001130970, NM\_001130971, NM\_015537). En la figura 8 se proporcionan otros genes cuyos niveles de expresión pueden servir como parámetros celulares que predicen el potencial de desarrollo del embrión. Al llegar a una medición del nivel de expresión génica, el nivel de expresión a menudo se evalúa y luego se normaliza a un control estándar, p.ej. el nivel de expresión en la muestra de un gen que se sabe que es constante a través del desarrollo, p.ej. GAPDH o RPLPO, o de un gen cuya expresión en ese momento se conoce.

Los niveles de expresión génica se pueden determinar a partir de una única célula, p.ej. un blastómero de un embrión de interés, o un ovocito aislado, o una célula aislada de un cultivo de células madre, etc., o pueden determinarse a partir de un embrión, p.ej. 2, 3 ó 4, o más blastómeros de un embrión de interés, hasta e incluyendo todo el embrión de interés, o múltiples células de un cultivo de células madre, hasta e incluyendo todo el cultivo de células madre, etc.

En otros aspectos, la presente descripción comprende un protocolo para realizar genotipado concurrente y análisis de expresión génica en una única célula. Para los embriones, esto se puede utilizar para mejorar el diagnóstico genético preimplantacional (DGP), un procedimiento en el que se extrae una única célula de un embrión y se analiza su ADN para determinar defectos cariotípicos o la presencia de genes específicos de enfermedades. El método de los inventores permite el análisis simultáneo genético y de la expresión génica. El método implica los siguientes pasos: (1) recolectar una sola célula en un pequeño volumen de medio o tampón, (2) realizar la transcripción inversa en un paso y la amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando una mezcla de genotipos y cebadores de análisis de expresión génica, (3) recoger una alícuota del ADNc amplificado después de menos de 18 ciclos de PCR para preservar la linealidad de la amplificación, (4) usar la alícuota de ADNc para realizar el análisis de expresión génica con técnicas estándar tales como PCR cuantitativa en tiempo real, (5) utilizar la muestra restante para realizar una segunda ronda de PCR para amplificar aún más la información genética para fines de genotipificación, y (6) genotipificar usando técnicas estándar tales como electroforesis en gel.

## Métodos de detección de aneuploidía

En algunas realizaciones, los embriones o las células pluripotentes se evalúan en cuanto a su contenido cromosómico. La invención proporciona métodos para detectar aneuploidía en un embrión. El embrión es un embrión humano. Se evalúa la aneuploidía de los embriones midiendo uno o más parámetros celulares para llegar a una medición celular y empleando esa medición para determinar si el embrión es aneuploide. En ciertas realizaciones de la invención, los embriones que se encuentran que son aneuploides son aneuploides debido a errores mitóticos y, en otras realizaciones, los embriones que se encuentran que son aneuploides son aneuploides debido a errores meióticos. En consecuencia, se proporciona en la presente un método para clasificar embriones de tipos normales a los tipos más graves de aneuploidía. Más específicamente, se proporcionan métodos para clasificar embriones que contienen un contenido cromosómico normal, como aneuploides debido a errores mitóticos, o aneuploides debido a errores meióticos basados en las mediciones de parámetros celulares.

En algunas realizaciones, se proporcionan métodos para determinar en primer lugar el potencial de un embrión para alcanzar el blastocisto seguido de determinar la presencia o ausencia y/o el nivel de fragmentación en embriones que se ha determinado que tienen potencial de blastocisto en donde la presencia, y particularmente un alto nivel, de fragmentación es indicativa de un embrión aneuploide y la ausencia de fragmentación es indicativa de un embrión con un recuento cromosómico normal. Un bajo nivel de fragmentación es indicativo de un menor riesgo de aneuploidía que los embriones con un alto nivel de fragmentación y un mayor riesgo de aneuploidía que los embriones sin fragmentación en absoluto. Dicho de otra manera, cuanto menor sea el nivel de fragmentación, menos probable es que el embrión sea aneuploide y cuanto mayor sea el nivel de fragmentación, más probable será que el embrión sea aneuploide. En una realización, la alta fragmentación se caracteriza por más de aproximadamente 15% de fragmentación en volumen de citoplasma. Todavía en otra realización, la alta fragmentación se caracteriza por más de aproximadamente 20% de fragmentación en volumen de citoplasma. En otra realización más, la alta fragmentación se caracteriza por más de aproximadamente 25% de fragmentación en volumen de citoplasma. Todavía en otra realización, la alta fragmentación se caracteriza por más de aproximadamente 30% de fragmentación en volumen de citoplasma. En otra realización, la fragmentación baja se caracteriza por una fragmentación inferior al 30% en volumen del citoplasma. En otra realización, la fragmentación baja se caracteriza por una fragmentación inferior al 25% en volumen de citoplasma. En otra realización más, la fragmentación baja se caracteriza por una fragmentación inferior al 20% en volumen del citoplasma. En aún otra realización, la fragmentación baja se caracteriza por una fragmentación inferior al 15% en volumen del citoplasma.

El método comprende además seleccionar un embrión con un recuento de cromosomas normal determinando primero el potencial de un embrión para alcanzar el blastocisto y luego midiendo la presencia o ausencia y/o el nivel de fragmentación en un embrión con el potencial de alcanzar blastocisto y seleccionando embriones que muestran una ausencia o un bajo nivel de fragmentación. Además del nivel de fragmentación, también se puede evaluar la dinámica de la fragmentación de los embriones para determinar la probabilidad de seleccionar un embrión con un recuento de cromosomas normal. Por ejemplo, los criterios adicionales de fragmentación, tales como el grado y el momento de desarrollo de la fragmentación celular, medidos por microscopía a intervalos, o la inclusión de la asimetría de blastómeros ayudan en la evaluación embrionaria. El potencial para alcanzar el blastocisto puede medirse determinando uno o más parámetros celulares o mediante cualquier otro método conocido en la técnica para predecir la formación de blastocistos. En ciertos aspectos, los parámetros celulares incluyen la duración de la primera citocinesis, el intervalo de tiempo entre la citocinesis 1 y la citocinesis 2, el intervalo de tiempo entre la citocinesis 2 y la citocinesis 3, el tiempo hasta la primera división celular, la morfología del embrión, los patrones de expresión génica, o cualquier otro método conocido en la técnica para determinar el potencial de un embrión para alcanzar el blastocisto y combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, los embriones que se determina que son aneuploides son embriones de trisomía. Una lista no limitativa de trisomías ejemplares detectables por los métodos de la presente invención incluyen trisomía 21 (síndrome de Down), trisomía 18 (síndrome de Edwards), trisomía 13 (síndrome de Patau); trisomía 8 (síndrome de Warkany 2), trisomía 9, trisomía 16 y trisomía 22 (síndrome del ojo de gato).

En algunas realizaciones, los embriones que se determina que son aneuploides son embriones de monosomía. Una lista no limitativa de monosomías ejemplares detectables por los métodos de la presente invención incluyen monosomía 22, monosomía 4, monosomía 5, monosomía 7, monosomía 11, monosomía 17 o monosomía X (síndrome de Turner).

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

Una vez que se han obtenido las mediciones de parámetros celulares, las mediciones se emplean para determinar el potencial de desarrollo del embrión. Como se discutió anteriormente, las expresiones "potencial de desarrollo" y "competencia del desarrollo" se refieren a la capacidad o capacidad de una célula pluripotente o tejido para crecer o desarrollarse. Por ejemplo, en el caso de un ovocito o embrión, el potencial de desarrollo puede ser la habilidad o capacidad de ese ovocito o embrión para crecer o convertirse en un blastocisto saludable. Como otro ejemplo, en el caso de una célula madre, el potencial de desarrollo es la habilidad o capacidad de crecer o desarrollarse en una o más células de interés, p.ej. una neurona, un músculo, una célula B o T y similares. En algunas realizaciones, el potencial de desarrollo de un ovocito o embrión es la habilidad o capacidad de ese ovocito o embrión para

convertirse en un blastocisto sano; implantarse con éxito en un útero; pasar por la gestación; y/o nacer vivo. En algunas realizaciones, el potencial de desarrollo de una célula pluripotente es la habilidad o capacidad de esa célula pluripotente para desarrollarse en una o más células de interés, p.ej. una neurona, un músculo, una célula B o T y similares; y/o contribuir a un tejido de interés in vivo.

- 5 Por "buen potencial de desarrollo" o "potencial de desarrollo favorable" se entiende que el embrión es estadísticamente probable que se desarrolle según lo deseado, es decir, tenga un 55%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o más de posibilidades, por ejemplo una posibilidad del 100% de desarrollarse como se desee. En otras palabras, 55 de cada 100, 60 de 100, 70 de 100, 80 de 100, 90 de 100, 95 de 100 o 100 de 100 embriones que demuestran las mediciones de los parámetros celulares utilizados para llegar a la determinación del potencial de desarrollo favorable, de hecho, continuar desarrollándose según lo deseado. Por el contrario, por "potencial de desarrollo pobre" se entiende que el embrión no es estadísticamente probable que se desarrolle según lo deseado, es decir, tenga una probabilidad del 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5% o menos, por ejemplo, 0%) de desarrollarse como se desea. En otras palabras, solo 50 de 100, 40 de 100, 30 de 100, 20 de 100, 10 de 100, o 5 de 100 o menos de los embriones que demuestran las mediciones de los parámetros celulares utilizados llega a la determinación de un potencial de desarrollo pobre, de hecho, continúa desarrollándose como se desea. Como se usa en el presente documento, los embriones "normales" o "sanos" demuestran un potencial de desarrollo favorable, mientras que los embriones "anormales" muestran un escaso potencial de desarrollo.

- En algunas realizaciones, la medición del parámetro celular se usa directamente para determinar el potencial de desarrollo del embrión. En otras palabras, el valor absoluto de la medición en sí es suficiente para determinar el potencial de desarrollo. Ejemplos de esto en las realizaciones que usan imágenes a intervalos para medir los parámetros celulares incluyen, sin limitación, las siguientes, cualquiera de las cuales, solas o en combinación, son indicativas de un potencial de desarrollo favorable en un embrión humano: (a) una citocinesis 1 que dura aproximadamente 0-30 minutos, por ejemplo, aproximadamente 6-20 minutos, en promedio aproximadamente 14,3 ± 6,0 minutos; (b) un ciclo celular 1 que dura aproximadamente 20-27 horas, p.ej. aproximadamente 25-27 horas; (c) un intervalo de tiempo entre la resolución de la citocinesis 1 y el inicio de la citocinesis 2 que es de aproximadamente 8 a 15 horas, p.ej. aproximadamente 9-13 horas, con un valor promedio de aproximadamente 11,1 +/- 2,1 horas; (d) un intervalo de tiempo, es decir, una sincronización, entre el inicio de la citocinesis 2 y el inicio de la citocinesis 3 que es de aproximadamente 0-5 horas, p.ej. aproximadamente 0-3 horas, con un tiempo promedio de aproximadamente 1,0 +/- 1,6 horas. Los ejemplos de mediciones directas, cualquiera de las cuales, solas o en combinación, son indicativas de un escaso potencial de desarrollo en un embrión humano, incluyen, sin limitación,: (a) una citocinesis 1 que dura más de aproximadamente 30 minutos, por ejemplo, aproximadamente 32, 35, 40, 45, 50, 55 ó 60 minutos o más; (b) un ciclo celular 1 que dura más de aproximadamente 27 horas, p.ej. 28, 29 o 30 o más horas; (c) un intervalo de tiempo entre la resolución de la citocinesis 1 y el inicio de la citocinesis 2 que dura más de 15 horas, p.ej. aproximadamente 16, 17, 18, 19 ó 20 o más horas, o menos de 8 horas, p.ej. aproximadamente 7, 5, 4 ó 3 horas o menos; (d) un intervalo de tiempo entre el inicio de la citocinesis 2 y el inicio de la citocinesis 3 que es 6, 7, 8, 9 ó 10 o más horas. En algunas realizaciones, al determinar que un embrión tiene un potencial de desarrollo favorable, el embrión se retira de la placa de cultivo en la que se cultiva. En algunas realizaciones, el embrión que se determina que tiene un potencial de desarrollo favorable que se retira de la placa de cultivo en la que se cultiva se transfiere a un receptor femenino.

- En algunas realizaciones, la medición del parámetro celular se emplea comparándola con una medición del parámetro celular a partir de un embrión control o de referencia, y usando el resultado de esta comparación para proporcionar una determinación del potencial de desarrollo del embrión. Los términos "referencia" y "control", tal como se usan en la presente memoria, significan un embrión o célula estandarizada que se usará para interpretar las mediciones de parámetros celulares de un embrión dado y para asignar una determinación del potencial de desarrollo al mismo. La referencia o control puede ser un embrión que se sabe que tiene un fenotipo deseado, por ejemplo, un potencial de desarrollo favorable y, por lo tanto, puede ser un embrión de referencia o control positivo. Alternativamente, el embrión de referencia/control puede ser un embrión conocido por no tener el fenotipo deseado y, por lo tanto, ser un embrión de referencia/control negativo.

- En ciertas realizaciones, la(s) medida(s) del parámetro celular obtenidas se compara(n) con una(s) medida(s) del parámetro celular comparables de un embrión de referencia/control para obtener información con respecto al fenotipo del embrión que se está ensayando. En otras realizaciones más, la(s) medición(es) del parámetro celular obtenidas se compara(n) con la(s) medida(s) del parámetro celular comparables de dos o más embriones de referencia/control diferentes para obtener información más detallada sobre el fenotipo del embrión ensayado. Por ejemplo, las mediciones de parámetros de células obtenidas de los embriones que se evalúan se pueden comparar con un embrión positivo o negativo para obtener información confirmada con respecto a si el embrión tiene el fenotipo de interés.

- Como ejemplo, la citocinesis 1 en un embrión humano normal, es decir, con potencial de desarrollo favorable, es de aproximadamente 0-30 minutos, más habitualmente de aproximadamente 6-20 minutos, en promedio aproximadamente 14,3 ± 6,0 minutos, es decir, aproximadamente 1, 2, 3, 4, o 5 minutos, más generalmente aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 minutos, en algunos casos 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o hasta aproximadamente 30 minutos. Un período de tiempo más prolongado para completar la citocinesis 1 en el embrión que se evalúa en comparación con el observado para un embrión de referencia normal es

indicativo de un escaso potencial de desarrollo. Como segundo ejemplo, el ciclo celular 1 en un embrión normal, es decir, desde el momento de la fertilización hasta la finalización de la citocinesis 1, se completa típicamente en aproximadamente 20-27 horas, más habitualmente en aproximadamente 25-27 horas, es decir, aproximadamente 15, 16, 17, 18 ó 19 horas, más generalmente aproximadamente 20, 21, 22, 23 ó 24 horas, y más generalmente aproximadamente 25, 26 ó 27 horas. Un ciclo celular 1 que es más largo en el embrión que se evalúa en comparación con el observado para un embrión de referencia normal es indicativo de un escaso potencial de desarrollo. Como tercer ejemplo, la resolución de la citocinesis 1 y el inicio de la citocinesis 2 en embriones humanos normales es de aproximadamente 8-15 horas, más frecuentemente de aproximadamente 9-13 horas, con un valor promedio de aproximadamente 11,1 +/- 2,1 horas; es decir, 6, 7 u 8 horas, más habitualmente aproximadamente 9, 10, 11, 12, 13, 14 o hasta aproximadamente 15 horas. Un ciclo celular 2 más largo o más corto en el embrión que se evalúa en comparación con el observado para un embrión de referencia normal es indicativo de un escaso potencial de desarrollo. Como cuarto ejemplo, el intervalo de tiempo entre el inicio de la citocinesis 2 y el inicio de la citocinesis 3, es decir, la sincronización de la segunda y tercera mitosis, en embriones humanos normales suele ser de aproximadamente 0-5 horas, más habitualmente de aproximadamente 0, 1, 2 ó 3 horas, con un tiempo promedio de aproximadamente 1,0 +/- 1,6 horas; un intervalo más largo entre la terminación de la citocinesis 2 y la citocinesis 3 en el embrión que se evalúa en comparación con el observado en un embrión de referencia normal es indicativo de un potencial de desarrollo deficiente. Finalmente, como ejemplo de cómo se pueden aplicar niveles de expresión génica como parámetros para evaluar el potencial de desarrollo, niveles de expresión inferiores de Cofilin, DIAPH1, ECT2, MYLC2, DGCR8, Dicer, TARBP2, CPEB1, Symplekin, YBX2, ZAR1, CTNNB1, DNMT3B, TERT, YY1, IFGR2, BTF3 y/o NELF, es decir expresiones inferiores a 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces o 100 veces, en embriones de 2 células que se evalúan en comparación con el observado para un embrión de 2 células de referencia normal es indicativo de un pobre potencial de desarrollo, mientras que la expresión que es igual o mayor que la observada para un embrión de referencia de 2 células normales es indicativo de un potencial de desarrollo favorable. Otros ejemplos pueden derivarse de datos empíricos, p.ej. observando uno o más embriones de referencia junto con el embrión a evaluar. Se puede emplear cualquier embrión de referencia, p.ej. una muestra de referencia normal con potencial de desarrollo favorable, o una muestra de referencia anormal con poco potencial de desarrollo. En algunos casos, se puede emplear más de una muestra de referencia, p.ej. se pueden usar tanto una muestra de referencia normal como una muestra de referencia anormal.

En algunas realizaciones, puede ser deseable usar mediciones de parámetros celulares que se obtienen por microscopía a intervalos o por perfil de expresión, pero no por ambos microscopía a intervalos y perfil de expresión. En otras realizaciones, puede ser deseable usar mediciones de parámetros de células a las que se llega mediante microscopía a intervalos, así como mediciones de parámetros de células a las que se llega mediante el perfil de expresión.

Como se discutió anteriormente, pueden medirse uno o más parámetros y emplearse para determinar el potencial de desarrollo de un embrión. En algunas realizaciones, una medición de un único parámetro puede ser suficiente para llegar a una determinación del potencial de desarrollo. En algunas realizaciones, puede ser deseable emplear mediciones de más de un parámetro, por ejemplo, 2 parámetros de células, 3 parámetros de células o 4 o más parámetros de células.

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

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

Por lo tanto, en un método en el que los "positivos" son los embriones que tienen un potencial de desarrollo favorable, es decir, que se convertirán en blastocistos, y los "negativos" son los embriones que tienen un escaso potencial de desarrollo, es decir, que no se convertirán en blastocistos, una sensibilidad de 100% significa que la prueba reconoce todos los embriones que se convertirán en blastocistos como tales. En algunas realizaciones, la sensibilidad del ensayo puede ser aproximadamente 70%, 80%, 90%, 95%, 98% o más, p.ej. 100%. Por especificidad se entiende la proporción de negativos que se identifican correctamente como tales. Esto puede representarse matemáticamente como:

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

Por lo tanto, en un método en el que los positivos son los embriones que tienen un potencial de desarrollo favorable, es decir que se desarrollarán en blastocistos, y los negativos son los embriones que tienen un escaso potencial de desarrollo, es decir, que no se convertirán en blastocistos, una especificidad del 100% significa la prueba reconoce todos los embriones que no se convertirán en blastocistos, es decir, se detendrán antes de la etapa de blastocito, como tal. En algunas realizaciones, la especificidad del ensayo puede ser aproximadamente 70%>, 80%>, 90%>, 95%, 98% o más, p.ej. 100%.

Como se demuestra en las secciones de ejemplos a continuación y en la figura 7, el uso de tres parámetros proporciona una sensibilidad del 94% y una especificidad del 93% con un punto de corte de 3 veces las desviaciones estándar de la distribución del blastocisto. En otras palabras, los métodos descritos en este documento

son capaces de identificar correctamente el número de embriones que van a desarrollarse en blastocistos el 94% del tiempo (sensibilidad), y el número de embriones que van a detenerse antes de la etapa de blastocisto el 93% del tiempo (especificidad). Además, los valores medios y/o puntos de corte especificados pueden modificarse según el conjunto de datos utilizado para calcular estos valores, así como también la aplicación específica.

#### 5 Determinación de la aneuploidía o del contenido cromosómico a partir de análisis de imágenes

Una vez que se han obtenido las mediciones de parámetros celulares, las mediciones se emplean para determinar el estado de aneuploidía y/o el contenido cromosómico del embrión. Como se indicó anteriormente, "aneuploidía" se refiere a embriones con un contenido cromosómico anormal, que incluye, pero no se limita a, aquellos causados por errores mitóticos o errores meióticos, que incluyen, por ejemplo, trisomías, monosomías y mosaicismo.

10 Por "normal" o "recuento normal de cromosomas" se entiende que el embrión contiene la cantidad adecuada de cromosomas pares para la especie. Por ejemplo, un embrión humano "normal" contendrá un par de 23 cromosomas para un total de 46 cromosomas.

15 En algunas realizaciones, la medición del parámetro celular se usa para determinar directamente el estado de aneuploidía y/o el recuento cromosómico de una célula embrionaria/pluripotente. En otras palabras, el valor absoluto de la medición en sí es suficiente para determinar el estado de aneuploidía y/o el recuento cromosómico del embrión/célula pluripotente. Ejemplos de esto en realizaciones que usan imágenes a intervalos para medir parámetros celulares incluyen, los siguientes, cualquiera de los cuales, solos o en combinación, son indicativos de aneuploidía en un embrión humano: (a) una citocinesis 1 que está fuera del intervalo normal de aproximadamente 0 a unos 30 minutos; (b) el intervalo de tiempo entre la citocinesis 1 y la citocinesis 2 que está fuera del intervalo normal de aproximadamente 8 a aproximadamente 15 horas; (c) el intervalo de tiempo entre la citocinesis 2 y la citocinesis 3 que está fuera del intervalo normal de aproximadamente 0 a aproximadamente 5 horas. Específicamente, cualquiera de los siguientes, solo o en combinación, es indicativo de aneuploidía: (a) una citocinesis 1 que es mayor que aproximadamente 30 minutos; (b) un intervalo de tiempo entre la citocinesis 1 y la citocinesis 2 que es inferior a aproximadamente 8 horas; y/o (c) un intervalo de tiempo entre la citocinesis 2 y la citocinesis 3 que es mayor que aproximadamente 90 minutos.

25 En algunas realizaciones, la medición del parámetro celular puede usarse para determinar si la aneuploidía detectada es el resultado de un error mitótico o meiótico. Por ejemplo, una o más de las siguientes mediciones celulares solas o en combinación indican que la aneuploidía detectada surge debido a errores mitóticos: (a) una duración de la citocinesis que es más larga que aproximadamente 35 minutos, por ejemplo aproximadamente 35,5, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 ó 100 minutos o más; (b) un intervalo de tiempo entre la citocinesis 1 y la citocinesis 2 que es más corto que aproximadamente 7 horas, por ejemplo aproximadamente 6,5, 6, 5, 4, 3, 2 ó 1 hora o menos; y/o (c) un intervalo de tiempo entre la citocinesis 2 y la citocinesis 3 que es más largo que aproximadamente 2 horas, por ejemplo aproximadamente 2,5, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ó 9 horas o más. Específicamente, las siguientes medidas, ya sea solas o en combinación, son particularmente indicativas de una aneuploidía debida a un error mitótico: (a) una duración de la primera citocinesis que es aproximadamente  $36,0 \pm 66,9$  minutos; (b) un intervalo de tiempo entre la citocinesis 1 y la citocinesis 2 que es de aproximadamente  $6,4 \pm 6,6$  horas; y/o (c) un intervalo de tiempo entre la citocinesis 2 y la citocinesis 3 que es de aproximadamente  $2,0 \pm 3,9$  horas. En otro ejemplo, una o más de las siguientes mediciones celulares solas o en combinación indican que la aneuploidía detectada surge debido a errores meióticos: (a) una duración de citocinesis que es más larga que aproximadamente 100 minutos, por ejemplo aproximadamente 105, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375 ó 400 minutos o más; (b) un intervalo de tiempo entre la citocinesis 1 y la citocinesis 2 que es más corto que aproximadamente 4 horas, por ejemplo aproximadamente 3,5, 3, 2 ó 1 hora o menos; y/o (c) un intervalo de tiempo entre la citocinesis 2 y la citocinesis 3 que es más largo que aproximadamente 2 horas, por ejemplo aproximadamente 2,5, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ó 9 horas o más. Específicamente, las siguientes medidas, solas o en combinación, son particularmente indicativas de una aneuploidía debida a un error mitótico: (a) una duración de la primera citocinesis que es de aproximadamente  $117,2 \pm 166,5$  minutos; (b) un intervalo de tiempo entre la citocinesis 1 y la citocinesis 2 que es aproximadamente  $4,0 \pm 5,2$  horas; y/o (c) un intervalo de tiempo entre la citocinesis 2 y la citocinesis 3 que es aproximadamente  $2,0 \pm 4,3$  horas. En otro ejemplo, las mediciones de parámetros celulares se usan para clasificar los embriones en niveles crecientes de severidad de embriones normales, a embriones aneuploides donde la aneuploidía se debe a uno o más errores mitóticos, a embriones aneuploides donde la aneuploidía se debe a uno o más errores meióticos.

55 En algunas realizaciones, la medición del parámetro celular se usa para seleccionar uno o más embriones con un recuento de cromosomas normal. En otras palabras, el valor absoluto de la medición en sí es suficiente para determinar si el embrión tiene o no un recuento de cromosomas normal. Ejemplos de esto en realizaciones que usan imágenes a intervalos para medir los parámetros celulares incluyen, los siguientes, cualquiera de los cuales, solo o en combinación, son indicativos de un recuento cromosómico normal en un embrión humano: (a) una citocinesis 1 que dura aproximadamente 0-30 minutos, por ejemplo, aproximadamente 6-20 minutos, en promedio aproximadamente  $14,4 \pm 4,2$  minutos; (b) un ciclo celular 1 que dura aproximadamente 20-27 horas, p.ej. aproximadamente 25-27 horas; (c) un intervalo de tiempo entre la resolución de la citocinesis 1 y el inicio de la citocinesis 2 que es de aproximadamente 8-15 horas, p.ej. aproximadamente 9-13 horas, con un valor promedio de aproximadamente  $11,8 \pm 0,71$  horas; (d) un intervalo de tiempo, es decir, una sincronidad, entre el inicio de la

citocinesis 2 y el inicio de la citocinesis 3 que es de aproximadamente 0-5 horas, p.ej. aproximadamente 0-3 horas, con un tiempo promedio de aproximadamente 0,96 +/- 0,84 horas. En otra realización, el uno o más embriones seleccionados mediante la medición del parámetro celular debido a un recuento de cromosomas normal, se proporciona a una mujer que lo necesita.

5 Informe sobre el potencial de desarrollo y/o sobre anomalías cromosómicas

En algunas realizaciones, la evaluación de un embrión incluye generar un informe escrito que incluye la evaluación del técnico del embrión objeto, p.ej. una "evaluación del potencial de desarrollo", una "evaluación de anomalías cromosómicas", etc. Por lo tanto, un método objeto puede incluir además un paso de generar o emitir un informe que proporcione los resultados de dicha evaluación, informe que se puede proporcionar en forma de un medio electrónico (por ejemplo, una pantalla electrónica en un monitor de computadora), o en la forma de un medio tangible (por ejemplo, un informe impreso en papel u otro medio material).

10

Un "informe", como se describe en el presente documento, es un documento electrónico o tangible que incluye elementos de informe que proporcionan información de interés relacionada con una evaluación a la que acceden los métodos de la invención. Un informe objeto puede ser generado, total o parcialmente, electrónicamente. Un informe objeto incluye al menos una evaluación del potencial de desarrollo del embrión objeto, una evaluación de la probabilidad de la existencia de anomalías cromosómicas, etc. Un informe objeto puede incluir además uno o más de: 1) información sobre la instalación de la prueba; 2) información del proveedor del servicio; 3) datos del sujeto; 4) datos de la muestra; 5) una sección detallada del informe de evaluación, que proporciona información sobre cómo se llegó a la evaluación, p.ej. a) mediciones tomadas del parámetro celular, b) valores de referencia empleados, si los hubiera; y 6) otras características.

15  
20

El informe puede incluir información sobre la instalación de la prueba, cuya información es relevante para el hospital, la clínica o el laboratorio en el que se realizó la recolección de muestras y/o la generación de datos. La recolección de muestras puede incluir cómo se generó la muestra, p.ej. cómo se recogió del sujeto y/o cómo se cultivó, etc. La generación de datos puede incluir cómo se adquirieron las imágenes o se analizaron los perfiles de expresión génica. Esta información puede incluir uno o más detalles relacionados con, por ejemplo, el nombre y la ubicación de la instalación de prueba, la identidad del técnico de laboratorio que realizó el ensayo y/o quién ingresó los datos de entrada, la fecha y hora en que se realizó el ensayo y/o analizó, la ubicación donde se almacenan los datos de muestra y/o el resultado, el número de lote de los reactivos (por ejemplo, kit, etc.) utilizados en el ensayo, y similares. Los campos del informe con esta información generalmente se pueden completar con la información proporcionada por el usuario.

25  
30

El informe puede incluir información sobre el proveedor del servicio, que puede ubicarse fuera del centro de atención médica en el que se encuentra el usuario o dentro del centro de atención médica. Los ejemplos de dicha información pueden incluir el nombre y la ubicación del proveedor del servicio, el nombre del revisor y, cuando sea necesario o deseado, el nombre de la persona que realizó la preparación de la muestra y/o la generación de los datos. Los campos del informe con esta información generalmente se pueden rellenar con los datos ingresados por el usuario, que se pueden seleccionar entre las selecciones escritas previamente (p. ej., usando un menú desplegable). Otra información del proveedor de servicios en el informe puede incluir información de contacto para obtener información técnica sobre el resultado y/o sobre el informe interpretativo.

35

El informe puede incluir una sección de datos del sujeto, incluyendo el historial médico de los sujetos de los que se recolectaron los ovocitos o las células pluripotentes, edad del paciente, fertilización in vitro o características del ciclo de inyección intracitoplásmica de los espermatozoides (por ejemplo, tasa de fertilización, nivel de la hormona estimulante del folículo (FSH) del día 3) y, cuando se recolectan los ovocitos, los parámetros de la cohorte del cigoto/embrión (p. ej., número total de embriones). Estos datos del sujeto pueden integrarse para mejorar la evaluación embrionaria y/o ayudar a determinar la cantidad óptima de embriones para transferir. El informe también puede incluir datos de sujetos administrativos (es decir, datos que no son esenciales para la evaluación del potencial de desarrollo) tales como la información para identificar al sujeto (por ejemplo, nombre, fecha de nacimiento del sujeto (DOB), sexo, correo y/o dirección de residencia, número de registro médico (MRN), número de habitación y/o cama en un centro de salud), información del seguro, etc., el nombre del médico u otro profesional de la salud que ordenó la evaluación del potencial de desarrollo y, si es diferente del médico que ordena, el nombre de un médico de planta que sea responsable de la atención del sujeto (p. ej., el médico de atención primaria).

40  
45  
50

El informe puede incluir una sección de datos de muestra, que puede proporcionar información sobre la muestra biológica analizada en la evaluación, tal como el tipo de muestra (embrión), cómo se manejó la muestra (por ejemplo, la temperatura de almacenamiento, protocolos preparatorios) y la fecha y hora recopiladas. Los campos del informe con esta información generalmente se pueden rellenar con los datos ingresados por el usuario, algunos de los cuales pueden proporcionarse como selecciones prescritas (p. ej., usando un menú desplegable).

55

El informe puede incluir una sección del informe de evaluación, que puede incluir información relacionada con cómo se llegó a las evaluaciones/determinaciones tal como se describe en este documento. El informe interpretativo puede incluir, por ejemplo, imágenes a intervalos del embrión que se evalúa, y/o resultados de la expresión génica. La parte de evaluación del informe también puede incluir opcionalmente una sección de recomendación(es). Por

ejemplo, cuando los resultados indican un potencial de desarrollo favorable para un embrión, la recomendación puede incluir una recomendación de que un número limitado de embriones se trasplante al útero durante el tratamiento de fertilidad como se recomienda en la técnica.

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

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

## 15 Utilidad

Como se discutió anteriormente, los métodos descritos en este documento pueden usarse para evaluar embriones para determinar su potencial de desarrollo, para seleccionar embriones con recuentos de cromosomas normales y/o clasificar embriones basándose en el tipo de aneuploidía. Estas determinaciones pueden usarse para guiar  
20 decisiones y/o acciones clínicas. Por ejemplo, para aumentar las tasas de embarazos, los médicos a menudo transfieren embriones múltiples a los pacientes, lo que puede dar lugar a embarazos múltiples que plantean riesgos para la salud tanto de la madre como de los fetos. Usando los resultados obtenidos de los métodos descritos en este documento, se determina el potencial de desarrollo de los embriones transferidos para desarrollar fetos antes del trasplante, lo que permite al médico decidir cuántos embriones transferir para maximizar las posibilidades de éxito de un embarazo a término mientras se minimiza el riesgo. Además, los métodos de la invención pueden usarse para  
25 seleccionar embriones para implantación que tienen un recuento de cromosomas normal, que no son aneuploides, para no solo aumentar las tasas de embarazo, sino también para disminuir las tasas de abortos espontáneos y disminuir las tasas de nacimientos con aneuploidía no letal, por ejemplo, al poder seleccionar frente a embriones que pueden tener anomalías cromosómicas letales, tales como, por ejemplo, la trisomía 16 o anomalías no letales tales como la trisomía 21.

30 Las evaluaciones realizadas mediante los siguientes métodos de la invención también pueden encontrar uso en la clasificación de embriones en un grupo de embriones por su potencial de desarrollo. Por ejemplo, en algunos casos, los embriones múltiples pueden ser capaces de convertirse en blastocistos, es decir, tendrán un potencial de desarrollo favorable. Sin embargo, algunos embriones tendrán más probabilidades de alcanzar la etapa de blastocitos o un blastocisto de mayor calidad que otros, es decir, tendrán un mejor potencial de desarrollo que otros  
35 embriones. En tales casos, los métodos de la invención se pueden usar para clasificar los embriones en el grupo. En dichos métodos, se miden uno o más parámetros celulares para cada embrión para llegar a una medición de parámetros celulares para cada embrión. La una o más mediciones de parámetros celulares de cada uno de los embriones se emplean a continuación para determinar el potencial de desarrollo de los embriones en relación con los otros. En algunas realizaciones, las mediciones de los parámetros celulares de cada uno de los embriones se emplean comparándolas directamente entre sí para determinar el potencial de desarrollo de los embriones. En algunas realizaciones, las mediciones de los parámetros celulares de cada uno de los embriones se emplean comparando las mediciones de los parámetros celulares con la medición de los parámetros celulares de un embrión de referencia para determinar los potenciales de desarrollo para cada embrión, y luego comparando los potenciales de desarrollo determinados para cada embrión para determinar el potencial de desarrollo de los embriones o células pluripotentes entre sí. De esta forma, un profesional que evalúa, por ejemplo, cigotos/embriones múltiples, puede elegir solo los embriones de mejor calidad, es decir, aquellos con el mejor potencial de desarrollo, para transferir a fin de maximizar las probabilidades de éxito de un embarazo a término mientras minimiza el riesgo.

De manera similar, los métodos de la invención también pueden encontrar uso en la clasificación de embriones basándose en su contenido cromosómico. Por ejemplo, en algunos casos, se encontrará que varios embriones son  
50 aneuploides. Sin embargo, algunas de las aneuploidías serán menos severas que otras. Por ejemplo, la aneuploidía causada por errores en la división de las células mitóticas generalmente es menos grave que una aneuploidía causada por errores en la división celular meiótica. En tales casos, los métodos de la invención pueden usarse para clasificar embriones en el grupo. En dichos métodos, se miden uno o más parámetros celulares para cada embrión para llegar a una medición del parámetro celular para cada embrión. La una o más mediciones celulares de cada uno de los embriones se emplean entonces para determinar si el embrión es o no aneuploide y si es aneuploide, si esa aneuploide es una aneuploidía menos grave que resulta de uno o más errores mitóticos o una aneuploidía más grave resultante de uno o más errores meióticos. En algunas realizaciones, las mediciones del parámetro celular de cada uno de los embriones o células pluripotentes se emplean comparándolos directamente entre sí para determinar el tipo/gravedad de la aneuploidía de los embriones. En algunas realizaciones, las mediciones de los parámetros celulares de cada uno de los embriones o células pluripotentes se emplean comparando las mediciones de los  
60 parámetros celulares con la medición de los parámetros celulares de un embrión de referencia para determinar el

tipo/severidad de aneuploidía para cada célula embrionaria/pluripotente, y luego comparando la aneuploidía determinada para cada embrión para determinar el tipo/gravedad de la aneuploidía de los embriones en relación con los otros. De esta forma, un profesional que evalúa, por ejemplo, múltiples cigotos/embriones, puede elegir solo los embriones de mejor calidad, es decir, aquellos que son normales o con tipos menos graves de aneuploidía, para transferir a fin de maximizar las posibilidades de éxito de un embarazo a término mientras se minimiza el riesgo.

Las evaluaciones realizadas siguiendo los métodos de la invención también pueden encontrar uso en la determinación del potencial de desarrollo de ovocitos que se maduran in vitro y células madre que se cultivan in vitro. La información sobre el potencial de desarrollo de los ovocitos obtenidos mediante los métodos de la invención puede guiar la selección del practicante de ovocitos para fertilizar, dando como resultado una mayor probabilidad de éxito en la derivación de blastocistos a partir de estos ovocitos. Del mismo modo, la información sobre el potencial de desarrollo de las células madre puede informar a la selección del médico de las células madre para usar en procedimientos para, p. ej. reconstituir o reemplazar un tejido in vivo en un sujeto que lo necesita.

#### Reactivos, dispositivos y kits

También se describen en este documento reactivos, dispositivos y kits de los mismos para practicar uno o más de los métodos descritos anteriormente. Los reactivos, dispositivos y kits objeto de los mismos pueden variar mucho. Los reactivos y dispositivos de interés incluyen aquellos mencionados anteriormente con respecto a los métodos de medición de cualquiera de los parámetros celulares mencionados anteriormente, donde tales reactivos pueden incluir placas de cultivo, medios de cultivo, microscopios, software de imágenes, software de análisis de imágenes, cebadores de ácidos nucleicos, matrices de sondas de ácidos nucleicos, anticuerpos, reactivos del sistema de producción de señal, etc., dependiendo del protocolo de medición particular que se va a realizar. Por ejemplo, los reactivos pueden incluir cebadores de PCR que son específicos para uno o más de los genes Cofilin, DIAPH1, ECT2, MYLC2/MYL5, DGCR8, Dicer/DICER1, TARBP2, CPEB1, Symplekin/SYMPK, YBX2, ZAR1, CTNNB1, DNMT3B, TERT, YY1, IFGR2/IFNGR2, BTF3 y NELF, como se describió anteriormente. Otros ejemplos de reactivos incluyen matrices que comprenden sondas que son específicas para uno o más de los genes de interés, o anticuerpos para las proteínas codificadas por estos genes de interés.

Además de los componentes anteriores, los kits objeto incluirán además instrucciones para practicar los métodos objeto. Estas instrucciones pueden estar presentes en los kits objeto en una variedad de formas, una o más de las cuales pueden estar presentes en el kit. Una forma en la que pueden estar presentes estas instrucciones es como información impresa en un medio o sustrato adecuado, por ejemplo, una pieza o varias piezas de papel en las que se imprima la información, en el envase del kit, en un prospecto, etc. Otro medio más sería un medio legible por ordenador, por ejemplo, disquete, CD, etc., sobre el que se ha grabado la información. Otro medio que puede estar presente es la dirección de un sitio web que puede usarse a través de Internet para acceder a la información en un sitio retirado. Cualquier medio conveniente puede estar presente en los kits.

#### Imagen celular automatizada con una matriz de microscopio

Algunos de los métodos descritos anteriormente requieren la capacidad de observar el desarrollo de embriones y células madre a través de imágenes a intervalos. Esto se puede lograr utilizando un sistema compuesto por un conjunto de microscopios en miniatura y multicanal que puede caber dentro de una incubadora estándar. Esto permite tomar imágenes múltiples de forma rápida y simultánea sin tener que mover físicamente las placas. Un prototipo ilustrativo, que se muestra en la figura 22, consiste en una matriz de microscopio de 3 canales con iluminación de campo oscuro, aunque podrían utilizarse otros tipos de iluminación. Por "tres canales" se entiende que hay tres microscopios independientes que representan tres placas de cultivo distintos simultáneamente. Un motor paso a paso se usa para ajustar la posición focal para enfocar o adquirir pilas de imágenes en 3D. Los LED de luz blanca se utilizan para la iluminación, aunque los inventores han observado que para los embriones humanos, el uso de LED rojos o cercanos al infrarrojo (IR) puede mejorar la relación de contraste entre las membranas celulares y las partes internas de las células. Esta relación de contraste mejorada puede ayudar con el análisis de imágenes manual y automático. Además, pasar a la región infrarroja puede reducir la fototoxicidad de las muestras. Las imágenes son capturadas por cámaras web de alta resolución y bajo costo, pero se pueden usar otros tipos de cámaras.

Como se muestra en la Fig. 22, cada microscopio del sistema prototipo descrito anteriormente se usa para obtener imágenes de una placa de cultivo que puede contener de 1 a 25 embriones. El microscopio recoge la luz de un LED de luz blanca conectado a un disipador de calor para ayudar a disipar el calor generado por el LED, que es muy pequeño para tiempos de exposición breves. La luz pasa a través de un parche convencional de campo oscuro para detener la luz directa, a través de una lente condensadora y en un espécimen etiquetado como "placa Petri", que es una placa de cultivo que contiene los embriones que se cultivan y estudian. La placa de cultivo puede tener pocillos que ayudan a mantener el orden de los embriones y evitar que se muevan mientras la placa se lleva hacia y desde la incubadora. Los pozos se pueden espaciar lo suficientemente cerca para que los embriones puedan compartir la misma caída de medios. La luz dispersa se pasa a través de un objetivo de microscopio, luego a través de un doblete acromático y en un sensor CMOS. El sensor CMOS actúa como una cámara digital y está conectado a una computadora para el análisis y seguimiento de las imágenes como se describió anteriormente.

Este diseño es fácilmente escalable para proporcionar significativamente más canales y diferentes técnicas de iluminación, y puede modificarse para acomodar dispositivos fluidicos para alimentar las muestras. Además, el diseño puede integrarse con un sistema de control de retroalimentación, donde condiciones de cultivo, tales como la temperatura, CO<sub>2</sub> (para controlar el pH) y los medios se optimizan en tiempo real en función de la respuesta y de los datos de las imágenes. Este sistema se usó para adquirir videos a intervalos del desarrollo de embriones humanos, que tiene utilidad para determinar la viabilidad embrionaria para la fertilización in vitro (FIV) o los procedimientos de inyección intracitoplásmica de esperma (ICSI). Otras aplicaciones incluyen terapia de células madre, detección de fármacos e ingeniería de tejidos.

En una realización del dispositivo, se proporciona iluminación por un diodo emisor de luz (LED) blanco Luxeon montado en un disipador de calor de aluminio y alimentado por un controlador regulado por corriente BuckPuck. La luz del LED se pasa a través de una lente de colimación. La luz colimada luego pasa a través de un tope de parche mecanizado por láser personalizado, como se muestra en la Fig. 22, y se enfoca en un cono hueco de luz usando una lente de condensador esférico. La luz que se transmite directamente a través de la muestra es rechazada por el objetivo, mientras que la luz que se dispersa por la muestra se recoge. En una realización, se usan los objetivos de Olympus con 20 aumentos, aunque se pueden usar aumentos más pequeños para aumentar el campo de visión, o se pueden usar aumentos más grandes para aumentar la resolución. La luz recogida se pasa luego a través de una lente doble acromática (es decir, lente tubular) para reducir los efectos de la aberración cromática y esférica. Alternativamente, la luz recogida del objetivo de formación de imágenes se puede pasar a través de otro objetivo, apuntando en la dirección opuesta, que actúa como un reemplazo de la lente del tubo. En una configuración, el objetivo de la imagen puede ser un objetivo de 10X, mientras que el objetivo de la lente de tubo puede ser un objetivo de 4X. La imagen resultante es capturada por un sensor CMOS con una resolución de 2 megapíxeles (1600 x 1200 píxeles). Se pueden usar diferentes tipos de sensores y resoluciones.

La figura 23A muestra un dibujo esquemático de la matriz de microscopio multicanal que tiene 3 microscopios idénticos. Todos los componentes ópticos están montados en tubos de lentes. En funcionamiento del sistema de matriz, las placas de Petri están ubicadas en las plataformas acrílicas que están montadas en las etapas de inclinación manual de 2 ejes, que permiten el ajuste del plano de la imagen en relación con el eje óptico. Estas etapas se fijan a la base del microscopio y no se mueven después de la alineación inicial. Los módulos de iluminación, que consisten en LED, lentes colimadores, topes de parche y lentes de condensador, están montados en etapas xyz manuales para la posición y enfocando la luz de iluminación. Los módulos imaginarios que consisten en objetivos, lentes acromáticos y sensores CMOS, también se montan en los estados xyz manuales para posicionar el campo de visión y enfocar los objetivos. Todos los 2 módulos de imagen están unidos a guías lineales y están soportados por un solo brazo de palanca, que se activa con un motor paso a paso. Esto permite el enfoque controlado por computadora y la captura automática de pilas de imágenes. Se pueden usar otros métodos de enfoque automático así como de actuación.

La matriz del microscopio se colocó dentro de una incubadora estándar, como se muestra en la figura 23B. Los sensores de imagen CMOS se conectan a través de una conexión USB a un único concentrador ubicado dentro de la incubadora, que se enruta a un PC externo junto con otras líneas de comunicación y energía. Todos los cables eléctricos salen de la incubadora a través del centro de un tapón de goma sellado con silicona.

El conjunto de microscopios descrito anteriormente se usó para registrar imágenes a intervalos del desarrollo temprano de embriones humanos y el crecimiento documentado desde el cigoto hasta las etapas del blastocisto. Cuatro experimentos diferentes monitorearon un total de 242 embriones. Fuera de este grupo, se obtuvieron 100 imágenes hasta el día 5 ó 6; las otras fueron retiradas de las estaciones de imágenes en varios momentos para el análisis de expresión génica. En la Fig. 24 se muestra una captura de pantalla del software de captura de imágenes y embriones con imágenes. Las imágenes se capturaron cada 5 minutos con aproximadamente 1 segundo de exposición a poca luz por imagen. La cantidad total de luz recibida por las muestras fue equivalente a 24 minutos de exposición continua, similar al nivel total experimentado en una clínica de FIV durante el manejo. La duración de 1 segundo de exposición a la luz por imagen puede reducirse. Antes de trabajar con los embriones humanos, los inventores realizaron extensos experimentos de control con embriones de preimplantación de ratón para garantizar que tanto la velocidad de formación de blastocitos como los patrones de expresión génica no se vieran afectados por el proceso de formación de imágenes.

Las Figs. 25 y 26 muestran imágenes seleccionadas de las secuencias a intervalos. Las imágenes se muestran para el día 1, el día 2,5, el día 4 y el día 5,5. Para la secuencia que se muestra en la figura 25, 3 de los 9 embriones desarrollados en blastocistos, y para la secuencia que se muestra en la figura 26, 5 de los 12 embriones se convierten en blastocistos. Los embriones individuales se siguieron con el tiempo, a pesar de que sus posiciones en el campo fotográfico cambiaron cuando los embriones experimentaron un cambio en los medios el día 3. El uso de medios secuenciales es necesario para cumplir con los requisitos específicos de cada etapa de los embriones en desarrollo. Durante el cambio de medio, los embriones se retiraron de la estación de imágenes durante unos minutos y se transfirieron a nuevas placas de Petri. Con el fin de realizar un seguimiento de la identidad de cada embrión durante el cambio de medios, la transferencia de muestras de una placa al otro se grabó en video para verificar que los embriones no se mezclaban. Este proceso también se usó durante la recolección de muestras para el análisis de expresión génica. El problema del seguimiento de la identidad del embrión puede mitigarse utilizando pozos para ayudar a organizar los embriones en un orden particular.

#### Placa Petri con micro-pozos

Al transferir las placas de Petri entre diferentes estaciones, los embriones a veces se pueden mover, lo que dificulta el seguimiento de la identidad del embrión. Esto plantea un desafío cuando se realizan imágenes a intervalos en una estación, y los embriones se mueven posteriormente a una segunda estación para la selección y transferencia de embriones. Un método es cultivar embriones en placas de Petri individuales. Sin embargo, esto requiere que cada embrión tenga su propia caída de medios. En un procedimiento típico de FIV o ICSI, generalmente es deseable cultivar todos los embriones de un paciente en la misma placa Petri y en la misma caída de medios. Para abordar este problema, los inventores han diseñado una placa Petri personalizada con micropozos. Esto evita que los embriones se muevan y mantiene su disposición en la placa Petri cuando se transfiere hacia y desde la incubadora o las estaciones de imágenes. Además, los pozos son lo suficientemente pequeños y están espaciados muy cerca de manera que puedan compartir la misma caída de medios y todos sean vistos simultáneamente por el mismo microscopio. La superficie inferior de cada micropocillo tiene un acabado de calidad óptica. La Figura 27A muestra un dibujo con dimensiones para una realización. En esta versión, hay 25 micropozos espaciados muy juntos dentro de un campo de visión de 1,7 x 1,7 mm. La Figura 27B muestra una vista en 3D de los micropozos, que están empotrados a aproximadamente 100 micras en la superficie de la placa. Los marcadores de referencia, que incluyen letras, números y otras marcas, están incluidos en la placa para ayudar con la identificación.

#### Ejemplos

Los siguientes ejemplos se presentan para proporcionar a los expertos en la materia una representación y descripción de cómo hacer y usar la presente invención, y no están destinados a limitar el alcance de lo que los inventores consideran como su invención, ni tampoco se tiene la intención de representar que los experimentos a continuación son todos o los únicos experimentos realizados. Se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.), pero se deben tener en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular medio ponderado, la temperatura es en grados centígrados y la presión es una atmosférica o cerca de ésta.

#### Fuente de las muestras

Todos los embriones utilizados en este estudio fueron recolectados durante un período de varios años y fertilizados y criopreservados por múltiples logistas de embriones. El número promedio de embriones por paciente en nuestro estudio fue de 3, y se incluyeron todos los grupos de edad encontrados en un centro de FIV de rutina. Los protocolos de estimulación eran protocolos estándar de lupron largo (cdc.gov/art). La crioconservación de embriones humanos supernumerarios se realizó colocándolos en medio de congelación (1,5 M, 1,2-propanodiol + sacarosa 0,2 M) durante 25 minutos a temperatura ambiente (22 + 2°C). Los embriones se congelaron utilizando un protocolo de congelación lenta (-1°C/min a -6,5°C, manteniendo durante 5 min; sembrado; manteniendo durante 5 min; -0,5°C/min a -80°C; baño en nitrógeno líquido). Comité. No se puede asociar información de salud protegida con los embriones.

Se validaron un gran conjunto de embriones criopreservados y se realizaron las siguientes observaciones: 1) Los embriones demostraron un tiempo indicativo de desarrollo embrionario normal en términos de puntos de referencia que incluyen: escisión a 2 células (se produjo temprano el día 2), inicio de la degradación del ARN (ocurrida en los Días 1 a 3), escisión a 4 y 8 células (se produjo al final del Día 2 y Día 3, respectivamente), activación del genoma embrionario (en el Día 3 en el estadio de 8 células) y formación de la mórula y el blastocisto (ocurrido en los días 4 y 5, respectivamente). 2) Los embriones demostraron una eficacia para alcanzar la etapa de blastocisto que es típica de los embriones obtenidos en un entorno clínico. Esto probablemente se deba al hecho de que los embriones se crioconservaron en la etapa 2PN y representaban la matriz de embriones encontrados en una clínica de FIV ya que no se realizó un "triaje" de aquellos que se desarrollarían y no se desarrollaron antes de la crioconservación en la etapa de 1 célula (como es típico de los embriones criopreservados más tarde en el desarrollo en el día 3 o etapas de blastocito). Por lo tanto, los datos de los inventores confirman que estos embriones mostraron tasas de formación de blastocisto similares en comparación con las observadas en las clínicas de FIV típicas. 3) Estudios previos han demostrado que los embriones congelados en la etapa 2PN exhiben un potencial similar para el desarrollo, la implantación, el embarazo clínico y el parto en comparación con los embriones frescos. Otros estudios también han mostrado resultados similares para ovocitos congelados, lo que sugiere que los eventos más tempranos del desarrollo de embriones humanos mantienen una línea de tiempo apropiada después de la criopreservación. 4) Los inventores se enfocaron en parámetros que no dependían del tiempo de fertilización o el tiempo de descongelación. El primer parámetro que se midió (duración de la primera citocinesis) es de corta duración (aprox. 10-15 min) y no depende del tiempo de fecundación en este estudio (se puede medir de forma independiente en todos los embriones, independientemente del resultado final). Además, todos los parámetros posteriores se miden en relación con este punto de medición inicial y se comparan entre los embriones que tienen éxito para convertirse en blastocisto y los que no lo hacen. 5) Finalmente, se observó que se sabe que los embriones nuevos (no congelados) que son 3PN se desarrollan a lo largo del mismo marco de tiempo que los embriones normales nuevos; se compararon los parámetros en los embriones 3PN frescos que se obtuvieron de la clínica de IVF de Stanford y se observó que no eran diferentes de los de los embriones de los inventores criopreservados o informes publicados.

#### Plan experimental

En cuatro conjuntos experimentales, se rastreó el desarrollo de 242 embriones en etapa pronuclear (61, 80, 64 y 37, respectivamente). En cada conjunto de experimentos, los cigotos humanos se descongelaron en el día 1 y se cultivaron en pequeños grupos en placas múltiples. Cada placa se observó independientemente con microscopio a intervalos bajo iluminación de campo oscuro en estaciones de imágenes separadas. A intervalos de aproximadamente 24 horas, se extrajo una placa de embriones del sistema de obtención de imágenes y se recogió como embriones individuales o células individuales (blastómeros) para el análisis de expresión de genes por PCR cuantitativa en tiempo real de alto rendimiento. Cada placa típicamente contenía una mezcla de embriones que alcanzaron la etapa de desarrollo esperada en el momento de la recogida (denominada "normal") y aquellos que fueron detenidos o retrasados en etapas de desarrollo anteriores, o fragmentados extensamente (denominados "anormales"). Los embriones se analizaron como embriones individuales intactos o se disociaron en blastómeros individuales seguido de amplificación de ARN específica de genes. Se obtuvieron imágenes de un subconjunto de embriones (100 de 242) hasta el día 5 ó 6 para controlar la formación de blastocistos.

#### Cultivo de embriones humanos y microscopía

Los embriones humanos se descongelaron retirando los crioviales del tanque de almacenamiento de nitrógeno líquido y colocándolos a temperatura ambiente. Una vez que se descongeló un vial, se abrió y los embriones se visualizaron bajo un microscopio de disección. El contenido del vial se vertió entonces en el fondo de una placa de cultivo 3003. Los embriones se localizaron en la gota y se evaluó y registró la supervivencia de cada embrión. A temperatura ambiente, los embriones se transfirieron a una placa de cultivo 3037 que contenía 1,2-propanodiol 1,0 M + sacarosa 0,2 M durante 5 minutos, luego 1,2-propanodiol 0,5 M + sacarosa 0,2 M durante 5 minutos y 1,2-propanodiol 0,0 M + 0,2 M de sacarosa durante 5 minutos. Posteriormente, los embriones se cultivaron en Quinn's Advantage Cleavage Medium (CooperSurgical) suplementado con 10% Quinn's Advantage Serum Protein Substitute (SPS; CooperSurgical) entre el día 1 y 3, y Quinn's Advantage Blastocyst Medium (CooperSurgical) con 10% de SPS después del día 3 usando microgotas bajo aceite. Todos los experimentos usaron el mismo tipo de medio de etapa de escisión, a excepción de dos estaciones durante el primer experimento, que utilizó un medio Global (LifeGlobal, Guilford, CT). En este pequeño subconjunto (12 embriones), los embriones mostraron una tasa de formación de blastocisto ligeramente menor (3 de 12, o 25%), pero la sensibilidad y especificidad de los parámetros predictivos de los inventores fueron ambos 100% para este grupo.

Las imágenes a intervalos se realizaron en múltiples sistemas para acomodar el análisis simultáneo de múltiples muestras, así como para validar la consistencia de los datos a través de diferentes plataformas. Los sistemas consistían en 7 microscopios individuales: (1) dos microscopios Olympus IX-70/71 modificados equipados con etapas calentadas Tokai Hit, LED Luxeon de luz blanca y una abertura para iluminación en campo oscuro; (2) dos microscopios Olympus CKX-40/41 modificados equipados con etapas calentadas, LED Luxeon de luz blanca e iluminación Hoffman Modulation Contrast (nota: estos sistemas se usaron solo durante el primero de 4 experimentos después de lo cual se decidió que la iluminación del campo oscuro era preferible para medir los parámetros); y (3) un conjunto de microscopios en miniatura de 3 canales a medida que se ajusta dentro de una incubadora estándar, equipada con LED Luxeon de luz blanca y aberturas para la iluminación de campo oscuro. No se observaron diferencias significativas en el comportamiento del desarrollo, la tasa de formación de blastocistos o los perfiles de expresión génica entre los embriones cultivados en estos sistemas diferentes; de hecho, los parámetros de los inventores para la predicción de blastocistos fueron consistentes en sistemas múltiples y experimentos.

La intensidad de luz para todos los sistemas fue significativamente menor que la luz utilizada normalmente en un microscopio de reproducción asistida debido a la baja potencia de los LED (respecto a una bombilla halógena típica de 100 W) y la alta sensibilidad de los sensores de la cámara. Usando un medidor de potencia óptica, se determinó que la potencia de un microscopio de reproducción asistida típico (Contraste de modulación Hoffman de Olympus IX-71) a una longitud de onda de 473 nm varía de aproximadamente 7 a 10 mW dependiendo de la ampliación, mientras que la potencia de los sistemas de imágenes de los inventores se midieron entre 0,2 y 0,3 mW a la misma longitud de onda. Las imágenes se capturaron con un tiempo de exposición de 1 segundo cada 5 minutos durante hasta 5 ó 6 días, lo que dio como resultado aproximadamente 24 minutos de exposición continua a la luz. Con una potencia de 0,3 mW, esto es equivalente a aproximadamente 1 minuto de exposición bajo un microscopio de reproducción asistida típico.

Para rastrear la identidad de cada embrión durante un experimento correlacionado de imágenes y expresión génica, se instaló una cámara de video en el estereomicroscopio y se registró el proceso de transferencia de muestra durante el cambio de medios y la recolección de muestras. Se realizaron experimentos de control con embriones de preimplantación de ratón (n = 56) y un pequeño subconjunto de embriones humanos (n = 22), y no se observó ninguna diferencia significativa (p = 0,96) en la tasa de formación de blastocistos entre los embriones visualizados y los de control.

#### Análisis de qRT-PCR de alto rendimiento

Para el análisis de qRT-PCR de embrión único o de blastómero único, los embriones se trataron primero con una solución de ácido Tyrode para eliminar la zona pelúcida. Para recolectar blastómeros individuales, los embriones se incubaron en medio libre de  $\text{Ca}^{2+}$   $\text{Mg}^{2+}$  Quinn's Advantage con HEPES (CooperSurgical) durante 5 a 20 minutos a 37°C con un pipeteo riguroso. Las muestras se recogieron directamente en 10  $\mu\text{l}$  de tampón de reacción; la posterior

reacción de transcripción inversa/preamplificación en un paso se realizó como se describió previamente. Se usaron mezcla de cebador y sonda de qRT-PCR 20X ABI agrupado a demanda (Applied Biosystems) como cebadores específicos de gen durante la transcripción inversa y las reacciones de preamplificación. Las reacciones de qRT-PCR de alto rendimiento se realizaron con Fluidigm Biomark 96.96 Dynamic Arrays como se describió previamente usando las sondas de qRT-PCR agrupado a demanda ABI. Todas las muestras se cargaron en 3 ó 4 réplicas técnicas. El análisis de datos qRT-PCR se realizó con qBasePlus (Biogazelle), Microsoft Excel y un software personalizado. Ciertos genes se omitieron del análisis de los datos debido a la baja calidad de los datos (por ejemplo, curvas de amplificación de PCR deficientes) o la baja o nula expresión constante en los embriones evaluados. Para el análisis de la edad de blastómeros, el panel de transcripción materna utilizado incluye DAZL, GDF3, IFITM1, STELLAR, SYCP3, VASA, GDF9, PDCD5, ZAR1 y ZP1, mientras que el panel de genes embrionarios incluye ATF7IP, CCNA1, EIFIAX, EIF4A3, H2AFZ, HSP70.1, JARID1B, LSM3, PABPC1 y SERTAD1. El valor de expresión de cada gen en relación con los genes de referencia GAPDH y RPLP0, así como en relación con el promedio del gen, se calculó usando los métodos geNorm y  $\Delta\Delta Ct$ . GAPDH y RPLP0 fueron seleccionados como los genes de referencia para este estudio basados empíricamente en el valor de estabilidad del gen y el coeficiente de variación: 1,18 y 46% para GAPDH y 1,18 y 34% para RPLP0. Estos fueron los más estables entre los 10 genes constitutivos que se probaron y dentro del rango de un conjunto de muestras heterogéneas típicas. En segundo lugar, se observó que en los blastómeros individuales, como se esperaba, la cantidad de transcripciones de RPLP0 y GAPDH disminuyó en aproximadamente 1 Ct de valor por división entre las etapas de 1 célula y 8 células, lo que concuerda con las expectativas de que cada célula hereda aproximadamente la mitad del grupo de ARNm con cada división de escisión, en ausencia de nuevas transcripciones antes de EGA durante los primeros 3 días del desarrollo humano. En tercer lugar, se observó que el nivel de expresión de estos genes de referencia en blastómeros individuales se mantuvo estable entre la etapa de 8 células a mórula, después de que comenzara la EGA. En el nivel intacto del embrión, los valores de Ct tanto de RPLP0 como de GAPDH permanecieron en gran medida constantes durante el desarrollo hasta la etapa de mórula con un ligero aumento posterior en la etapa de blastocito tal vez debido a los niveles de transcripción aumentados en el mayor número de blastómeros presentes. La mayoría del análisis de expresión génica realizado en este estudio se centró en las etapas de desarrollo anteriores a la etapa de mórula, sin embargo, cuando el nivel de expresión de los genes de referencia fue extremadamente estable.

#### Seguimiento celular automatizado

El algoritmo de seguimiento celular de los inventores utiliza un marco probabilístico basado en métodos secuenciales de Monte Carlo, que en el campo de la visión por computadora a menudo se denomina filtro de partículas. El filtro de partículas rastrea la propagación de tres variables principales a lo largo del tiempo: el estado, el control y la medición. La variable de estado es un modelo de un embrión y se representa como una colección de elipses. La variable de control es una entrada que transforma la variable de estado y consiste en el modelo de propagación y división celular de los inventores. La variable de medición es una observación del estado y consiste en las imágenes de los inventores adquiridas por el microscopio a intervalos. La estimación de los inventores del estado actual en cada paso de tiempo se representa con una distribución de probabilidad posterior, que se aproxima mediante un conjunto de muestras ponderadas llamadas partículas. Se usaron los términos partículas y modelos de embriones indistintamente, donde una partícula es una hipótesis de un modelo de embrión en un momento dado. Después de la inicialización, el filtro de partículas aplica repetidamente tres pasos: predicción, medición y actualización.

Predicción: las células se representan como elipses en el espacio 2D, y cada célula tiene un índice de orientación y superposición. El índice de superposición especifica la altura relativa de las células. En general, hay dos tipos de comportamientos que se quieren predecir: el movimiento celular y la división celular. Para el movimiento celular, la entrada de control de los inventores toma una partícula y perturba aleatoriamente cada parámetro para cada célula, incluida la posición, orientación y longitud de los ejes mayor y menor. La perturbación se muestrea aleatoriamente a partir de una distribución normal con una varianza relativamente pequeña (5% de los valores inicializados). Para la división celular, se utiliza el siguiente enfoque. En un punto dado en el tiempo, para cada partícula, se asigna un 50% de probabilidad de que una de las células se divida. Este valor se eligió empíricamente, y abarca una amplia gama de posibles divisiones celulares, al tiempo que mantiene una cobertura favorable de la configuración actual. Si se predice una división, entonces la célula divisoria se elige aleatoriamente. Cuando se elige una célula para dividir, se aplica una división simétrica a lo largo del eje principal de la elipse, produciendo dos células hijas de igual tamaño y forma. Luego, se altera aleatoriamente cada valor de las células hijas. Finalmente, se selecciona aleatoriamente los índices de superposición de las dos células hijas al tiempo que se mantiene su superposición colectiva en relación con el resto de las células.

Después de aplicar la entrada de control, se convierte cada partícula en una imagen simulada. Esto se logra al proyectar la forma elíptica de cada célula sobre la imagen simulada usando el índice de superposición. Los valores de píxel correspondientes se establecen en un valor binario de 1 y se dilatan para crear un espesor de membrana comparable a los datos observados de la imagen. Debido a que los embriones son parcialmente transparentes y se recolecta luz desenfocada, las membranas celulares en el fondo del embrión solo son a veces visibles. En consecuencia, las membranas celulares ocluidas se agregan con un 10% de probabilidad. En la práctica, se ha descubierto que estos puntos de membrana ocluidos son cruciales para el modelado de formas precisas, pero es importante hacerlos lo suficientemente escasos para que no se asemejen a un borde visible.

Medición: Una vez que se ha generado una distribución de modelos hipotéticos, las imágenes simuladas correspondientes se comparan con la imagen real del microscopio. La imagen del microscopio se procesa previamente para crear una imagen binaria de las membranas celulares utilizando un método basado en la curvatura principal seguido de umbralización. La precisión de la comparación se evalúa utilizando una distancia de chafán truncado simétrico, que luego se utiliza para asignar un peso, o probabilidad, a cada partícula.

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

Una vez que se han modelado los embriones, se pueden extraer los parámetros de imágenes dinámicas, tales como la duración de la citocinesis y el tiempo transcurrido entre mitosis, como se explica en el texto principal. El software de seguimiento celular de los inventores se implementó previamente en Matlab, y los tiempos de cálculo variaron de un par de segundos a medio minuto para cada imagen, dependiendo del número de partículas. La versión actual de los inventores del software se implementa en C, y los tiempos de cálculo varían de 1 a 5 segundos dependiendo del número de partículas.

### Ejemplo 1

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

#### Métodos

Se descongelaron embriones humanos congelados de 1 célula, también denominados cigotos, y se colocaron en cultivos y se cultivaron en condiciones tales como las usadas en procedimientos de IVF o ICSI. Como se describe con más detalle más arriba, estos embriones parecen ser representativos de la población típica de fertilización in vitro (FIV) ya que se congelaron en la etapa 2PN y, por lo tanto, se crioconservaron indiscriminadamente. Esto está en contraste con los embriones típicamente criopreservados en etapas posteriores de desarrollo después de la transferencia de aquellos percibidos como de la más alta calidad durante los nuevos ciclos. Para algunos experimentos, los embriones se colocaron en una placa de cultivo estándar. Para otros experimentos, los embriones se cultivaron en una placa de cultivo personalizado con micropocillos de calidad óptica.

Los embriones en crecimiento, típicamente entre 1 y 25 por placa, fueron seguidos individualmente por imágenes a intervalos con un microscopio controlado por computadora equipado para el almacenamiento y análisis de imágenes digitales. En algunos casos, se realizaron imágenes a intervalos con microscopios invertidos equipados con etapas calentadas y cámaras de incubación. En otros casos, se realizaron imágenes a intervalos con matrices de microscopios en miniatura personalizadas que cabían dentro de una incubadora convencional, lo que permitió el cultivo concurrente de placas múltiples de muestras en la misma incubadora y fue escalable para acomodar múltiples canales sin limitaciones en el mínimo intervalo de tiempo entre la captura de imágenes sucesivas. El uso de microscopios múltiples también eliminó la necesidad de mover la muestra, lo que mejoró la precisión del sistema y la confiabilidad general del sistema. Los sistemas de imágenes usaban iluminación de campo oscuro, que proporcionaba un contraste de imagen mejorado para la posterior extracción de características y el análisis de imágenes, aunque se observó que otra iluminación habría sido suficiente. Los microscopios individuales en la incubadora se aislaron unos de otros, proporcionando a cada placa de cultivo su propio entorno controlado. Esto permitió que las placas se transfirieran hacia y desde las estaciones de imágenes sin perturbar el entorno de las otras muestras.

Se recogieron imágenes a intervalos para el posterior análisis de la morfología celular, incluida la medición de al menos uno de los siguientes parámetros celulares: la duración de la primera citocinesis, el intervalo de tiempo entre la primera y la segunda división celular y el intervalo de tiempo entre la segunda y la tercera división celular. Las imágenes que se muestran en las figuras se tomaron con un tiempo de exposición de 1 segundo cada 5 minutos durante hasta 5 ó 6 días. Como se describe con mayor detalle a continuación, la primera citocinesis generalmente ocurre un día después de la fecundación y dura entre aproximadamente 14 minutos. La primera y la segunda divisiones celulares generalmente están separadas por un promedio de aproximadamente 11 horas. La segunda y tercera divisiones celulares generalmente están separadas por un promedio de aproximadamente 1 hora. Por lo tanto, las imágenes fueron durante un período de tiempo que duraba aproximadamente 36 horas (más o menos varias horas) después de la fertilización.

#### Resultados

La línea de tiempo de desarrollo de un embrión sano de preimplantación humana en cultivo se documentó durante un período de seis días mediante imágenes a intervalos (Fig. 2). Se observó que un cigoto humano normal se somete a la primera división de escisión temprano en el día 2. Posteriormente, el embrión se divide en un embrión de 4 células y 8 células más tarde en el día 2 y el día 3, respectivamente, antes de compactarse en una mórula el día 4. La primera diferenciación celular morfológicamente evidente se observa en los días 5 y 6 durante la formación del blastocisto, cuando los blastómeros totipotentes se diferencian en células de trofoectodermo, que dan lugar a

estructuras extraembrionarias como la placenta, o masa celular interna, que se desarrolla en el feto in vivo y células madre embrionarias pluripotentes in vitro.

Luego se sigue el desarrollo de 242 embriones fertilizados normalmente en cuatro conjuntos de experimentos independientes y se documenta la distribución de embriones normales y detenidos entre las muestras que se cultivaron hasta el día 5 ó 6. De los 242 embriones, 100 se cultivaron hasta el día 5 ó 6 y se observó que la tasa de formación de blastocisto estaba entre el 33% - 53%, similar a la tasa de formación de blastocistos en una clínica de FIV típica (Fig. 3). Los embriones restantes se detuvieron en diferentes etapas de desarrollo, más comúnmente entre las etapas de 2 células y 8 células, y se definieron como anormales (Fig. 3). Con el fin de identificar los parámetros de imágenes cuantitativas que predicen el éxito en el desarrollo embrionario a la etapa de blastocisto, se extrajeron y analizaron varios parámetros de videos a intervalos, incluyendo el tamaño del blastómero, el grosor de la zona pelúcida, el grado de fragmentación, la duración de los primeros ciclos celulares, los intervalos de tiempo entre las primeras mitosis y la duración de la primera citocinesis. Durante el análisis de las imágenes de video de embriones en desarrollo, tanto normales como anormales, se observó que muchos embriones detenidos sufrían una citocinesis aberrante durante la primera división celular. Los embriones normales completaron la citocinesis en un intervalo de tiempo estrecho de 14,3 +/- 6,0 min desde la aparición de los surcos de escisión hasta completar la separación de las células hijas, de una manera suave y controlada. Esto se muestra en la Fig. 4 superior. Por el contrario, los embriones anormales mostraron comúnmente uno de los dos fenotipos de citocinesis aberrantes. En el fenotipo más leve, la morfología y el mecanismo de la citocinesis parecían normales, pero el tiempo requerido para completar el proceso era más largo, variando desde unos pocos minutos adicionales hasta una hora (Fig. 4). Ocasionalmente, un embrión que se sometía a una citocinesis ligeramente prolongada aún se convertía en un blastocisto. En el fenotipo más severo, la morfología y el mecanismo de la citocinesis se perturbaron. Por ejemplo, como se muestra en el ejemplo en el panel inferior de la figura 4, los embriones formaron un surco de división unilateral y experimentaron una serie inusual de eventos de ondulación de la membrana durante varias horas antes de finalmente fragmentarse en componentes más pequeños. También se observaron otras variaciones de dicho comportamiento. Además, los embriones anormales que demuestran estos fenotipos más severos con frecuencia se fragmentaron, proporcionando evidencias directas de que la fragmentación del embrión es probablemente un subproducto de una citocinesis aberrante que posteriormente da como resultado un desarrollo embrionario anormal.

El análisis detallado de los resultados de las imágenes de los inventores indicó que los embriones normales seguían estrictos tiempos en citocinesis y mitosis durante las primeras divisiones, antes de que la activación del gen embrionario (EGA) comience, sugiriendo que el potencial de desarrollo de un embrión está predeterminado por programas maternos heredados. En particular, se observaron tres intervalos temporales, o parámetros, en los ciclos celulares del embrión en etapa temprana que estaban estrictamente regulados: (1) duración de la primera citocinesis, (2) intervalo de tiempo entre la primera y la segunda mitosis, y (3) sincronización de la segunda y tercera mitosis. La relación entre estos tres intervalos de tiempo y los cambios morfológicos se muestra en la Fig. 5. Para los embriones normales, se midieron estos parámetros que eran, aproximadamente, 14,3 +/- 6,0 minutos, 11,1 +/- 2,1 horas, y 1,0 +/- 1,6 horas, respectivamente (indicados aquí como la media más/menos la desviación estándar).

También se realizaron imágenes en un conjunto pequeño (n = 10) de embriones nuevos (no crioconservados) que eran 3PN (triploides) comenzando en la etapa de una sola célula. Se ha demostrado que los embriones 3PN siguen la misma línea de tiempo de los eventos emblemáticos que los embriones nuevos normales a lo largo de al menos los primeros tres ciclos celulares. Se obtuvieron imágenes de estos embriones antes de los experimentos principales de los inventores con el fin de validar los sistemas de imágenes (pero por razones técnicas no se siguió al blastocisto). De este conjunto de embriones nuevos, 3 de los embriones siguieron una línea de tiempo similar a los eventos de los embriones 2PN criopreservados de los inventores, con una duración de citocinesis que varía de 15 a 30 min, tiempo entre la primera y la segunda mitosis que varía de 9,6 a 13,8 horas y el tiempo entre la segunda y la tercera mitosis que varía de 0,3 a 1,0 horas. Sin embargo, en 7 de los embriones se observó un fenotipo de citocinesis único que se caracterizó por la aparición simultánea de 3 surcos de escisión, una citocinesis ligeramente prolongada y, finalmente, la separación en tres células hijas (Fig. 4). Estos embriones tenían una duración de citocinesis que variaba de 15 a 70 min (caracterizado como el tiempo entre el inicio de los surcos de escisión hasta la separación completa en 3 células hijas), el tiempo entre la primera y la segunda mitosis (de 3 células a 4 células) que varía de 8,7 a 12,7 horas, y el tiempo entre la segunda y la tercera mitosis (de 4 células a 5 células) que oscila entre 0,3 y 2,6 horas. Esta observación, junto con la amplia gama de fenotipos de citocinesis mostrados por embriones anormales, sugiere que los embriones criopreservados de los inventores no se retrasan en el desarrollo por el proceso de crioconservación y se comportan de manera similar a los cigotos nuevos que se dividen en 2 blastómeros.

Los embriones que alcanzaron la etapa de blastocisto podían predecirse, con sensibilidad y especificidad de 94% y 93% respectivamente, al tener una primera citocinesis de entre 0 a 33 minutos, un tiempo entre la primera y la segunda mitosis de entre 7,8 a 14,3 horas, y un tiempo entre la segunda y la tercera mitosis de entre 0 y 5,8 horas (Fig. 6). Por el contrario, se predijo que los embriones que exhibían valores fuera de una o más de estos intervalos se detendrían. Todos los embriones normales que se desarrollaron con éxito en un blastocisto exhibieron valores similares en los tres parámetros. Por el contrario, los embriones anormales exhibieron una gran cantidad de variabilidad en la duración del tiempo que tomaron para completar los intervalos (Fig. 6). Se observó que (1) un período de tiempo más largo para completar la primera citocinesis que lo normal indica un escaso potencial de desarrollo; (2) un intervalo más largo o más corto entre la primera y la segunda división celular de lo normal indica un

pobre potencial de desarrollo; y (3) un intervalo más largo entre la segunda y la tercera división celular de lo normal indica un pobre potencial de desarrollo. Por lo tanto, estos parámetros fueron predictivos de la capacidad del embrión para proceder a la formación del blastocisto y la calidad del blastocisto.

5 Finalmente, se observó que si bien cada parámetro era autonomamente predictivo del potencial de desarrollo del embrión, el uso de los tres parámetros proporcionaba una sensibilidad y especificidad que ambas excedían el 90%, con un punto de corte de 3 veces las desviaciones estándar. La curva característica operativa del receptor (ROC) para estos parámetros se muestra en la figura 7. La curva en esta figura muestra la tasa positiva real (sensibilidad) frente a la tasa de falsos positivos (1 - especificidad) para varios límites de desviación estándar. Para llegar a este ROC, se usaron los siguientes números: Número de verdaderos positivos = 34 (correctamente predichos para alcanzar el blastocisto); número de negativos verdaderos = 54 (predichos correctamente para detenerse); número de falsos positivos = 4 (incorrectamente pronosticados para alcanzar el blastocisto); número de falsos negativos = 2 (pronosticados incorrectamente para detenerse).

#### Discusión

15 El análisis de los inventores indica que los embriones que siguen un tiempo estricto en mitosis y citocinesis durante las primeras tres divisiones de escisión son mucho más propensos a desarrollarse en el estadio de blastocisto y formar un blastocisto de alta calidad con una masa celular interna expandida (MCI). Los parámetros morfológicos dinámicos pueden usarse para seleccionar los embriones óptimos para la transferencia o criopreservación durante un procedimiento de FIV. Estos parámetros también se pueden utilizar para distinguir entre las diferentes cualidades del blastocisto, lo que permite una clasificación de los potenciales de desarrollo relativos de los embriones dentro de un grupo. La práctica estándar en las clínicas de FIV es la transferencia en la etapa de 8 células (día 3). Algunas clínicas eligen cultivar embriones en la etapa de blastocito (día 5), ya que la transferencia de los blastocitos tiene hasta el doble de las tasas de implantación en comparación con la transferencia del día 3. Sin embargo, muchas clínicas evitan el cultivo prolongado debido al mayor riesgo de trastornos epigenéticos. Los parámetros de imaginología predictiva pueden usarse para predecir la viabilidad embrionaria por la etapa de 4 células (en el día 2) y antes de la activación del gen embrionario. Esto puede permitir la transferencia o criopreservación de embriones un día antes de lo que se practica normalmente y antes de que los embriones experimenten cambios significativos en sus programas moleculares. Esto también permite seleccionar los embriones más óptimos para PGD u otros tipos de análisis.

#### Ejemplo 2

30 Validación de parámetros de imágenes a través del análisis de la expresión génica y el uso de análisis de expresión génica para determinar el potencial de desarrollo.

#### Métodos

35 Se descongelaron embriones humanos congelados de 1 célula, también denominados cigotos, y se colocaron en cultivo y se cultivaron en condiciones tales como las usadas en los procedimientos de FIV. Para algunos experimentos, los embriones se colocaron en una placa de cultivo estándar. Para otros experimentos, los embriones se cultivaron en una placa de cultivo personalizado con micropocillos de calidad óptica.

40 Los embriones se retiraron del cultivo y del sistema de obtención de imágenes y se recogieron como embriones individuales o células individuales (blastómeros) para el análisis de expresión génica. Cada placa típicamente contenía una mezcla de embriones, algunos alcanzando la etapa de desarrollo esperada en el momento de la recolección, y otros deteniéndose en etapas de desarrollo anteriores o fragmentándose extensamente. Aquellos que alcanzaron la etapa de desarrollo esperado en el momento de la recolección se clasificaron como "normales", mientras que aquellos que se detuvieron se consideraron "anormales". Por ejemplo, cuando se extrajo una placa de embriones de la estación de imágenes al final del día 2 para la recolección de muestras, cualquier embrión que había alcanzado la etapa de 4 células y más se identificaba como normal, mientras que aquellos que no alcanzaron la etapa de 4 células era etiquetado de detenido. Estos embriones detenidos se categorizaban según la etapa de desarrollo en la que se detuvieron, de modo que un embrión con solo 2 blastómeros al final del día 2 se analizaba como un embrión de 2 células detenido. Se tuvo cuidado de excluir embriones que morfológicamente parecían estar muertos y porosos en el momento de la recolección de la muestra (por ejemplo, blastómeros degenerados). Solo los embriones que parecían vivos (tanto normales como detenidos) se usaron para el análisis de expresión génica. Sin embargo, es posible que los embriones que parecían normales durante el momento de la recolección finalmente se detuvieran si se les permitía crecer en una etapa posterior. El análisis de expresión génica de los embriones representativos de cada una de estas clases se realizó mediante RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR). A intervalos de aproximadamente 24 horas, se recogieron embriones de los sistemas de imágenes individuales para el análisis de expresión génica de qRT-PCR de alto rendimiento con reacciones múltiples de hasta 96 genes analizados frente a 96 muestras. El análisis de expresión génica se realizó con el Fluidigm Biomark System, que puede llevar a cabo hasta 9216 reacciones simultáneas de qRT-PCR basadas en el ensayo TaqMan en cantidades de nano-litros.

#### Resultados

Con el fin de dilucidar los mecanismos moleculares que pueden subyacer a los eventos morfológicos, se realizó un perfil de expresión génica correlacionada. Los niveles de expresión de 96 genes diferentes pertenecientes a diferentes categorías se analizaron por muestra, incluidos los genes constitutivos, marcadores de células germinales, factores maternos, marcadores EGA, marcadores de trofoblasto, marcadores de masa celular interna, marcadores de pluripotencia, reguladores epigenéticos, factores de transcripción, receptores hormonales y otros (Tabla 1, en la Figura 19). Dos conjuntos de genes ligeramente diferentes pero superpuestos se analizaron en dos conjuntos experimentales diferentes, proporcionando un conjunto único de genes de diagnóstico del destino del embrión humano. Los conjuntos de genes únicos se compilaron a partir de datos sobre la expresión de genes en embriones de organismos modelo o en células madre embrionarias humanas, así como a partir de nuestros propios datos de microarrays no publicados. El estado de expresión de estos conjuntos de genes en embriones humanos de preimplantación se revela por primera vez en este estudio.

El valor de expresión de cada gen relativo a los genes de referencia GAPDH y RPLPO, así como en relación con el promedio del gen, se calculó usando los métodos geNorm (El-Toukhy T, et al. (2009) Hum Reprod) y AACT (Vanneste E, et al. (2009) Nat Med 15: 577 - 83). El valor de estabilidad del gen y el coeficiente de variación fue 1,18 y 46% para GAPDH y 1,18 y 34% para RPLPO, la mayoría estable entre los 10 genes constitutivos que se probaron y dentro del rango de un conjunto de muestra heterogéneo típico. En blastómeros individuales, como se esperaba, la cantidad de transcritos de RPLPO y GAPDH disminuyó en aproximadamente valor 1 Ct por división entre etapas de 1 célula y 8 células, debido al efecto de división a la mitad de división y la ausencia de EGA durante los primeros 3 días del desarrollo humano. El nivel de expresión de estos genes de referencia en blastómeros individuales se mantuvo estable entre la etapa de 8 células a la de la mórula. En todo el nivel embrionario, los valores de Ct tanto de RPLPO como de GAPDH permanecieron en gran medida constantes a lo largo del desarrollo hasta la etapa de la mórula. El nivel de expresión de RPLPO y GAPDH aumentó significativamente en los blastocistos, muy probablemente debido al mayor número de blastómeros presentes. Estas variaciones no afectaron a la validez de RPLPO y GAPDH como genes de referencia. La mayoría del análisis de expresión génica realizado en este estudio se centró en las etapas de desarrollo antes de la etapa de mórula, cuando el nivel de expresión de los genes de referencia era extremadamente estable.

Expresión diferencial de genes entre embriones normales y anormales.

La Fig. 8 muestra el nivel de expresión promedio de 52 genes de 6 embriones anormales de 1 a 2 células y 5 embriones de 1 a 2 células normales trazados en un gráfico de radar en una escala logarítmica. En general, los embriones detenidos mostraban una cantidad reducida de ARNm en comparación con los embriones normales, con genes que facilitaban la citocinesis, el procesamiento del ARN y la biogénesis de los miARN más severamente afectados. Los genes resaltados con un asterisco indican una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre los embriones normales y anormales según lo determinado por la prueba de Mann-Whitney. Estos 18 genes son Cofilin, DIAPH1, ECT2, MYLC2, DGCR8, Dicer, TARBP2, CPEB1, Symplekin, YBX2, ZAR1, CTNNB1, DNMT3B, TERT, YY1, IFGR2, BTF3 y NELF. Cada gen pertenece a un grupo como se indica en la figura, a saber, citocinesis: cofilina, DIAPH1, ECT2 y MYCL2; biogénesis de miARN: DGCR8, Dicer y TARBP2; Procesamiento de ARN: YBX2; factores maternos: ZAR1; constitutivo: CTNNB1; pluripotencia: DNMT3B, TERT y YY1; receptor: IGFR2; y factor de transcripción: BTF3 y NELF. En la mayoría de los casos, la expresión de estos genes fue mayor en embriones normales de 1 y 2 células que en embriones de 1 y 2 células detenidos.

Curiosamente, ciertas categorías de genes se vieron más afectadas en embriones anormales que en otros. Por ejemplo, en embriones anormales, la mayoría de los genes constitutivos, receptores hormonales y factores maternos no se alteraron apreciablemente en la expresión génica, mientras que muchos genes implicados en la citocinesis y la biogénesis de miRNA mostraron una expresión significativamente reducida. Además, entre los genes que se vieron afectados, algunos genes mostraron una diferencia mucho mayor entre embriones normales y anormales que otros. Por ejemplo, los genes implicados en la vía de biogénesis de miARN, tales como DGCR8, Dicer y TARBP2, exhibieron niveles de expresión altamente reducidos en embriones anormales. Notablemente, CPEB1 y Symplekin, dos de los genes más gravemente afectados, pertenecían al mismo mecanismo molecular que regula el almacenamiento del ARNm materno y la reactivación manipulando la longitud de la cola de poli(A) de un transcrito (Bettegowda, A. et al. (2007) Front. Biosci. 12:3713-3726). Estos datos sugieren que la anomalía embrionaria se correlaciona con defectos en el programa de regulación del ARNm del embrión.

Correlacionar la citocinesis con los perfiles de expresión génica. El análisis de la expresión génica se realizó con genes que codificaban componentes clave de citocinesis. La identidad de cada embrión se rastreó instalando una cámara en el estereomicroscopio y grabando en video el proceso de transferencia de muestra durante el cambio de medios y la recolección de muestras. Al evaluar los perfiles de expresión génica de embriones anormales, se observó una fuerte correlación entre la citocinesis aberrante y el nivel de expresión génica más bajo en los componentes clave de la citocinesis. Curiosamente, los perfiles de expresión génica de embriones anormales fueron tan diversos y variables como sus fenotipos morfológicos aberrantes.

Se descubrió que la expresión del gen de la citocinesis variaba entre embriones normales de 2 células y embriones anormales de 2 células (figura 9) y entre embriones de 4 células normales y anormales (Fig. 10). Las Figuras 9 y 10 muestran expresiones relativas de genes que se expresan más en embriones humanos normales de dos células (Figura 9) y embriones normales de 4 células (Figura 10), correlacionados con diferentes fenotipos de citocinesis.

Tal como se representa en la figura 9, un embrión de 2 células detenido que mostró fruncimiento anormal de la membrana durante la primera citocinesis tuvo un nivel de expresión significativamente reducido de todos los genes reguladores de citocinesis probados. Los genes que muestran diferencias en la Fig. 9 son anilina, cofilina, DIAPH1, DIAPH2, DNM2, ECT2, MKLP2, MYCL2 y RhoA. Los niveles de expresión normales se dan en las barras de la derecha y se puede ver que son más altos en cada gen. En las fotografías de arriba de los gráficos de la Figura 9, que muestran embriones anormales de dos células, la barra de escala representa 50  $\mu\text{m}$ . La figura 10 muestra los resultados de un embrión de 4 células detenido que se sometió a citocinesis aberrante con un surco de citocinesis unilateral y una citocinesis extremadamente prolongada durante la primera división mostró una expresión disminuida en los reguladores de citocinesis Anillin y ECT2. La barra de escala en la Fig. 10 también representa 50  $\mu\text{m}$ .

Patrones de expresión de genes específicos de la etapa embrionaria. La figura 11 muestra cuatro patrones específicos de la etapa embrionaria (ESSP) que se identificaron durante el análisis de expresión génica de 141 embriones individuales y blastómeros individuales desarrollados normalmente. Los genes que caen en cada uno de los cuatro ESSP se enumeran en la Tabla 2 (Fig. 20). Las representaciones en la Fig. 11 se crearon agrupando genes basados en patrones de expresión similares y promediando sus valores de expresión (relativos a los genes de referencia). El nivel de expresión relativa de un ESSP se calculó promediando los niveles de expresión de genes con un patrón de expresión similar. Los niveles de expresión génica se representan gráficamente frente a diferentes etapas celulares, es decir, 1c = una célula; M = mórula, B = blastocisto. En la Fig. 11, la expresión relativa de genes en cada uno de los cuatro ESSP se muestra como una función del desarrollo, desde 1 célula (1c) hasta mórula y blastocisto. ESSP1 muestra la herencia materna, ESSP2 muestra la activación de transcripción genética, ESSP3 muestra la activación en la etapa tardía y ESSP4 muestra transcripciones persistentes. Como se indica en ESSP2, el punto de transferencia típico en una clínica de FIV ocurre el día 3, cuando los embriones están experimentando cambios significativos en el desarrollo debido a la activación del gen embrionario. Los datos de imágenes a intervalos indican que el potencial de desarrollo de un embrión puede identificarse mediante la etapa de 4 células, lo que permite una transferencia más temprana de embriones en el día 2 y antes de la activación de este gen. Esta transferencia temprana es útil para mejorar la tasa de éxito de los procedimientos de FIV.

La Tabla 2 (Fig. 20) enumera los genes que pertenecen a cada uno de los cuatro ESSP identificados. El nivel relativo de expresión génica de cada gen se calculó frente a los genes de referencia (GAPDH y RPLPO) y con relación al promedio del gen. El patrón de expresión de cada gen frente a la línea de tiempo del desarrollo del embrión siguió uno de los cuatro siguientes ESSP: Patrón ESSP (1) Etapa temprana: genes que comienzan altos, se degradan lentamente y se inactivan antes del blastocisto; Patrón de ESSP (2) Etapa intermedia: genes que se activan después de la etapa de 4 células; Patrón de ESSP (3) Etapa tardía: genes que se activan en la mórula o el blastocisto; y patrón ESSP (4) Constante: genes que tienen valores de expresión relativamente constantes.

ESSP1 describió el patrón de genes heredados por la madre. Estas transcripciones comenzaron con un alto nivel de expresión en la etapa de cigoto y posteriormente disminuyeron a medida que los embriones se desarrollaban en blastocistos. La vida media de estas transcripciones fue de aproximadamente 21 horas. Los factores maternos clásicos de otros organismos modelo, tales como GDF9 y ZAR1, así como los genes específicos de células germinales (ovocitos), VASA y DAZL cayeron dentro de esta categoría. ESSP2 incluyó los genes embrionarios activados, que se transcribieron por primera vez en los embriones después de la etapa de 4 células. Algunos genes en esta categoría parecían mostrar dos ondas de activación, la primera y más pequeña en la etapa de 5 a 6 células, y la segunda y más grande en la etapa de 8 células. Los genes EGA conocidos de otros organismos modelo, tales como EIF1AX31 y JARID1 B32, cayeron en esta categoría. ESSP3 estaba compuesto por genes activados tardíamente que no se expresaron hasta la etapa de blastocisto, incluido el marcador de trofoblasto GCM1. ESSP4 contenía transcripciones persistentes que mantenían una expresión estable en relación con los genes de referencia a lo largo del desarrollo. La vida media de estos genes fue de 193 horas, aproximadamente 9 veces más que ESSP1. Esta categoría incluye una mezcla de genes constitutivos, factores de transcripción, reguladores epigenéticos, receptores de hormonas y otros. Estos 4 patrones de expresión génica se confirmaron en otro conjunto de experimentos usando 61 muestras de embriones y blastómeros normales únicos.

Los embriones anormales, que exhiben un comportamiento citocinético y mitótico aberrante durante las primeras divisiones, se correlacionaron con perfiles de expresión génica muy erráticos, especialmente en genes implicados en el manejo del ARN embrionario. Por lo tanto, se pueden combinar estas metodologías para proporcionar métodos que pueden usarse para predecir la viabilidad del embrión antes de la implantación. Los resultados sugieren que los embriones anormales comienzan la vida con programas defectuosos en el procesamiento de ARN y la biogénesis de miARN, causando una degradación excesiva del ARNm materno. La naturaleza estocástica de dicha degradación de ARN no regulada conduce a la destrucción aleatoria de transcritos, causando la gran variedad de fenotipos aberrantes observados en embriones anormales. La disminución del nivel de miARN causa defectos en la degradación regulada del ARN materno, lo que lleva a la detención del desarrollo en diferentes etapas.

Análisis de blastómeros individuales. Con el fin de evaluar cuándo comenzó la diferenciación molecular en embriones humanos de preimplantación, se analizó el nivel de expresión de CDX2 en blastómeros individuales recolectados a partir de 17 embriones en diferentes etapas de desarrollo. La Figura 12A muestra el nivel relativo de expresión de dos genes, CTBBN1 (barras oscuras) y CDX2 (barras claras) como una función de la etapa de desarrollo, desde 2 células hasta blastocisto. Como puede verse, CDX2 se expresó esporádicamente a niveles bajos en algunos blastómeros individuales de embriones antes de la etapa de 4 células (Fig. 12A). Sin embargo, desde la

etapa de 6 células en adelante, cada embrión contenía al menos 1 blastómero que expresaba CDX2 en un nivel significativo. El nivel de expresión del gen constitutivo CTNNB1, que también se muestra en la Fig. 12A, se mantuvo constante entre los blastómeros del mismo embrión, lo que indica que el patrón de expresión heterogéneo de CDX2 no era un artefacto de qPCR. Los datos de un experimento independiente demuestran observaciones similares. Estos resultados indican que la diferenciación molecular en embriones humanos de preimplantación podría ocurrir tan pronto como inmediatamente después de la etapa de 4 células.

Curiosamente, la inspección de los perfiles de expresión génica en blastómeros individuales reveló embriones que contenían blastómeros con firmas de expresión génica correspondientes a diferentes edades de desarrollo. El perfil de expresión génica de cualquier embrión dado en un momento dado es igual a la suma de la degradación del ARNm materno y EGA. Un blastómero más joven de edad temprana de desarrollo típicamente contiene una gran cantidad de transcripciones maternas y una baja cantidad de genes zigóticos, y lo contrario es cierto para un blastómero más viejo en una edad de desarrollo más avanzada. En este experimento, el programa material se definió como los valores medios de expresión de 10 marcadores ESSP1 (transcritos maternos) y el programa embrionario por los valores medios de expresión de 10 marcadores ESSP2 (transcritos embrionarios). El panel de transcripción materna utilizado incluye DAZL, GDF3, IFITM1, STELLAR, SYCP3, VASA, GDF9, PDCD5, ZAR1 y ZP1, mientras que el panel de genes embrionarios incluye ATF7IP, CCNA1, EIF1 AX, EIF4A3, H2AFZ, HSP70.1, JARID1 B, LSM3, PABPC1 y SERTAD1. Entre los 6 blastómeros obtenidos con éxito de este embrión de 8 células, 3 blastómeros presentaron una firma de expresión génica similar a blastómeros de una muestra de embrión normal de 3 células, mientras que los otros 3 blastómeros fueron similares a los blastómeros de una muestra de embrión normal de 8 células (Figura 12B). La explicación más probable de esta observación es la detención de una subpoblación de células dentro del embrión. Este fenotipo de detención parcial también se observó en otro embrión de 9 células y 2 mórulas entre las muestras que probamos. El hecho de que el nivel de transcripción materna permaneciera alto en los blastómeros detenidos, que habían pasado la misma cantidad de tiempo en cultivo que sus células hermanas normales, indica que la degradación del ARN materno no es un proceso espontáneo que simplemente ocurra a través del tiempo sino que muy probablemente requiere el funcionamiento de mecanismos de degradación de ARN específicos tales como microARN (miARN). Estos datos también proporcionan evidencia adicional de que la degradación del ARNm materno es un evento de desarrollo conservado durante la embriogénesis de mamíferos y se requiere para el desarrollo normal del embrión (Bettegowda, A., et al. (2008) *Reprod. Fertil. Dev.* 20:45-53). Además, estos datos sugieren que los blastómeros individuales en un embrión son autónomos y pueden desarrollarse independientemente el uno del otro. Además, estos resultados indican que se pueden usar las pruebas del nivel de expresión génica descritas en este documento para evaluar el nivel de un ARNm (que es indicativo del nivel de expresión génica) en una célula a analizar, donde el ARN es de un gen que se sabe que es parte del programa materno, y la persistencia de dicho nivel de expresión en una etapa posterior del desarrollo embrionario se correlaciona con una probabilidad de resultado anormal o parte del programa embrionario, donde la ausencia en el tiempo es indicativa de una probabilidad de un resultado anormal. Los genes del programa materno examinados aquí son ZAR1, PDCD5, NLRP5, H5F1, GDF9 y BNC2. Se conocen y pueden usarse otros genes de efectos maternos.

Activación de genes embrionarios. Los presentes métodos se basan, al menos en parte, en los hallazgos de que los embriones anormales, detenidos durante el desarrollo, exhiben con frecuencia una citocinesis aberrante y un tiempo mitótico durante las primeras tres divisiones antes de que ocurra EGA (activación del gen embrionario). Esto sugiere que el destino del desarrollo de embriones está en gran medida determinado por la herencia materna, un hallazgo en notable acuerdo con un modelo matemático de desarrollo de preimplantación humano realizado por Hardy et al. en 200134. Además, las anomalías de la citocinesis y la mitosis se correlacionan fuertemente con la disminución de los niveles de transcritos maternos en genes que regulan la biogénesis de miARN y el enmascaramiento del ARNm materno, el almacenamiento y la reactivación. Los miARN regulan la traducción promoviendo la degradación del ARNm en diversos procesos biológicos, incluido el desarrollo y la diferenciación del organismo (Blakaj, A. y Lin, H. (2008) *J. Biol. Chem.* 283: 9505-9508; Stefani, G. & Slack, F. J. (2008) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9:219-230). La creciente evidencia de organismos modelo muestra que los miRNAs pueden ser los reguladores clave de la degradación del transcrito materno en embriones tempranos (Bettegowda, A., et al. (2008) *Reprod. Fertil. Dev.* 20:45-53). Por lo tanto, los defectos en la biogénesis de miARN probablemente conducirán a un desarrollo embrionario anormal. Por otro lado, la falla en el manejo adecuado de los ARNm maternos también puede conducir a una embriogénesis deficiente. Los ovocitos de mamífero sintetizan una gran cantidad de transcritos de ARN maternos necesarios para apoyar el crecimiento embrionario temprano antes del nacimiento de la madre. Estas transcripciones se reprimen y almacenan durante un período prolongado de tiempo, hasta que se reactivan después de la fertilización. Los defectos en este programa de administración de ARN materno probablemente afectarán a la cantidad y calidad de las transcripciones maternas y, por lo tanto, pondrán en peligro las posibilidades de un desarrollo exitoso.

Modelo para evaluar la viabilidad embrionaria. La Fig. 13 muestra un modelo para el desarrollo de embriones humanos basado en imágenes correlacionadas y análisis molecular. Se muestra la línea de tiempo del desarrollo de cigoto a blastocito, que incluye tiempos críticos breves para la predicción del desarrollo exitoso a blastocisto y un diagrama del desarrollo de embriones. Datos moleculares clave, como se muestra en el diagrama, indican que los embriones humanos comienzan la vida con un conjunto distinto de ARN de ovocitos que se heredan de la madre. Este conjunto de ARN se mantiene y se empaqueta adecuadamente mediante programas de administración de ARN

específicos en el huevo. Después de la fertilización, la degradación de un subconjunto de ARN maternos específicos del huevo (ESSP1, patrón específico del estadio embrionario 1) debe degradarse a medida que comienza la transición del ovocito al embrión. En paralelo, otros ARN están idealmente divididos por igual para cada blastómero a medida que el desarrollo continúa (ESSP4). La degradación y la partición exitosas de los ARN culmina con la activación del genoma embrionario (EGA) y la transcripción de los genes de ESSP2 en una célula de manera autónoma. Notablemente, durante las divisiones de escisión, los blastómeros embrionarios pueden detenerse o progresar independientemente. El resultado del desarrollo autónomo celular en el embrión es que los blastómeros individuales pueden detenerse o progresar y, a medida que el embrión de 8 células progresa a mórula y más allá, la calidad del blastocisto se verá afectada por el número de células que se detienen o progresan más allá de las 8 células. Los datos de imágenes demuestran que hay períodos críticos de desarrollo que predicen el éxito o el fracaso: la primera citocinesis, la segunda división de escisión y la sincronización de la segunda y tercera divisiones de escisión. Estos parámetros se pueden medir automáticamente utilizando los algoritmos de seguimiento de células y el software descrito anteriormente. Los sistemas y métodos descritos se pueden usar para diagnosticar el resultado embrionario con predictores clave de imágenes y pueden permitir la transferencia de menos embriones en etapas más tempranas del desarrollo (antes del EGA).

### Ejemplo 3

Imagen de la maduración de ovocitos y posterior desarrollo embrionario.

#### Resultados

Una de las principales limitaciones de los procedimientos actuales de FIV es la calidad y disponibilidad de los ovocitos. Por ejemplo, los protocolos actuales de IVF reclutan ovocitos del pequeño grupo cíclico, proporcionando un pequeño número de ovocitos (por ejemplo, 1-20) para la fertilización. Además, aproximadamente el 20% de los ovocitos recuperados después de la estimulación hormonal durante los procedimientos de FIV se clasifican como inmaduros, y típicamente se descartan debido a un potencial reducido para el desarrollo de embriones en las condiciones de cultivo actuales.

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

Otro método para aumentar el grupo de ovocitos es reclutar ovocitos del grupo primario y secundario, proporcionando hasta varios miles de ovocitos. En este procedimiento, los folículos dormidos se reclutan desde el ovario y se programan in vitro para producir ovocitos con composición cromosómica normal, estado epigenético, expresión de ARN y morfología. En otros aspectos, los ovocitos pueden derivarse de células madre pluripotentes diferenciadas in vitro en células germinales y maduras en ovocitos humanos.

Como se ilustra en la Fig. 14, el proceso de maduración de un ovocito in vitro está marcado por varios cambios celulares que pueden usarse para definir parámetros celulares para la medición y el análisis en los métodos de la presente invención. Estos incluyen, por ejemplo, cambios en la morfología de la membrana del ovocito, p.ej. la tasa y el grado de separación de la zona pelúcida; cambios en la morfología del núcleo del ovocito, p.ej. la iniciación, la finalización y la tasa de ruptura de vesículas germinales (GVBD); la velocidad y la dirección del movimiento de los gránulos en el citoplasma y el núcleo; y el movimiento y la extrusión del primer cuerpo polar.

### Ejemplo 4

Imágenes de diferenciación de células madre.

#### Resultados

El análisis de imágenes a intervalos también se puede usar para evaluar la viabilidad, el potencial de desarrollo y los resultados de otros tipos de células, tales como las células madre, las células madre pluripotentes inducidas (iPSCs) y las células madre embrionarias humanas (hESCs). El potencial de desarrollo de las células madre se puede evaluar mediante el uso de análisis de imágenes a intervalos para medir los cambios en la morfología durante el desarrollo celular y la diferenciación (Fig. 17). Las células diferenciadas pueden luego analizarse y seleccionarse para un trasplante in vivo u otro uso. Varios parámetros de las células madre pueden extraerse y analizarse a partir de los datos de imágenes a intervalos, tales como la duración de la citocinesis, el tiempo entre eventos de mitosis, el tamaño y la forma de la célula, el número de células, el movimiento de las células, los patrones de división, diferenciación, división asimétrica (donde una célula hija mantiene una célula madre mientras que la otra se diferencia), división simétrica (donde ambas células hijas permanecen como células madre o ambas se diferencian) y especificación del destino (que determina con precisión cuándo se diferencia una célula madre).

La fórmula básica de la terapia con células madre es que las células madre indiferenciadas pueden cultivarse in vitro, diferenciarse a tipos celulares específicos, y posteriormente trasplantarse a receptores para la regeneración de

tejidos y/u órganos lesionados. El análisis de imágenes a intervalos puede usarse como un dispositivo no invasivo de alto rendimiento para identificar células madre que forman una progenie diferenciada no tumorigénica capaz de integrarse en tejidos maduros. Las posibles aplicaciones incluyen el tratamiento de trastornos neurológicos tales como el Alzheimer y el Parkinson, trastornos del sistema vascular y cardiopatías, trastornos musculares y esqueléticos tales como artritis, enfermedades autoinmunes y cánceres, así como el descubrimiento de fármacos mediante la evaluación de dianas y nuevas terapias.

En los seres humanos, los tejidos dañados generalmente se reemplazan por el reclutamiento continuo y la diferenciación de las células madre en el cuerpo. Sin embargo, la capacidad del cuerpo para la regeneración se reduce con el envejecimiento. Un ejemplo de esto es la incontinencia urinaria resultante de la deficiencia del esfínter. Se cree que el envejecimiento es una de las principales causas de la deficiencia del esfínter porque la cantidad de fibras musculares y la densidad de los nervios disminuyen con la edad. Con el fin de tratar pacientes con incontinencia, iPSCs pueden derivarse de fibroblastos cultivados a partir de tejidos de la pared vaginal con el fin de producir células de músculo liso diferenciadas. Estas células diferenciadas pueden luego transplantarse in vivo. Antes del trasplante, se puede utilizar el análisis de imágenes en intervalos de tiempo para caracterizar los iPSC con respecto a la pluripotencia, la diferenciación, la metilación y la tumorigenicidad. Otras aplicaciones incluyen imágenes a intervalos de iPSCs que se derivan de células de la piel de pacientes con Parkinson y se diferencian en neuronas para el trasplante (Fig. 18).

### Ejemplo 5

Validación de parámetros de imágenes a través del análisis automatizado

Como lo demuestran los datos de los inventores de imágenes a intervalos, el desarrollo de embriones humanos es un proceso muy variable entre los embriones dentro de una cohorte y los embriones pueden exhibir una amplia gama de comportamientos durante la división celular. Por lo tanto, la caracterización manual de ciertos eventos del desarrollo tales como la duración de la citocinesis altamente anormal (Fig. 4) puede estar sujeta a interpretación. Para validar los parámetros de imagen de los inventores y la capacidad de predecir sistemáticamente la formación de blastocistos, se desarrolló un algoritmo para el seguimiento automático de las divisiones celulares hasta la etapa de 4 células. El algoritmo de seguimiento de los inventores emplea una técnica probabilística de estimación de modelos basada en métodos secuenciales de Monte Carlo. Esta técnica funciona generando distribuciones de modelos de embriones hipotéticos, simulando imágenes basadas en un modelo óptico simple y comparando estas simulaciones con los datos de imágenes observados (Fig. 21a).

Los embriones se modelaron como una colección de elipses con posición, orientación e índice de superposición (para representar las alturas relativas de las células). Con estos modelos, se puede extraer la duración de la citocinesis y el tiempo entre mitosis. La citocinesis se define típicamente por la primera aparición del surco de citocinesis (donde las indentaciones bipolares se forman a lo largo del eje de escisión) hasta la separación completa de las células hijas. Se simplificó el problema al aproximar la citocinesis a la duración del alargamiento celular antes de una división de 1 célula a 2 células. Una célula se considera alargada si la diferencia en la longitud de los ejes excede el 15% (elegido empíricamente). El tiempo entre mitosis es fácil de extraer contando el número de células en cada modelo.

Se probó el algoritmo de los inventores en un conjunto de 14 embriones humanos (Fig. 21b) y se compararon las medidas automáticas con el análisis manual de imágenes (Fig. 21c, Fig. 21d). En este conjunto de datos, 8 de los 14 embriones alcanzaron la etapa de blastocito con buena morfología (Fig. 21e arriba). Las medidas automáticas se correspondían estrechamente con las mediciones manuales, y se pronosticó correctamente que los 8 embriones alcanzarían el blastocisto. 2 de los 14 embriones alcanzaron el blastocisto con una morfología pobre (mala calidad de la masa celular interna, Fig. 21e abajo). Para estos embriones, la evaluación manual indicó que 1 alcanzaría el blastocisto y 1 sería detenido, mientras que la evaluación automatizada predijo que ambos se detendrían. Finalmente, 4 de los 14 embriones se detuvieron antes de la etapa de blastocito, y todos fueron correctamente pronosticados en la detección por ambos métodos.

Marco de filtro de partículas

El filtro de partículas es una técnica de estimación de modelos basada en la simulación de Monte Carlo. Se utiliza para estimar modelos desconocidos u "ocultos" mediante la generación de distribuciones de modelos hipotéticos y la comparación de estos modelos con los datos observados. Su capacidad para adaptarse a dinámicas de movimiento arbitrarias e incertidumbres de medición lo convierte en un candidato ideal para el seguimiento de las divisiones celulares.

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

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

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

- 5 El filtro de partículas se aproxima al posterior con un conjunto de muestras o partículas ponderadas, indicadas como:

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

donde  $M$  es el número de partículas. Los términos partículas y modelos de embriones se usan indistintamente en este documento. Por lo tanto, una sola partícula  $x_t^{[m]}$  (donde  $1 \leq m \leq M$ ) es una hipótesis del modelo de embrión en el tiempo  $t$ .

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

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

El conjunto resultante de partículas es una aproximación de la probabilidad previa. El segundo paso es la actualización de la medición, donde a cada partícula se le asigna un peso de importancia correspondiente a la probabilidad de la medición actual:

- 15

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

El conjunto de partículas ponderadas es una aproximación de la creencia posterior ( $x_t$ ).

Un componente clave del filtro de partículas viene en el tercer paso, donde el conjunto de partículas se vuelve a muestrear según sus pesos. Este paso de re-muestreo enfoca la distribución de partículas en la región de mayor probabilidad.

- 20

Representación celular

Las células se representan como elipses en el espacio 2D. Cada célula tiene un eje mayor, un eje menor y una posición bidimensional en coordenadas cartesianas, dada por la ecuación:

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

- 25 Cada elipse también tiene una dirección de rumbo  $\Theta$  (desvío), que le permite rotar en el plano  $x$ - $y$ . Dado que las elipses casi siempre se superponen entre sí, también se observó un índice de superposición  $h$ , que especifica el orden de superposición (o la altura relativa de las células). Los parámetros para cada modelo de embrión en el tiempo  $t$  se dan, por lo tanto, como:

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

- 30 donde  $N$  es el número de células en ese modelo.

Perturbación celular y división

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

- 35

Para modelar el movimiento de la célula, la entrada de control de los inventores toma una partícula y perturba aleatoriamente cada valor para cada célula:  $x_{0i}$ ,  $y_{0i}$ ,  $a_i$ ,  $b_i$ ,  $\theta_i$ . La perturbación se muestrea aleatoriamente a partir de

una distribución normal con una varianza relativamente pequeña (normalmente se establece en el 5% de los valores inicializados).

5 Para modelar la división celular, se utiliza el siguiente enfoque. En un punto dado en el tiempo, para cada partícula, se asigna un 50% de probabilidad de que una de las células se divida. Este valor se eligió empíricamente, y abarca una amplia gama de divisiones celulares posibles, manteniendo una buena cobertura de la configuración actual. Si se predice una división, entonces la célula divisoria se elige aleatoriamente. Un modelo más sofisticado podría tener en cuenta factores adicionales, tales como la cantidad de células en una partícula y la historia de sus patrones de división, y podría crear potencialmente modelos basados en el comportamiento observado a partir de datos reales.

10 Cuando se elige una célula para dividir, se aplica una división simétrica a lo largo del eje principal de la elipse, produciendo dos células hijas de igual tamaño y forma. Cada valor para las células hijas se altera de forma aleatoria. La perturbación se muestrea nuevamente a partir de una distribución normal pero con una varianza mayor (10% de los valores inicializados) para acomodar una gran variabilidad en las nuevas formas de célula. Finalmente, los índices de solapamiento de las dos células hijas se seleccionan al azar mientras se mantiene su superposición colectiva en relación con el resto de las células.

15 Simulación de imágenes

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

Hay dos observaciones físicas que deben tenerse en cuenta. Primero, aunque el microscopio se enfoca en un solo plano a través del embrión, la profundidad de campo es bastante grande y se obtiene luz desenfocada de casi todo el embrión. Y en segundo lugar, los embriones son parcialmente transparentes, lo que significa que las membranas de las células en el fondo del embrión a veces pueden verse (aunque no siempre) a través de las células en la parte superior del embrión.

Con estas observaciones físicas en mente, se describe a continuación el modelo de simulación de imágenes. Para cada célula, su forma elíptica correspondiente se proyecta sobre la imagen simulada usando el índice de superposición  $h$ . Los valores de píxel correspondientes se establecen en un valor binario de 1 y se dilatan para crear un espesor de membrana comparable a los datos de imagen observados. El índice de superposición  $h$  especifica el orden en que las células se encuentran una encima de la otra. Dado que las membranas celulares ocluidas son solo visibles a veces, si se detectan puntos ocluidos, se colocan en la imagen simulada con baja probabilidad (típicamente alrededor del 10%). En la práctica, aunque estos puntos de membrana ocluidos son necesarios para un modelado de forma precisa, es importante hacerlos lo suficientemente escasos para que no se asemejen a un borde visible.

35 Preprocesamiento de imágenes

A continuación se describirá la variable de medición  $z$ . Un objetivo del método de la presente invención es extraer imágenes binarias de membranas celulares de las imágenes del microscopio para compararlas con las imágenes simuladas. Estas membranas exhiben alta curvatura y alto contraste, pero no se extraen fácilmente usando técnicas de umbral de intensidad o basadas en el color. En consecuencia, se emplea un detector basado en la curvatura principal. Este método usa el operador de Hessian:

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

45 donde  $I_{xx}$ ,  $I_{xy}$  e  $I_{yy}$  son derivadas parciales de segundo orden evaluadas en la ubicación de píxeles  $s$  y la escala gaussiana  $\sigma$ . Los valores propios de la matriz de Hessian 2x2 proporcionan información sobre las curvaturas principales, mientras que el signo de los valores propios distingue los "valles" de las "crestas" 43. Para detectar picos o crestas brillantes, la curvatura principal en cada píxel se calcula como:

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

50 donde  $\lambda_2$  es el valor propio mínimo. Para detectar membranas de espesor variable, se aplica el operador de Hessian en un rango de escalas (es decir,  $\sigma_{\min} \leq \sigma \leq \sigma_{\max}$ ), y se extrae la curvatura máxima en este intervalo. Finalmente, la imagen de Hessian tiene un umbral para crear una imagen binaria de las membranas celulares extraídas. El nivel de umbral típicamente se establece en el doble de la desviación estándar de los valores del píxel en Hessian.

Pesos de partículas

Como se describe en la sección titulada "Marco de filtro de partículas", el segundo paso principal del filtro de partículas es la actualización de la medición, donde a las partículas se les asigna un peso de importancia correspondiente a la probabilidad de la medición actual dado un modelo particular. En el caso de los inventores, la importancia del peso se determina comparando la imagen del microscopio preprocesada, discutida anteriormente, "con la imagen simulada también discutida anteriormente".

Este problema se ha investigado previamente, donde los pesos del filtro de partículas se calcularon comparando imágenes simuladas con imágenes reales utilizando información mutua normalizada. Este enfoque es similar a la idea de la cuadrícula de ocupación, que busca ubicaciones de píxeles que están ocupadas (valor 1) o ambas están vacías (valor 0). Estos métodos pueden tener problemas cuando las imágenes simuladas y reales son similares en forma pero están ligeramente desalineadas. En cambio, el método que se describe usa una función de probabilidad basada en la distancia del chaflán, que mide el valor promedio de las distancias más cercanas desde un punto establecido a otro. Se definen dos conjuntos de puntos A (en el conjunto de números reales de tamaño m) y B (en el conjunto de números reales de tamaño n), correspondientes a los píxeles distintos de cero en la imagen simulada y la imagen real, respectivamente. La distancia del chaflán hacia adelante desde el conjunto de puntos A a B se da como:

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

La distancia del chaflán hacia atrás se define de manera similar. El presente método emplea una distancia de chaflán simétrica, que proporciona una medida de qué tan bien hace coincidir la imagen simulada con la imagen real, y qué tan bien hace coincidir la imagen real con la imagen simulada:

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

En la práctica, las mediciones de distancia individuales se truncan para reducir la influencia del ruido. Para reducir el tiempo de cálculo, las distancias se determinan buscando ubicaciones de píxeles en las transformaciones de distancia de las imágenes.

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

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

La constante  $\lambda$  generalmente se establece en 1 y se puede variar para controlar la "planitud" de la distribución de probabilidad.

Re-muestreo de partículas y asignación dinámica

El tercer paso principal del filtro de partículas es el re-muestreo, donde las partículas se seleccionan en proporción a su peso para crear un nuevo conjunto de partículas. Las partículas con baja probabilidad se descartan, mientras que las partículas con alta probabilidad se multiplican. Ha habido mucho trabajo previo en el desarrollo de algoritmos eficientes para volver a muestrear. El presente método usa el enfoque de baja varianza.

Un problema importante en los filtros de partículas es la elección del número de partículas. La opción más simple es usar un valor fijo, digamos  $M = 1000$ . Luego, para cada paso de tiempo, el conjunto de M partículas se transforma en otro conjunto del mismo tamaño. En el contexto de la aplicación, puede haber periodos de tiempo relativamente largos durante los cuales las células están inactivas o simplemente cambian ligeramente de tamaño y posición. La ventaja de esta observación se toma para reducir la carga de procesamiento asignando dinámicamente el número de partículas de acuerdo con la cantidad de actividad celular. Es decir, cuando las células están activas y se dividen, aumenta el número de partículas, y cuando las células están inactivas, se reduce el número de partículas.

Para medir el grado de actividad celular, se calculan las diferencias de suma de cuadrados (SSD) en las intensidades de píxeles entre la nueva imagen (adquirida por el microscopio) y la imagen anterior. Para reducir el ruido, las imágenes se suavizan primero con un filtro gaussiano, y el valor SSD se suaviza con el tiempo con un promedio móvil causal. El número de partículas se ajusta dinámicamente en proporción a este valor y se trunca para mantenerse dentro de los límites  $100 < M < 1000$ . La Fig. 30 es un gráfico que muestra cómo podría asignarse el número de partículas para un embrión que se divide desde la etapa de 1 célula a 4 células. Cabe señalar que este

método simplemente proporciona una medida de la cantidad de "actividad" en la imagen, pero no distingue entre la división celular y el movimiento del embrión (traducción y/o rotación) porque no se realizó un registro de imagen previa. En esta situación (determinación del número de partículas), esto es aceptable ya que el número de partículas debería aumentar en cualquier caso. En la práctica, también se ajusta el número de partículas en función del número de células en el modelo embrionario más probable. Es decir, se generan más partículas cuando se cree que hay más células presentes en las imágenes.

Limitaciones del seguimiento bidimensional

El algoritmo de seguimiento de células 2D descrito anteriormente es útil para determinar el número de células en el embrión así como sus formas 2D. Sin embargo, está limitado por el hecho de que no hay representación física subyacente. Esto puede o no ser importante para rastrear automáticamente las divisiones celulares a fin de evaluar la viabilidad del embrión. Por ejemplo, se pueden medir ciertos parámetros, tales como la duración de la citocinesis y el tiempo entre las divisiones celulares, utilizando el algoritmo de seguimiento de células 2D. En la siguiente sección, se amplía el modelo 2D a 3D de los inventores. Para tratar las oclusiones y las ambigüedades de profundidad que surgen de la estimación de formas tridimensionales a partir de imágenes 2D, se aplican restricciones geométricas y restricciones sobre la conservación del volumen de las células.

Representación celular y seguimiento tridimensional

Esta sección describe un algoritmo para el seguimiento 3D de la división celular. Muchos de los pasos del algoritmo 2D se transfieren a este algoritmo, con algunas excepciones clave. Hay una nueva representación de la célula para el uso 3D. Las células ahora se representan como elipsoides en el espacio 3D, dada por la ecuación:

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

Cada elipsoide también tiene una dirección de rumbo  $\Theta$ , cabeceo  $\psi$ , y rollo  $\alpha$ . Por lo tanto, la representación de cada modelo de embrión en el tiempo  $t$  se da como:

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

Un efecto importante de este modelo revisado es que puede haber ambigüedades asociadas con inferir formas tridimensionales a partir de imágenes 2D. Por ejemplo, una célula que tiene forma esférica tendría un aspecto similar a una célula con un eje mayor más largo y una rotación de paso más grande. Esto no es una preocupación importante, ya que como se mostrará más adelante, la distribución de partículas mantendrá estas múltiples hipótesis hasta que haya suficiente información disponible para hacer una distinción (por ejemplo, de un evento tal como la división celular).

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

Perturbación celular y división

El modelo de división celular y perturbación 3D de los inventores es similar al modelo en la Sección 4, "Perturbación y división celular", con algunas excepciones clave. La estimación de la forma 3D se puede usar para imponer la conservación del volumen. Esto evita que las células crezcan arbitrariamente grandes, particularmente en la dirección  $z$ . La conservación del volumen se aplica en dos situaciones. En primer lugar, para la perturbación celular, los ejes  $a$  y  $b$  son variados, y  $c$  calculados de modo que el volumen se conserve para esa célula individual. En segundo lugar, para la división celular, se aplica la siguiente restricción:

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

donde el subíndice  $p$  denota una célula parenteral y los subíndices  $d1$  y  $d2$  denotan las dos células hijas. En la práctica, se permite una leve violación de estas restricciones al permitir que el volumen total del embrión fluctúe entre más/menos 5% del volumen original. Esto se usa para compensar posibles imprecisiones en la estimación de volumen inicial.

- 5 Cuando se elige una célula para dividir en 3D, su división se modela de la siguiente manera. Primero, para la célula individual elegida, se aplica una división a lo largo del eje largo de la elipse, que podría ser  $a$ ,  $b$  y  $c$ , dependiendo de la configuración. Las células hijas se inicializan para que tengan el mismo tamaño y estén espaciadas uniformemente, teniendo en cuenta la rotación de la célula parenteral. Sus parámetros son perturbados entonces para cubrir un amplio rango de configuraciones posibles, una vez más usando una distribución normal con una  
10 varianza establecida en 10% de los valores inicializados.

#### Restricciones geométricas

- Los problemas de oclusión y ambigüedad de profundidad se mitigan parcialmente a través de la conservación del volumen. Sin embargo, también se requieren restricciones con respecto a las relaciones espaciales de los elipsoides vecinos. La primera limitación es que las células tienen prohibido superponerse en más de un 20% de radio. Para las  
15 células que se superponen en una cantidad aceptable, se realiza la suposición de que se han aplastado una contra la otra. El modelo de partículas que se describe representa este fenómeno al ignorar los puntos dentro de los elipsoides que se cruzan durante la simulación de la imagen. Esto fue motivado empíricamente y se correlaciona bien con el comportamiento observado físicamente.

- Se impone una segunda restricción que mantiene a las células muy cerca. Esta restricción está directamente relacionada con el comportamiento físico de los embriones humanos, donde las células están limitadas por una membrana llamada zona pelúcida. La zona se modela como una capa esférica y se usa para imponer condiciones de contorno. El radio de la zona se establece en 30% más grande que el radio del embrión de 1 célula.  
20

- Estas restricciones se aplican de la siguiente manera. Para cada partícula en un momento dado, se aplica una entrada de control aleatorio para generar una nueva partícula, como se discutió anteriormente. Si se ha violado cualquiera de las restricciones físicas, la nueva partícula se descarta y se aplica un nuevo control aleatorio. Si no se genera una nueva partícula satisfactoria después de un cierto número de intentos, entonces esa partícula se descarta.  
25

#### Simulación de imágenes

- La ventaja de la iluminación de campo oscuro, utilizada en los ejemplos, es que las membranas celulares dispersan la luz más que el interior de la célula. Este efecto es más pronunciado en lugares donde las membranas celulares son paralelas al eje óptico (eje  $z$ ). En consecuencia, para simular imágenes, estos lugares se buscan en los modelos 3D de los inventores, que no están necesariamente ubicados en los ecuadores de los elipsoides debido a su rotación. Las mismas reglas con respecto a los bordes visibles y ocluidos, como se discutió anteriormente, se siguen a continuación.  
30

- 35 Ejemplo de seguimiento celular en 2D

- Este ejemplo se refiere a la microscopía celular automatizada y utiliza el algoritmo descrito anteriormente para el seguimiento en 2D de las divisiones celulares. Este modelo está diseñado para rastrear la cantidad de células en la imagen y los contornos 2D de las membranas celulares. El primer paso es la adquisición de imágenes, lo que motiva las secciones posteriores, tales como la simulación de imágenes y el preprocesamiento de imágenes. Las secuencias de imágenes a intervalos para este ejemplo se adquirieron con un microscopio invertido Olympus IX-50 personalizado con un objetivo 10X. El microscopio se modifica para la iluminación de campo oscuro, donde un cono hueco de luz se enfoca en la muestra colocando una abertura circular entre la fuente de luz y la lente del condensador. La lente del objetivo recoge la luz que se dispersa por la muestra y rechaza la luz transmitida directamente, produciendo una imagen brillante sobre un fondo oscuro. Una ventaja de la iluminación de campo oscuro es que las membranas celulares tienden a dispersar la luz más que el interior de la célula, mejorando así su contraste. El microscopio está equipado con una etapa calentada y una cámara de incubación personalizada para permitir el cultivo de los embriones durante un período de hasta 5 ó 6 días. Las imágenes fueron capturadas a intervalos de 5 minutos por una cámara digital Olympus SLR montada en el puerto lateral de la IX-50.  
40  
45

- Las imágenes de embriones comenzaron cuando eran cigotos o huevos fertilizados con forma aproximadamente esférica. Para inicializar el conjunto de partículas, el Hessian con umbral se calcula como se describe en la Sección 6, "Preprocesamiento de imágenes", y le ajusta un círculo con mínimos cuadrados. Todas las partículas se inicializan como círculos con orientaciones aleatorias muestreadas a partir de una distribución uniforme.  
50

- La Fig. 31 muestra los resultados del algoritmo 2D para rastrear divisiones celulares desde la etapa de 1 célula a 4 células. Los resultados muestran que las membranas celulares se extraen con éxito mediante el algoritmo, incluso para las células hacia el fondo que están parcialmente ocluidas. Cabe señalar que en la mayoría de las aplicaciones de filtros de partículas, el "único" mejor modelo a menudo se representa como una suma ponderada de los  
55

parámetros de estado de la distribución de partículas. Sin embargo, para los resultados presentados en este documento, se muestra la partícula con la probabilidad más alta.

Ejemplo de seguimiento celular en 3D

5 La Fig. 32 muestra dos aplicaciones exitosas del algoritmo 3D descrito anteriormente para rastrear desde la etapa de 1 célula a 4 células. La figura 33 es un diagrama que muestra un ejemplo de cómo se distribuyen las partículas durante una división de 1 célula a 2 células (correspondiente al primer ejemplo mostrado en la figura 32). Esta gráfica muestra la ubicación 3D de los centros de cada célula. A medida que la célula comienza a dividirse, las predicciones muestran una ambigüedad en términos de qué célula hija se colocará encima de la otra, pero esto se resuelve en un par de marcos.

10 Extracción de parámetros predictivos

Una vez que los embriones se han modelado utilizando los métodos descritos anteriormente, se pueden extraer ciertos parámetros de los modelos. Por lo general, se usa el mejor modelo o el más probable. Estos parámetros incluyen, por ejemplo, la duración de la primera citocinesis, el tiempo entre la primera y la segunda división celular, y el tiempo entre la segunda y la tercera división celular. La duración de la citocinesis puede aproximarse midiendo cuánto tiempo se alarga un modelo de una célula antes de que se escinda en dos células. El alargamiento puede medirse observando la relación de los ejes mayor a menor de la elipse. Otros parámetros que se pueden extraer de los modelos incluyen el tiempo entre la fertilización y la primera división celular, formas y simetrías de células y procesos de división, ángulos de división, fragmentación, etc. Los parámetros se pueden extraer utilizando el algoritmo de seguimiento de células 2D o el algoritmo de seguimiento de células 3D.

20 La citocinesis se define por la primera aparición del surco de citocinesis en la separación completa de las células hijas. Dado que los modelos de embriones de los inventores están compuestos por elipses indeformables, identificar la apariencia del surco de citocinesis es una tarea desafiante. Un método sería permitir que las elipses se deformen, pero esto da como resultado un problema de seguimiento más complejo. Otro método sería buscar cambios en la curvatura en la imagen del microscopio preprocesado; sin embargo, esto frustra el propósito de vincular para medir los parámetros predictivos de los inventores directamente de los modelos de embriones. Por lo tanto, se simplifica el problema al aproximar la duración de la primera citocinesis a la duración del alargamiento celular antes de una división de 1 célula a 2 células. La elongación se cuantifica calculando la relación del eje principal a al eje menor b de la elipse. Una célula se considera alargada si:

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

30 Este valor del 15% se eligió empíricamente y funciona bien para este conjunto de datos en particular; sin embargo, pueden ser utilizados otros valores. Una vez que un modelo de embrión se ha dividido en 2 células, se puede extraer la duración aproximada de la primera citocinesis calculando la duración de la elongación para el modelo de 1 célula.

En principio, medir el tiempo entre los eventos de mitosis es sencillo. Por ejemplo, el tiempo entre la primera y la segunda mitosis se puede medir como el tiempo entre el modelo de 2 células y el modelo de 3 células. Sin embargo, 35 en algunos casos, los embriones pueden presentar un comportamiento inusual y aleatorio. Esto incluye, por ejemplo, un embrión que va de 1 célula a 2 células, de 2 células a una aparente de 3 o 4 células, y luego de vuelta a 2 células. El algoritmo descrito es capaz de rastrear este tipo de comportamiento, pero plantea un desafío para determinar el intervalo de tiempo entre los eventos de mitosis.

Una forma de lidiar con este comportamiento es la siguiente: en lugar de medir el tiempo entre un modelo de 2 40 células y 3 células (para encontrar el tiempo entre la primera y la segunda mitosis), esto se puede aproximar simplemente contando el número de marcos de imágenes en los que es más probable un modelo de 2 células. Esto funciona bien en algunos casos, pero no siempre es representativo del tiempo verdadero entre los eventos de mitosis. También se puede hacer frente a estos eventos mediante la aplicación de una restricción en los modelos en función del número de células. Es decir, al elegir el modelo mejor o más probable de la distribución en cada 45 iteración, se puede requerir que la cantidad de células en el modelo permanezca siempre igual o aumente, pero nunca disminuya. Después de imponer esta restricción, es sencillo calcular el tiempo entre los eventos de mitosis. Esta restricción también es útil para filtrar los resultados de seguimiento que pueden mostrar pequeñas cantidades de fluctuación de fase, que pueden ocurrir ocasionalmente cuando un modelo cambia indistintamente de un modelo de 1 célula a 2 células, por ejemplo.

50 Método para extraer parámetros predictivos

La figura 35 muestra un diagrama de flujo que resume los métodos descritos anteriormente. El diagrama de flujo muestra cómo se puede analizar un solo embrión (aunque esto se puede aplicar a embriones múltiples u otros tipos de células y células madre). En el primer paso, se adquiere una imagen de un embrión con un microscopio a intervalos ("medida"). Esta imagen se puede guardar en un archivo y volver a abrir en un momento posterior. La 55 imagen generalmente se procesa previamente para mejorar ciertas características, aunque esto no es necesario. Se

predicen modelos de posibles configuraciones de embriones y se simulan imágenes a partir de estos modelos ("predicción"). La imagen simulada podría incluir imágenes de membranas celulares, como se describió anteriormente, o imágenes que representen con mayor precisión las imágenes del microscopio antes del preprocesamiento. Los modelos se comparan luego con la imagen del microscopio preprocesado ("comparación"). Usando esta comparación, las mejores predicciones se mantienen, mientras que las predicciones malas se descartan. El conjunto de predicciones resultante se usa entonces para mejorar las predicciones para la siguiente imagen. Después de realizar este proceso para múltiples imágenes secuenciales, es posible medir los parámetros morfológicos directamente del mejor modelo(s), como, por ejemplo, la duración de la citocinesis y el tiempo entre los eventos de mitosis. Estos parámetros se pueden usar para evaluar la viabilidad del embrión, como se discutió previamente.

**Ejemplo 6**

Análisis automatizado de la actividad celular

Los métodos descritos anteriormente requieren la capacidad de rastrear el desarrollo celular mediante microscopía. Para embriones, es deseable rastrear embriones múltiples, que se cultivan juntos en la misma placa. Los métodos analíticos utilizados en este caso también requieren que las imágenes se tomen periódicamente (por ejemplo, cada 1-30 minutos durante 1 a 5 días para embriones, pueden usarse diferentes intervalos de tiempo para otros tipos de células, tales como las células madre). Por lo tanto, se diseñó un método de imagen para rastrear automáticamente el desarrollo de embriones.

En microscopía a intervalos, las células se cultivan bajo condiciones controladas y se toman imágenes durante un período prolongado de tiempo para monitorear procesos tales como la motilidad (movimiento dentro del ambiente), proliferación (crecimiento y división) y cambios en la morfología (tamaño y forma). Debido a la duración de los experimentos y a la gran cantidad de datos de imágenes generados, la extracción de parámetros tales como la duración y el tiempo entre las divisiones celulares puede ser una tarea tediosa. Esto es particularmente cierto para las aplicaciones de alto rendimiento donde se crean imágenes de múltiples muestras simultáneamente. Por lo tanto, existe la necesidad de un software de análisis de imágenes que pueda extraer la información deseada automáticamente.

Una forma de evaluar la viabilidad embrionaria es medir la cantidad de "actividad celular" en las imágenes. Esto se puede lograr simplemente tomando pares secuenciales de imágenes y comparando sus valores de píxel. Más específicamente, para medir la cantidad de actividad celular para cada nueva imagen, se calculan las diferencias de suma de cuadrados (SSD) en intensidades de píxeles entre la nueva imagen, denotada como  $I'$ , y la imagen anterior, indicada como  $I$ , sobre todos los píxeles superpuestos  $i$ :

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

Para reducir el ruido, las imágenes se pueden suavizar primero con un filtro gaussiano. La Fig. 28 muestra un gráfico de la actividad celular del día 1 al día 3 para un solo embrión. Como se muestra, hay picos agudos que corresponden a la división de 1 célula a 2 células, la división de 2 células a 4 células y la división de 4 células a 8 células en un embrión humano. Los anchos de los picos son representativos de las duraciones de las divisiones celulares.

Una de las limitaciones de este enfoque es que la métrica SSD solo mide la cantidad de actividad en la imagen, y eventos tales como el movimiento del embrión (tal como el desplazamiento o la rotación) pueden parecer bastante similares a la división celular. Una solución a este problema es realizar un registro de imagen antes de calcular el SSD. El registro de imágenes es el proceso de encontrar una relación geométrica entre dos imágenes para alinearlas en el mismo sistema de coordenadas, y se puede lograr usando una variedad de técnicas diferentes. Por ejemplo, se puede usar una variación de la rutina iterativa no lineal de Levenberg-Marquardt, que registra imágenes minimizando la SSD al superponer las intensidades de los píxeles. El algoritmo LM transforma ubicaciones de píxeles utilizando una matriz de homografía 3x3:

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

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

$$x' = \frac{\bar{x}'}{w'}, y' = \frac{\bar{y}'}{w'}$$

Así:

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

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

- 5 La matriz de homografía se puede aplicar a una variedad de transformaciones de imagen, y una elección razonable en esta aplicación serían las transformaciones rígidas del cuerpo (euclidianas). Esto alinearía las imágenes de los embriones en la traducción y la rotación en el plano (a lo largo del eje de la cámara). Sin embargo, es posible generalizar ligeramente y usar una transformación afin, que permite sesgar la imagen. Esta generalización puede o no ser deseable dependiendo de la señal que se intente medir. Las ecuaciones de movimiento se convierten en:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

$$a_{ki} = \sum_j \frac{\delta e_i}{\delta h_k} \frac{\delta e_i}{\delta h_j}$$

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

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

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

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

5 En cada iteración del algoritmo, la primera imagen se deforma según la estimación de movimiento actualizada y se compara con la segunda imagen calculando la SSD de las intensidades de píxeles en áreas de superposición. La presente aplicación supone que el movimiento del embrión entre imágenes consecutivas es muy pequeño y, por lo tanto, solo se realiza un pequeño número fijo de iteraciones. La Figura 28B muestra un gráfico de actividad celular sin (28A) y con (28B) registros de imagen realizados para cada par de imágenes. Como la función de error de la rutina de Levenberg-Marquardt es la SSD, simplemente se traza el error residual para cada registro. La Fig. 29  
10 compara gráficas de actividad celular para el desarrollo normal y anormal del embrión. En el día 3, el punto en el cual un logista de embriones típicamente evaluaría la morfología, los embriones se ven similares y podrían considerarse potencialmente viables. Sin embargo, sus gráficos de actividad celular son drásticamente diferentes, ya que uno de los embriones experimenta una serie típica de divisiones celulares mientras que el otro se divide de un embrión de 1 célula en múltiples células y fragmentos. Como se esperaba, el embrión que tiene un diagrama de actividad normal finalmente alcanza el blastocisto para el día 5,5.

Se pueden utilizar otros tipos de registro de imagen antes de calcular la SSD en intensidades de pixel. Esto incluye, por ejemplo, correlación cruzada, correlación cruzada normalizada, correlación cruzada entre fases, información mutua, detección y seguimiento de características, transformación de característica invariante de escala (SIFT), flujo óptico y descenso de gradiente. El preprocesamiento de imágenes puede o no ser deseable antes del registro, tal como la mejora de características o contraste.

#### Modelo para evaluar la viabilidad embrionaria

La Fig. 13 muestra un modelo para el desarrollo de embriones humanos basado en imágenes correlacionadas y análisis molecular. Se muestra la línea de tiempo del desarrollo de cigoto a blastocito, que incluye tiempos críticos breves para la predicción del desarrollo exitoso a blastocisto y un diagrama del desarrollo de embriones. Datos  
25 moleculares clave, como se muestra en el diagrama, indican que los embriones humanos comienzan la vida con un conjunto distinto de ARN de ovocitos que se heredan de la madre. Este conjunto de ARN se mantiene y se empaqueta adecuadamente mediante programas de administración de ARN específicos en el huevo. Después de la fertilización, la degradación de un subconjunto de ARN maternos específicos del óvulo (ESSP1, patrón específico del estadio embrionario 1) debe degradarse a medida que comienza la transición del ovocito al embrión. Paralelamente, otros ARN están idealmente divididos por igual para cada blastómero a medida que continúa el desarrollo (ESSP4). La degradación y la partición exitosas de los ARN culmina con la activación del genoma embrionario (EGA) y la transcripción de los genes de ESSP2 en una célula de manera autónoma. Notablemente, durante las divisiones de escisión, los blastómeros embrionarios pueden detenerse o progresar independientemente.  
35 El resultado del desarrollo autónomo celular en el embrión es que los blastómeros individuales pueden detenerse o progresar y, a medida que el embrión de 8 células progresa a mórula y más allá, la calidad del blastocisto se verá afectada por el número de células que se detienen o progresan más allá de las 8 células. Los datos de imagen demuestran que hay períodos críticos de desarrollo que predicen el éxito o el fracaso: la primera citocinesis, la segunda división de escisión y la sincronidad de la segunda y tercera divisiones de escisión. Estos parámetros se pueden medir automáticamente utilizando los algoritmos de seguimiento de células y el software descrito anteriormente. Los sistemas y métodos descritos se pueden usar para diagnosticar el resultado embrionario con predictores clave de imágenes y pueden permitir la transferencia de menos embriones en etapas más tempranas del desarrollo (antes del EGA). Comparación del análisis de imagen automatizado vs. manual

La figura 34 muestra una comparación del análisis de imagen automatizado con el análisis de imagen manual para un conjunto de 14 embriones. Los embriones 1 a 10 (como se indica en las gráficas) alcanzaron la etapa de blastocisto con morfología variable. Los embriones 11 a 14 fueron detenidos y no alcanzaron el blastocisto. La Figura 34A muestra la comparación para medir la duración de la primera citocinesis, y la Fig. 34B muestra la comparación para medir el tiempo entre la primera y la segunda mitosis. Como se muestra, los dos métodos muestran un buen acuerdo en general. Se esperan pequeñas discrepancias durante la primera citocinesis, ya que pueden atribuirse al hecho de que el análisis automatizado de los inventores realiza una aproximación midiendo la elongación, como se discutió previamente. En algunos casos, existe un mayor desacuerdo entre el análisis automático y manual tanto para la duración de la citocinesis como para el tiempo entre la primera y la segunda mitosis. Esto ocurre para

algunos de los embriones anormales, y es causado por un comportamiento inusual que es difícil de caracterizar de forma manual, así como realizar un seguimiento automático. Para este grupo de embriones, y utilizando solo los dos primeros criterios (duración de la primera citocinesis y tiempo entre la 1ª y la 2ª mitosis), el algoritmo automatizado tiene cero falsos positivos. Esto sería extremadamente importante en un procedimiento de FIV en el que se deben evitar los falsos positivos. El análisis manual de imágenes tuvo un falso negativo (embrión 9), mientras que el algoritmo automático tuvo dos falsos negativos (embriones 9 y 10). Sin embargo, aunque ambos embriones 9 y 10 alcanzaron técnicamente la etapa de blastocito, mostraron una morfología pobre en comparación con otros blastocitos y serían candidatos menos óptimos para la transferencia. Para el análisis manual de imágenes, el embrión 14 sería un falso positivo basado en estos dos criterios, y el tercer parámetro de duración entre la 2ª y la 3ª mitosis es necesario para dar un verdadero negativo. Sin embargo, el algoritmo automatizado realiza la predicción correcta utilizando solo los dos primeros criterios. Estos resultados indican que el algoritmo automatizado de los inventores puede predecir con éxito un blastocisto frente a un no blastocito, así como diferenciar entre diferentes cualidades del blastocisto. Por lo tanto, para situaciones en las que se determina que embriones múltiples tienen un potencial de desarrollo favorable, es posible calcular una clasificación de sus cualidades relativas para seleccionar los embriones superiores 1 ó 2 para la transferencia durante los procedimientos de FIV.

Lo anterior simplemente ilustra los principios de la invención. Se apreciará que los expertos en la materia podrán diseñar diversas disposiciones que, aunque no se describan explícitamente ni se muestren en el presente documento, incorporan los principios de la invención y se incluyen dentro de su espíritu y alcance. Además, todos los ejemplos y el lenguaje condicional citados en la presente memoria están destinados principalmente a ayudar al lector a comprender los principios de la invención y los conceptos aportados por los inventores para mejorar la técnica, y deben interpretarse sin limitación a dichos ejemplos específicamente citados y condiciones. Además, todas las declaraciones que se mencionan en este documento, principios, aspectos y realizaciones de la invención, así como sus ejemplos específicos, pretenden abarcar sus equivalentes estructurales y funcionales. Además, se pretende que tales equivalentes incluyan tanto los equivalentes actualmente conocidos como los equivalentes desarrollados en el futuro, es decir, cualquier elemento desarrollado que realice la misma función, independientemente de la estructura. El alcance de la presente invención, por lo tanto, no está destinado a limitarse a las realizaciones ejemplares que se muestran y describen en este documento. Por el contrario, el alcance de la presente invención está incorporado en las reivindicaciones adjuntas.

### Ejemplo 7

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

#### Métodos

Los embriones humanos congelados en la etapa zigótica o de 2 pronúcleos (2PN) se descongelaron mediante un protocolo de descongelación rápida de 2 pasos usando el Quinn's Advantage Thaw Kit (Cooper Surgical, Trumbull, CT). En resumen, se retiraron las pajillas de congelación o viales del nitrógeno líquido y se expusieron al aire antes de incubarlas en un baño de agua a 37°C. Una vez descongelados, los embriones se transfirieron a una solución de sacarosa a 0,5 mol/l durante 10 minutos, seguido de una solución de sacarosa a 0,2 mol/l durante 10 minutos adicionales. Los embriones se lavaron entonces en Quinn's Advantage Medium con Hepes (Cooper Surgical) más 5% de sustitutivo de proteína sérica (SPS; CooperSurgical) y cada uno se transfirió a una microgotilla de 60 µl de Quinn's Advantage Cleavage Medium (CooperSurgical) suplementado con 10% de SPS en aceite mineral (Sigma, St. Louis, MO) y se cultivaron a 37°C con 6% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> y 89% de N<sub>2</sub>. Los embriones se cultivaron en placas Petri de poliestireno personalizadas hechas específicamente para ayudar a rastrear la identidad del embrión durante la obtención de imágenes y su posterior manipulación. El diseño de la placa es similar a las placas Petri comerciales utilizadas para la FIV, a excepción de una serie de 25 micropozos individuales ubicados en el centro. Cada micropocillo tiene 250 micrones de ancho y 100 micrones de profundidad y acomoda un solo embrión en desarrollo. La parte inferior de cada pozo tiene un acabado plano y de calidad óptica que permite que los embriones se vean claramente. Para mantener el cultivo en grupo, todos los micropozos comparten una caída de medios común, que se estabiliza mediante un anillo extruido. Pequeños marcadores fiduciales (letras y números) se encuentran cerca de los micropozos para ayudar con la identificación. Las placas se probaron para determinar su toxicidad antes de su uso en embriones humanos a través de procedimientos estándar de embriones de ratón (MEA).

Se recogieron imágenes a intervalos para el posterior análisis de la morfología celular, incluyendo la medición de al menos uno de los siguientes parámetros celulares: la duración de la primera citocinesis, el intervalo de tiempo entre la primera y la segunda división celular y el intervalo de tiempo entre la segunda y la tercera división celular. Las imágenes que se muestran en las figuras se tomaron con un tiempo de exposición de 0,6 segundos cada 5 minutos durante hasta 2 días (aproximadamente 30 horas) hasta que la mayoría de los embriones alcanzó la etapa de 4 células. Como se describe con mayor detalle a continuación, la primera citocinesis generalmente ocurre un día después de la fecundación y dura aproximadamente 14 minutos. La primera y la segunda divisiones celulares generalmente están separadas por un promedio de aproximadamente 11 horas. La segunda y tercera divisiones celulares generalmente están separadas por un promedio de aproximadamente 1 hora. Por lo tanto, las imágenes fueron durante un período de tiempo de aproximadamente 30 horas (más o menos varias horas) después de la fertilización.

Tras la obtención de imágenes, los embriones se transfirieron a una solución de Tyrode acidificado (Millipore) para eliminar la zona pelúcida (ZP) y los embriones libres de ZP se desagregaron en calcio de Quinn's Advantage y medio libre de magnesio con Hepes (Cooper Surgical) más 10% de albúmina humana (CooperSurgical). Una vez desagregados, cada blastómero embrionario se lavó tres veces en gotas de 10 µl de tampón de lavado antiadherente y se transfirió a un tubo de PCR estéril. La presencia de un solo blastómero en cada tubo se confirmó bajo el microscopio. La extracción del ADN y la preamplificación se lograron utilizando el kit SurePlex de acuerdo con las instrucciones del fabricante (BlueGnome). En resumen, el ADN se extrajo de cada muestra con la enzima de extracción celular a 75°C durante 10 minutos, que se inactivó a 95°C durante 4 min. El ADN fue desnaturalizado y preamplificado con PicoPlex Pre-Amp Enzyme mediante un Hotstart de 95°C durante 2 min y 12 ciclos de gradiente de PCR (95°C durante 15 segundos, 15°C durante 50 segundos, 25°C durante 40 segundos, 35°C durante 30 segundos, 65°C durante 40 segundos y 75°C durante 40 segundos) y luego se desnaturalizaron y amplificaron con PicoPlex Amplification Enzyme a 95°C durante 2 min y 14 ciclos de 95°C durante 15 segundos, 65°C durante 1 minuto y 75°C durante 1 min. Después de la amplificación del genoma completo, cada muestra se marcó fluorescentemente con Cy3 o Cy5 y se hibridó con BlueGnome CytoChip, que es una matriz BAC con más de 5000 clones replicados diseñados para detectar variaciones submicroscópicas del número de copias, y cubre aproximadamente el 30% del genoma humano ([www.cytochip.com](http://www.cytochip.com)). Se analizaron imágenes escaneadas y se cuantificaron las proporciones de número de copias cromosómicas y se informaron utilizando el algoritmo CytoChip y el software BlueFuse (BlueGnome) como se describió previamente (Gutiérrez - Mateo et al, (2011) Fertil Steril 95: 953 - 958).

## 20 Resultados

La línea de tiempo de desarrollo de un embrión humano sano de preimplantación en cultivo se documentó en un período de 2 días por imágenes a intervalos. Se observó que un cigoto humano normal se somete a la primera división de escisión temprana en el día 2. Posteriormente, el embrión se divide en un embrión de 4 células y 8 células más tarde en el día 2 y el día 3, respectivamente, antes de compactarse en una mórula el día 4.

25 Con el fin de investigar la relación entre los parámetros del ciclo celular de los inventores y la aneuploidía, los embriones cultivados se descongelaron como cigotos durante 2 días hasta que la mayoría de los embriones alcanzaron la etapa de 4 células y se controló el desarrollo embrionario mediante imágenes a intervalos. Tras la obtención de imágenes, cada embrión se desensambló y la composición cromosómica de los blastómeros individuales se analizó mediante Array-Comparative Genomic Hybridization (A-CHG), una tecnología basada en microarrays que detecta variaciones en el número de copias (CNV) causadas por reordenamientos genómicos tales como deleciones, duplicaciones, inversiones y translocaciones a una alta resolución en los 24 cromosomas.

30 Se rastreó el desarrollo de 75 embriones normalmente fertilizados y se documentó la distribución de embriones normales y detenidos entre las muestras que se cultivaron hasta el día 2. Con el fin de identificar los parámetros de imágenes cuantitativas que predicen el éxito en el desarrollo embrionario a la etapa de blastocisto, se extrajeron y analizaron varios parámetros de videos a intervalos, incluida la duración de los primeros ciclos celulares, intervalos de tiempo entre las primeras mitosis y la duración de la primera citocinesis. Durante el análisis de imágenes de video de embriones tanto normales como anormales, se observó que muchos embriones detenidos se sometieron a una citocinesis aberrante durante la primera división celular. Los embriones normales completaron la citocinesis en una ventana de tiempo estrecha de 14,4 +/- 4,2 minutos desde la aparición de los surcos de escisión hasta completar la separación de las células hijas, de una manera suave y controlada.

35 El análisis detallado de los resultados de las imágenes de los inventores indicó que los embriones normales seguían estrictos tiempos en citocinesis y mitosis durante las primeras divisiones, antes de que la activación del gen embrionario (EGA) comenzara, sugiriendo que el potencial de desarrollo de un embrión está predeterminado por programas maternos heredados. En particular, se observaron tres intervalos temporales, o parámetros, en los ciclos celulares del embrión en etapa temprana que estaban estrictamente regulados: (1) duración de la primera citocinesis, (2) intervalo de tiempo entre la primera y la segunda mitosis, y (3) sincronización de la segunda y tercera mitosis. Para los embriones normales, se midieron estos parámetros para que fueran, aproximadamente, 14,4 +/- 4,2 minutos, 11,8 +/- 0,71 horas y 0,96 +/- 0,84 horas, respectivamente (indicadas en este documento como la media ± desviación estándar).

40 Una vez que los tres parámetros de imagen se trazaron juntos, la gran mayoría de los embriones con cariotipos normales se agruparon juntos en una región similar a los embriones no detenidos o no retrasados observados en Wong/Loewke et al. (Wong/Loewke et al., (2010) Nat. Biotechnol 25: 1115 - 1121); Figura 36 A, B, C). En contraste, los embriones que se determinó que eran aneuploides por CGH exhibieron valores de parámetros fuera de las ventanas de tiempo de los embriones normales y, por lo tanto, se concentraron en otras áreas fuera del agrupamiento de embriones euploides cuando se graficaron. Además, en base a los resultados del análisis CGH, también se pudo diferenciar el tipo de aneuploidía en cada embrión afectado. Los embriones aneuploides con composición cromosómica diferencial se consideraron errores mitóticos, mientras que aquellos con blastómeros idénticos se designaron como errores meióticos dado que la primera división celular debía producir blastómeros con una composición cromosómica similar. Esto se confirmó en el análisis de parámetros individuales ya que los embriones con errores mitóticos se desviaron más de los embriones normales en los parámetros segundo y tercero y los tres parámetros se vieron afectados en los embriones con errores meióticos (Tabla 3, Figura 40). Mientras que

11 de 25 embriones con errores mitóticos se concentraron en un área similar a los embriones con perfiles CGH normales, los embriones con errores meióticos exhibieron un agrupamiento de parámetros más esporádico (Figura 36 A, B y C).

Curiosamente, también se identificaron varios embriones que parecían ser triploides basados en observaciones previas de que los embriones 3PN exhiben la característica distintiva morfológica de dividirse de una sola célula en tres células hijas en un solo evento mitótico (Wong/Loewke et al., (2010) Nat. Biotechnol 25: 1115-1121). A diferencia de los embriones con citocinesis normal, que muestran dos surcos de escisión antes de la división de 1 célula a 2 células, los embriones triploides muestran tres surcos de escisión que preceden a la transición de 1 célula a 3 células. Dado que CGH solo puede detectar ciertos tipos de poliploidía como 69XXY (Gutiérrez-Mateo et al., (2011) Fertil Steril 95: 953-958) y los embriones que se caracterizaron como triploides eran femeninos o XYY, no se pudo confirmar que estos embriones fueran triploides. En cambio, se pueden usar enfoques alternativos, como la Hibridación Fluorescente In Situ (FISH) o la PCR cuantitativa (Q-PCR) para detectar poliploidía tal como se describió previamente (Gutiérrez-Mateo et al., (2011) Fertil Steril 95: 953-958). No obstante, aunque esta cohorte de embriones no pudo ser reconocida como triploide por CGH, varios de estos embriones se identificaron como aneuploides y de acuerdo con el análisis de parámetros de imágenes de los inventores no habrían sido candidatos viables para la transferencia (Figura 36 A, B y C).

#### Detección de embriones monosómicos y trisómicos mediante análisis de imágenes

Además de poder diferenciar entre errores meióticos y mitóticos, también se ha determinado que los defectos cromosómicos más severos a menudo propagados a partir de un error meiótico también pueden detectarse como cambios sutiles de comportamiento en los parámetros del ciclo celular temprano. Usando el análisis de imágenes de los inventores y parámetros dinámicos, se determinó que las monosomías y trisomías, en las que una o tres copias, respectivamente, de un cromosoma está presente en cada blastómero de un embrión, también pueden ser discernibles de los embriones normales durante el desarrollo. Como lo demuestra la Figura 37A, se identificaron varios embriones trisómicos con valores de parámetros muy superiores a los embriones con cariotipos normales. Más específicamente, se detectaron al menos dos embriones con trisomía 21 (uno de los tipos más comunes de trisomía autosómica que sobrevive al nacimiento, que da como resultado el síndrome de Down; Figura 37B) y se determinó que estos embriones exhibían características atípicas del ciclo celular, particularmente en el segundo parámetro, o el tiempo entre la primera y la segunda mitosis. De forma similar, también se pudo identificar varios embriones monosómicos que incluían algunos con monosomía 22 (Figura 37B) que tendían a agruparse lejos de los embriones normales y demostraron bajos valores de parámetros secundarios análogos a los embriones con trisomía 21 (Figura 37A). Dado que casi todas las monosomías cromosómicas son letales en embriones (la única excepción es el cromosoma X), las diferencias en los parámetros del ciclo celular entre los embriones monosómicos y los embriones normales no afectados pueden explicarse por la composición cromosómica subyacente de cada embrión. Por lo tanto, el análisis de imágenes a intervalos de los inventores puede detectar con precisión las duplicaciones cromosómicas (trisomías) y las deleciones (monosomías) en embriones humanos y puede evitar potencialmente la transferencia de ambos tipos de embriones.

#### Agrupación de errores mitóticos de mosaico bajo y alto con embriones normales

Además de estos casos extremos de anomalías cromosómicas, también se pueden discernir variaciones en el grado de mosaicismo medido por el número de cromosomas afectados entre embriones con diferentes perfiles de imágenes que surgieron de un error mitótico. Con base en el análisis integral de los inventores de los parámetros del ciclo celular y la composición cromosómica, se determinó que los embriones con defectos en cuatro cromosomas o menos debían considerarse mosaico bajo, mientras que los embriones con más de cuatro cromosomas afectados podían designarse como mosaico alto (Figura 38A). Como se muestra en la Figura 38B, 9 de 12 embriones mitóticos de mosaico bajo se agruparon cerca de los embriones normales, mientras que los embriones de mosaico alto que surgieron de un error mitótico exhibieron un agrupamiento de parámetros más esporádico. Un análisis más detallado de la composición cromosómica también reveló que los embriones de mosaico alto tenían más probabilidades de no disyunción, por lo que los pares de cromosomas no se segregan adecuadamente a las células hijas respectivas durante la división, lo que puede influir en el comportamiento del ciclo celular detectable por imágenes a intervalos. Este hallazgo es confirmado por estudios previos que muestran que los embriones con un bajo grado de mosaicismo están más cerca de lo normal y tienen más probabilidades de autocorregirse en la etapa de blastocito, mientras que los embriones con un alto grado de mosaicismo son anormales y es poco probable que sobrevivan (Baart et al. (2004) Hum Reprod. 19: 685-693; Munné et al. (2005) Fertil Steril 84: 1328 - 1334; Barbash-Hazan et al. (2008) Fertil Steril 92: 890-896; Johnson et al. (2010) Hum Reprod 25: 1066-1075). Por lo tanto, la tecnología de imágenes de los inventores podría proporcionar información que permitiría que los embriones con mosaico euploide se clasifiquen y puedan ayudar en la decisión de qué embrión o embriones transferir.

#### Correlación entre fragmentación celular y aneuploidía

Actualmente, la característica morfológica más común que se utiliza como una evaluación de la competencia del desarrollo en embriones humanos es el grado de fragmentación celular, un fenómeno que típicamente se observa solo en el desarrollo de embriones humanos (Antczak y Van Blerkom, 1999 Human Reprod. 14, 429-447; Alikani et al., 1999 Fertil. Steril. 71, 836-842; Ebner et al., 2001 Fertil. Steril. 76, 281-285). Dado que los blastómeros

individuales de embriones aneuploides exhibieron pérdidas o ganancias cromosómicas, cuya suma no necesariamente se suma a 2 copias de cada cromosoma por blastómero (por ejemplo, 4 blastómeros deben tener una suma de 8 copias para cada cromosoma), se razonó que los cromosomas faltantes pueden haberse desprendido del embrión en desarrollo en forma de fragmentos. A medida que avanzaba el desarrollo, estos fragmentos permanecían como unidades separadas de ADN y citoplasma o eran reabsorbidos por el mismo blastómero o por uno vecino. Si bien se observó fragmentación en solo 1 de 8 embriones euploides, 27 de 34 embriones aneuploides exhibieron fragmentación (Figura 40A). De los 7 embriones aneuploides que no tenían fragmentación, al menos 5 de los embriones se representaron fuera del grupo de embriones con un parámetro de tiempo normal y habrían sido candidatos poco probables para la transferencia. Curiosamente, también se detectó fragmentación en 2 de los 3 embriones que se reconocieron como triploides en función de su primera citocinesis inusual, lo que sugiere que la fragmentación también se puede usar junto con el fenotipo de 1 célula a 3 blastómeros u otros parámetros para ayudar a identificar embriones triploides (Figura 40 A).

Después de un análisis adicional de los 30 embriones en los que se observó fragmentación, se determinó que 7 de 8 embriones con errores meióticos exhibían fragmentación (comparar la Figura 36B y la Figura 40B), mientras que se detectó fragmentación en 14 de 20 embriones con errores mitóticos (comparar la Figura 36C y la 40B). Dado que solo 1 embrión con un error meiótico y 6 embriones con errores mitóticos se agrupan en una región similar a los embriones normales, el análisis de fragmentación junto con las mediciones de los inventores del parámetro del ciclo celular pueden usarse para evitar la selección y transferencia de tales embriones aneuploides (Figura 40B). Además, de los embriones con errores mitóticos que exhibieron fragmentación, 5 de 9 embriones y 1 de 11 embriones que se concentraron cerca de embriones euploides tenían errores mitóticos subyacentes de mosaico bajo y mosaico alto, respectivamente (Figura 40C). Esto sugiere que la inclusión de la fragmentación con el análisis de parámetros de los inventores también puede ayudar en la clasificación de los embriones que se agrupan en torno al área de sincronización de parámetros normales.

Finalmente, los criterios adicionales de fragmentación, tales como el grado y el momento de desarrollo de la fragmentación celular, también pueden ayudar en la clasificación de embriones. Como muestra la Figura 40D, no hay embriones con un alto grado de fragmentación (medida como más del 25% de fragmentación por volumen de citoplasma) y aproximadamente la mitad de los embriones, que muestren un bajo grado de fragmentación (medida como menos del 25% de fragmentación por volumen de citoplasma) acumulado en una región similar a los embriones normales. Además, en todos los embriones que se agruparon en un área donde se observó el tiempo de parámetro normal, la fragmentación solo se detectó al inicio de la etapa de 2 células (Figura 40E). En contraste, los embriones que exhibieron fragmentación comenzando en la etapa de 1 célula o después de la división en 3 o más células se concentraron en otras regiones fuera del agrupamiento de embriones euploides cuando se graficaron. Esto sugiere que la fragmentación, que ocurre en la etapa de desarrollo más temprana después de la fertilización (1-célula) o la fragmentación que se propaga por divisiones mitóticas subsiguientes después de la etapa de 2 células puede tener serias consecuencias para el tiempo de parámetro normal y la viabilidad embrionaria.

#### Discusión

El análisis de los inventores confirma y refina la observación de que los embriones que siguen estrictos tiempos en mitosis y citocinesis durante las primeras tres divisiones de excisión son mucho más propensos a desarrollar la etapa de blastocisto y formar un blastocisto de alta calidad con una masa celular interna expandida (MCI). Estos resultados confirman además que pueden usarse parámetros morfológicos dinámicos para seleccionar los embriones óptimos para la transferencia o crioconservación durante un procedimiento de FIV o ICSI.

Además, el análisis de los inventores establece que el análisis de imágenes a intervalos de los inventores se puede utilizar para diferenciar entre el tipo de error (meiótico frente a mitótico), detectar duplicaciones cromosómicas (trisomías) y deleciones (monosomías), así como para determinar el grado de mosaicismo de la mitosis en embriones humanos (Figura 39). Dado que una gran proporción de anomalías cromosómicas surgen por vía materna durante las divisiones meióticas (Fragouli et al., (2006) *Cytogenet Genome Res* 114: 30-38; Fragouli et al., (2006) *Hum Reprod* 21: 2319-2328; Frumkin et al. (2008) *Mol Cell Endocrinol* 282: 112-119; Johnson et al. (2010) *Hum Reprod* 25: 1066-1075), el potencial de desarrollo de ovocitos maduros in vitro también se puede evaluar utilizando este sistema durante la maduración y posterior fertilización y desarrollo del embrión. Con este fin, la tecnología de imágenes de los inventores también se puede utilizar para evaluar la viabilidad, el potencial de desarrollo y el estado cromosómico de otros tipos de células madre, incluidas las células madre pluripotentes inducidas (iPSCs) y las células madre embrionarias humanas (hESCs), que se ha informado que llevan aberraciones cromosómicas completas y/o parciales (Mayshar et al., (2010) *Cell Stem Cell*, 7: 521-531). En conjunto, también sugiere que los parámetros de ciclo celular de los inventores junto con la evaluación de aneuploidía y el análisis de fragmentación completo (presencia/ausencia, grado y momento de fragmentación) pueden ayudar en la determinación de qué embrión o embriones son competentes en el desarrollo para la transferencia.

#### Ejemplo 8

Correlación entre la dinámica de la fragmentación celular y aneuploidía

Métodos

La zona pelúcida (ZP) se eliminó mediante tratamiento con solución de Tyrone acidificada (Millipore), como se describió anteriormente, y los embriones libres de ZP se lavaron tres veces en solución tamponada con fosfato (PBS; Invitrogen, Carlsbad) con albúmina de suero bovino al 0,1% (BSA; Sigma-Aldrich) antes de la fijación en paraformaldehído al 4% en PBS (USB Corp., Cleveland, OH) durante 20 minutos a temperatura ambiente (TA). Una vez fijados, los embriones se lavaron tres veces en PBS-0,1% BSA para eliminar cualquier fijador residual y se inmunotizó con 1 µg/ml de DAPI y 0,5 µg/ml de MitoTracker Red CMXRos (Invitrogen) durante 15 minutos a temperatura ambiente. La inmunofluorescencia se visualizó mediante imágenes secuenciales, por lo que la vía del canal se cambió cada cuadro para evitar la contaminación cruzada entre los canales, utilizando un microscopio confocal Zeiss LSM510 Meta de exploración laser invertido descrito en este documento <http://nism.stanford.edu/Equipment/LSM510Meta01v01.html>. Las secciones confocales se capturaron a intervalos de 1 µm a lo largo de todo el embrión y se procesaron en ImageJ (NIH) para el análisis de imágenes de Z-stack. Las reconstrucciones tridimensionales de embriones se realizaron con IMARIS (Bitplane).

El análisis de FISH se realizó incubando primero con tampón hipotónico de citrato trisódico al 1% antes de la fijación en solución de Carnoy (relación 3:1 de metanol a ácido acético glacial) y luego montando en portaobjetos tratados con poli-L-lisina (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) madurados durante la noche a 60°C. La hibridación al cromosoma 18 y el cromosoma Y se completó usando sondas de ADN marcadas fluorescentemente (Abbott Molecular, Des Plaines, IL) durante 2 días en una cámara humidificada a 37°C y las señales positivas se visualizaron mediante microscopía de fluorescencia.

#### Resultados

Actualmente, la capacidad de desarrollo de los embriones humanos se evalúa con mayor frecuencia el día 3 o el día 5 según las características morfológicas que pueden incluir el número de blastómeros y la asimetría y/o el grado de fragmentación celular. Curiosamente, la fragmentación se observa típicamente solo en embriones humanos. También hay evidencias que sugieren que la fragmentación celular ocurre en embriones humanos in vivo, lo que indica que la fragmentación no es una consecuencia del cultivo in vitro. Cuando se analizan los parámetros de imágenes del ciclo celular en embriones que presentaron o no fragmentación, se determinó que la evaluación dinámica de la fragmentación podría distinguir a los embriones euploides o normales de los aneuploides que se agrupan en la región del tiempo de los parámetros normales. (Figura 41 A). Después de un análisis adicional de los embriones en los que se observó fragmentación, se determinó el número de embriones que tenían errores meióticos y mitóticos subyacentes, mosaicismo alto y bajo y aquellos que parecían triploides (Figura 41B). Además, también se demostró que los criterios adicionales de fragmentación, tales como el grado y el momento de desarrollo de la fragmentación celular o la inclusión de la asimetría de blastómeros en combinación con el análisis de parámetros de los inventores también podrían ayudar en la evaluación embrionaria. (Figura 44B).

La contención de los cromosomas dentro de los fragmentos contribuye a una aneuploidía compleja

Al evaluar la composición cromosómica de cada embrión, se observó que los blastómeros individuales de los embriones aneuploides a menudo exhibían pérdidas o ganancias cromosómicas, cuya suma no siempre sumaba hasta 2 copias de cada cromosoma por blastómero. Por lo tanto, dada la observación de que los embriones aneuploides parecen estar asociados con la fragmentación. (Figura 41), se exploró si los cromosomas faltantes podían haber sido secuestrados en fragmentos durante el desarrollo. De hecho, se determinó que la fragmentación observada en la mayoría de los embriones (11 de 14) que no tenían el número total correcto de copias de un cromosoma dado y solo uno de los tres embriones aneuploides no fragmentados caía dentro de los intervalos de tiempo de los parámetros euploides o normales. (Figura 45A). Se sospecha que la falta de fragmentación observada en los tres embriones que mostraban el número incorrecto de copias cromosómicas puede explicarse por el hallazgo previo de que algunos fragmentos pueden no detectarse fácilmente mediante microscopía óptica, incluidas las imágenes microscópicas a intervalos, pero pueden reconocerse en mayor aumento utilizando ópticas alternativas.

Con el fin de probar si los fragmentos contienen cromosomas faltantes, se realizó un análisis de inmunofluorescencia en embriones humanos en etapa de división libre de zona pelúcida con el colorante de ácido nucleico, 4'6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) y el colorante de ADN mitocondrial, Mitotracker Rojo, para diferenciar entre el ADN nuclear y el mitocondrial usando microscopía confocal. Como se muestra por imágenes confocales de un solo cuadro en la Figura 45B, se observó la localización del ADN dentro de los fragmentos, que no se co-localizan con el ADN mitocondrial. Curiosamente, se observó un fragmento negativo para la tinción DAPI adyacente a un fragmento DAPI-positivo, lo que sugiere que no todos los fragmentos contienen ADN nuclear (Figura 45 B). Se obtuvieron resultados similares mediante la obtención de imágenes confocales de Z-stack y el modelado tridimensional de embriones completos, que exhibieron señales DAPI positivas (Figura 45C) en varios fragmentos también detectables por la óptica DIC. (Figura 45C). Estos hallazgos fueron respaldados por FISH para algunos de los cromosomas más comúnmente afectados en el desarrollo embrionario humano, como se demuestra en el ejemplo que se muestra en la Figura 45D. En este caso, se observaron 2 copias del cromosoma 18, dentro de un fragmento visualizado por imágenes a intervalos de un embrión con 4 copias del cromosoma Y. Por lo tanto, contrariamente a las nociones comunes de que los errores cromosómicos se manifiestan en el huso cuando los cromosomas se congregan y luego se segregan durante la división celular, el análisis de los inventores sugiere que la generación de errores cromosómicos puede ocurrir a través de la fragmentación de blastómeros que llevan cromosomas humanos.

### Modelo de originación de aneuploidía en embriones humanos tempranos

Aunque la fragmentación puede ocurrir con frecuencia en embriones humanos, el análisis de imágenes a intervalos de los inventores sugiere que a medida que avanza el desarrollo, los fragmentos pueden permanecer como unidades separadas de ADN cromosómico y citoplasma que se han denominado micronúcleos. Alternativamente, estos micronúcleos también pueden ser reabsorbidos por el mismo blastómero del que se produjeron o fusionaron con uno o varios blastómeros vecinos (Figura 44A). Si un micronúcleo que contiene cromosomas se fusiona con el blastómero del que se originó, entonces podría restaurar potencialmente el estado de euploidía embrionaria después de la ruptura de la envoltura nuclear (Figura 44C) y puede explicar hallazgos previos con respecto a la corrección cromosómica ocasional durante el desarrollo del embrión. Sin embargo, igual o más probable es la fusión de un micronúcleo con cromosoma(s) secuestrado(s) con un blastómero vecino (Figura 44C), lo que da como resultado los genotipos complejos en este estudio y otros.

Después de evaluar la correlación entre el momento de la fragmentación y los parámetros de formación de imágenes del ciclo celular, se observaron los efectos más significativos en ventanas de parámetros en embriones donde la fragmentación ocurrió en la etapa de 1 célula o más tarde en el estadio de 3-4 células (Figura 44B). Después del análisis de la composición cromosómica embrionaria, se determinó que los embriones con errores meióticos o aquellos que parecían triploides por imágenes típicamente exhibían fragmentación en la etapa de 1 célula. Por el contrario, la fragmentación se observó con mayor frecuencia después de la división de 1 célula a 2 células en embriones con errores mitóticos. Esto sugiere que el embrión humano tiene la capacidad de detectar anomalías cromosómicas subyacentes y experimenta fragmentación como medio para corregir la aneuploidía embrionaria (Figura 44C) o posiblemente para iniciar el proceso de su eventual desaparición. Para aquellos embriones con errores mitóticos, también se propone en el modelo de desarrollo embrionario temprano de los inventores que estos embriones probablemente se dividieron antes de que todos los cromosomas tuvieran la oportunidad de alinearse adecuadamente en el huso mitótico (Figura 44C).

### Discusión

Se ha demostrado que la frecuencia excepcionalmente alta de la aneuploidía embrionaria humana puede originarse como un producto de un fenómeno en gran medida específico del ser humano distinto del huso meiótico y mitótico a través de la fragmentación celular detectable mediante rastreo automático. No solo se proporcionan evidencias para la contención de cromosomas dentro de fragmentos celulares denominados micronúcleos que pueden o no ser reabsorbidos posteriormente por blastómeros embrionarios, sino en función del momento de fragmentación y del análisis de imágenes de los inventores, también se sugiere que el embrión humano sea consciente de su composición cromosómica y que pueda sufrir fragmentación para sobrevivir.

Con base en estos resultados, se espera que la evaluación del desarrollo de embriones humanos y blastómeros individuales basada en las propiedades celulares fundamentales del embrión pueda permitir la distinción entre embriones euploides y aneuploides antes de la transferencia. Esto debería mejorar los resultados de FIV evitando potencialmente la transferencia inadvertida de embriones que muy probablemente resulten en letalidad embrionaria y aborto espontáneo.

### Ejemplo 9

Correlación entre el borrado epigenético y la activación del transposón durante el desarrollo de la preimplantación.

### Métodos

La expresión génica se analizó en embriones humanos utilizando el sistema microfluídico BioMark Dynamic Array (Fluidigm Corp., So. San Francisco, CA). Los embriones libres de ZP se lavaron en medio Quinn's Advantage con Hepes más SPS al 5% tres veces y luego se congelaron rápidamente en solución tamponada con fosfato (PBS; Invitrogen, Carlsbad) con albúmina de suero bovino al 0,1% (BSA; Sigma-Aldrich) en hielo seco para su almacenamiento a -80°C hasta su uso. Los embriones individuales se preamplificaron de acuerdo con el protocolo del fabricante (Fluidigm Corp.) utilizando el kit de qRT-PCR CellsDirect One-Step (Invitrogen) y los ensayos de expresión génica TaqMan 20X (Applied Biosystems, Foster City, CA). Junto con 2X Universal Master Mix (Applied Biosystems) y Sample Loading Buffer (Fluidigm Corp.), se cargaron 2,25 ul de cDNA pre amplificado en las entradas de muestras de cualquiera de 48.48 o 96.96 Dynamic Array (DA; Fluidigm Corp.). Para cada sonda, se cargaron ensayos de expresión génica 20X TaqMan y tampón de carga de ensayo (Fluidigm Corp.) en las entradas del ensayo en el DA. Cada muestra se ensayó por triplicado y la expresión de entre 6 y 10 genes constitutivos se analizó como control. Los valores calculados de cantidad relativa normalizada (CNRQ) se calcularon y normalizaron para CTNNB1 y GAPDGH utilizando el software de análisis qBasePlus 1.3 (<http://www.biogazelle.com>).

### Resultados

Se estima que hasta el 45% del genoma humano está compuesto por elementos móviles llamados transposones de ADN, que se transponen mediante un mecanismo directo de "cortar y pegar" de ADN. Los transposones normalmente son silenciados por la metilación del promotor CpG a través de mecanismos epigenéticos, excepto durante un breve período de desmetilación global que se completa por la etapa de mórula del desarrollo de

mamíferos. Dado que los transposones escapan del silenciamiento epigenético durante el desarrollo previo a la implantación y una vez activos pueden causar reordenamientos genómicos que pueden obstaculizar el emparejamiento cromosómico durante la meiosis y la mitosis, posiblemente resultando en cruces desiguales y no disyunción, los inventores razonaron que la alta incidencia de inestabilidad cromosómica observada en embriones humanos en el estadio de escisión pueden deberse a una mayor actividad del transposón. En base a los hallazgos recientes de que la metilación del ADN, las modificaciones de histonas, la metilación de H3 lisina 4 y lisina 9, así como la interferencia de ARN (ARNi) están involucrados en el silenciamiento o la activación del transposón, se evaluó la expresión de ADN metiltransferasas de novo, DNMT3A y DNMT3B, las enzimas modificadoras de histonas, SETD7 y SETDB1, que median la metilación de la histona H3 lisina 4 y la lisina 9, respectivamente, y la enzima asociada a ARNi, DICER, durante el desarrollo de la preimplantación humana. Con la excepción de SETD7, cuya modificación de histonas se ha asociado con una mayor actividad del transposón, la expresión de DNMT3A, DNMT3B, SETDB1 y DICER disminuyó significativamente en la etapa de mórula cuando se completa el borrado epigenético y se observan niveles elevados de mosaicismo, lo que sugiere que la falta de regulación epigenética y de ARNi durante el desarrollo embrionario previo a la implantación puede contribuir a reordenamientos genómicos causados por transposones que se detectan como diferencias en el número de copias cromosómicas. (Figura 43)

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para detectar aneuploidía en un embrión humano que comprende:
- (a) cultivar un embrión humano in vitro en condiciones adecuadas para el desarrollo de embriones;
- (b) medir uno o más parámetros celulares seleccionados del grupo que consiste en:
- 5 (i) la duración de la primera citocinesis;
- (ii) el intervalo de tiempo entre la citocinesis 1 y la citocinesis 2; y
- (iii) el intervalo de tiempo entre la citocinesis 2 y la citocinesis 3 de dicho embrión humano mediante microscopía a intervalos para llegar a una medición del parámetro celular; y
- (c) emplear dicha medición de parámetro celular para determinar si dicho embrión humano es aneuploide.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en el que el embrión humano se ha producido mediante la fertilización de un ovocito in vitro o inyección intracitoplasmática de esperma en un ovocito in vitro.
3. El método de la reivindicación 1, en el que se detecta aneuploidía y el uno o más parámetros celulares comprenden:
- (a) una duración de la primera citocinesis que es mayor de 30 minutos;
- 15 (b) un intervalo de tiempo entre la citocinesis 1 y la citocinesis 2 que es inferior a 8 horas; y/o
- (c) un intervalo de tiempo entre la citocinesis 2 y la citocinesis 3 que es mayor que 90 minutos.
4. El método de la reivindicación 1, que comprende además determinar si la aneuploidía surge de un error mitótico o meiótico.
5. El método de la reivindicación 4, en el que los errores mitóticos están determinados por:
- 20 (a) una duración de la primera citocinesis que es más larga que 35 minutos;
- (b) un intervalo de tiempo entre la citocinesis 1 y la citocinesis 2 que es más corto que 7 horas; y/o
- (c) un intervalo de tiempo entre la citocinesis 2 y la citocinesis 3 que dura más de 2 horas.
6. El método de la reivindicación 4, en el que los errores meióticos están determinados por:
- (a) una duración de la primera citocinesis que es más larga que 100 minutos;
- 25 (b) un intervalo de tiempo entre la citocinesis 1 y la citocinesis 2 que es más corto que 4 horas; y/o
- (c) un intervalo de tiempo entre la citocinesis 2 y la citocinesis 3 que es más largo que 2 horas.
7. El método de la reivindicación 1, en el que la aneuploidía detectada es una monosomía o una trisomía.
8. El método de la reivindicación 7, en el que la monosomía es la monosomía 22 o la trisomía es la trisomía 21.
9. El método de la reivindicación 2, en el que el embrión humano se ha producido mediante inyección intracitoplásmica de esperma.
- 30 10. El método de la reivindicación 1, que comprende además detectar la presencia o ausencia y/o el nivel de fragmentación de dicho embrión.
11. El método de la reivindicación 10, en el que un alto nivel de fragmentación es indicativo de aneuploidía.
12. El método de la reivindicación 11, en el que el alto nivel de fragmentación comprende más de aproximadamente 25% de fragmentación en volumen de citoplasma.
- 35 13. El método de la reivindicación 1, en el que se detecta aneuploidía y uno o más parámetros celulares comprenden:
- (a) un intervalo de tiempo entre la citocinesis 1 y la citocinesis 2 que es inferior a 8 horas; o
- (b) un intervalo de tiempo entre la citocinesis 2 y la citocinesis 3 que es mayor que 90 minutos.

14. El método de la reivindicación 4, en el que los errores mitóticos están determinados por:

- (a) un intervalo de tiempo entre la citocinesis 1 y la citocinesis 2 que es más corto que 7 horas; o
- (b) un intervalo de tiempo entre la citocinesis 2 y la citocinesis 3 que es más largo que 2 horas.

15. El método de la reivindicación 4, en el que los errores meióticos están determinados por:

- 5
- (a) un intervalo de tiempo entre la citocinesis 1 y la citocinesis 2 que es más corto que 4 horas; o
  - (b) un intervalo de tiempo entre la citocinesis 2 y la citocinesis 3 que es más largo que 2 horas.

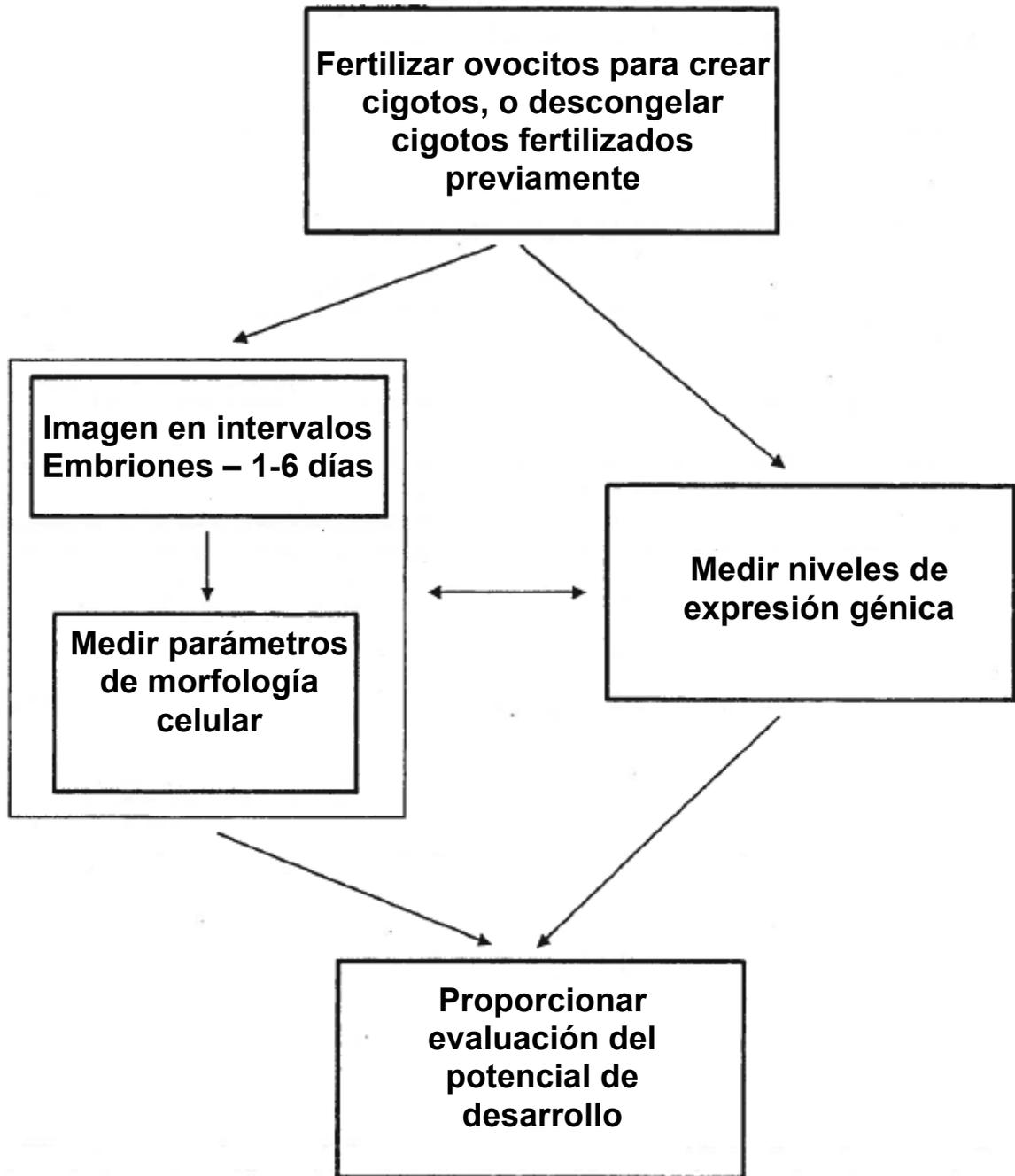
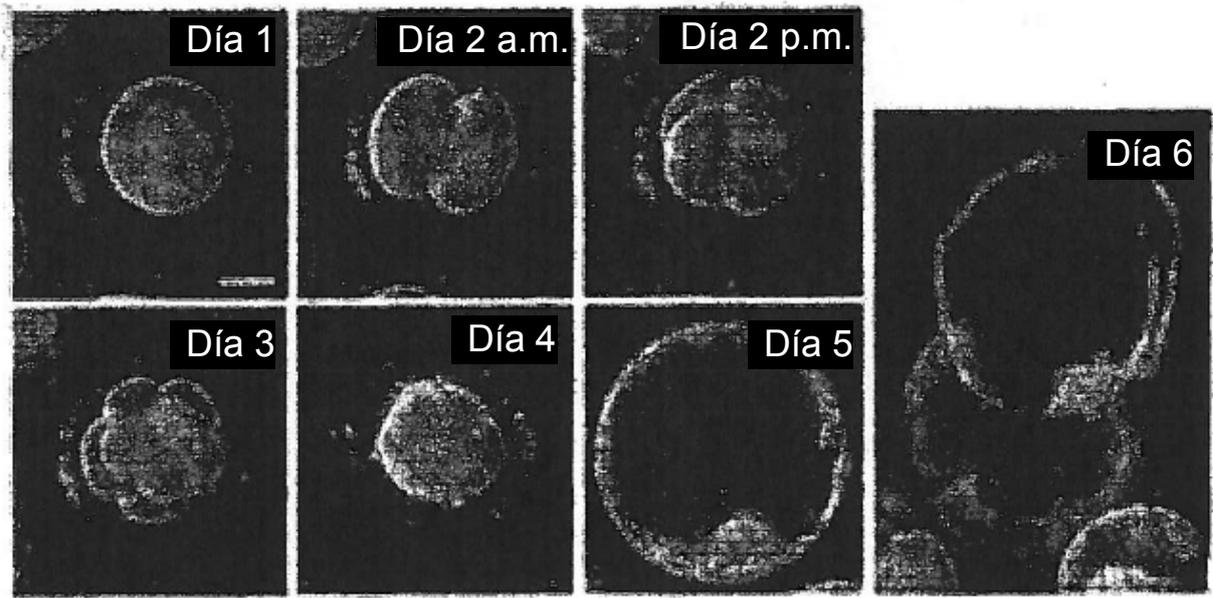


Fig. 1



**Fig. 2**

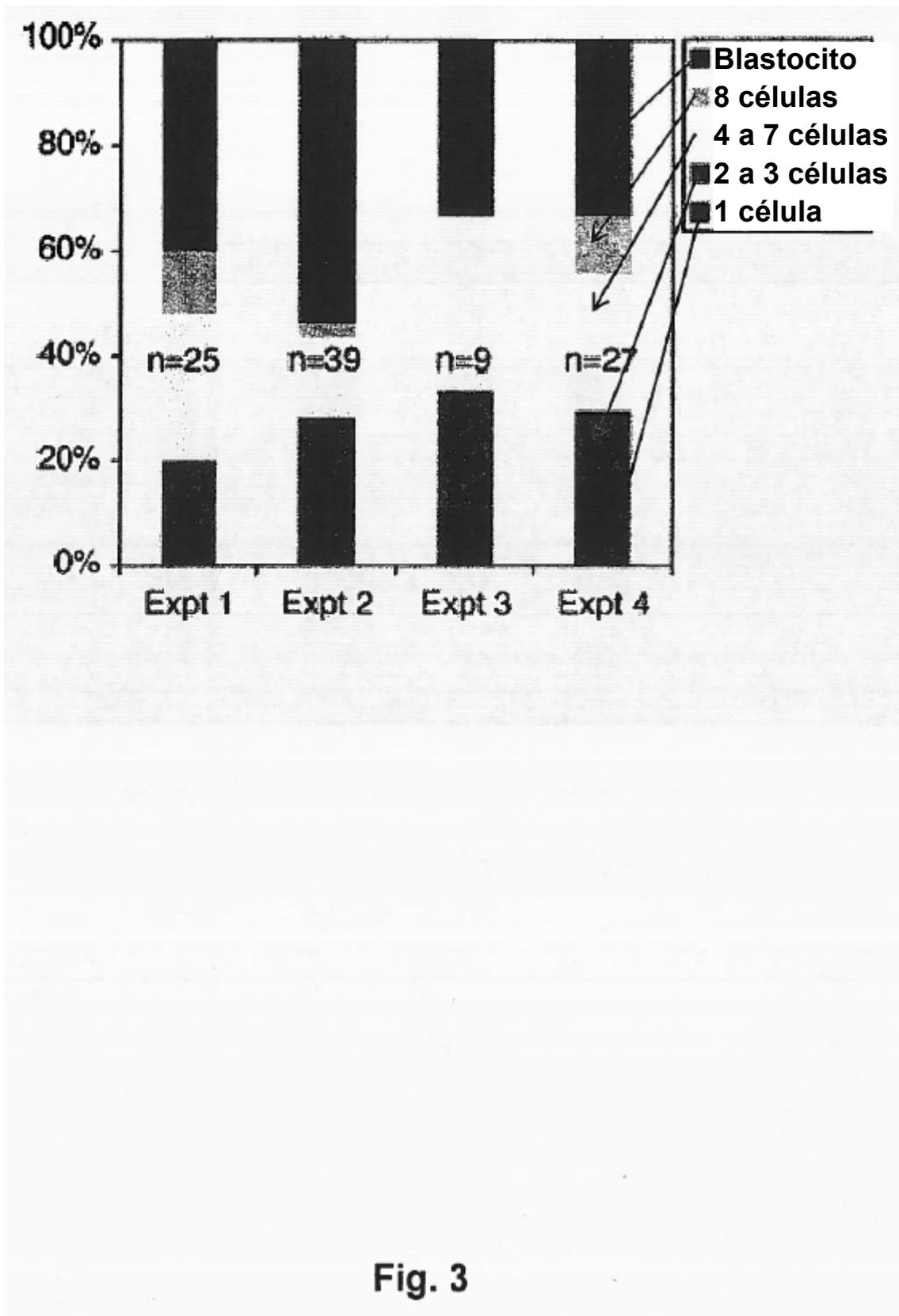
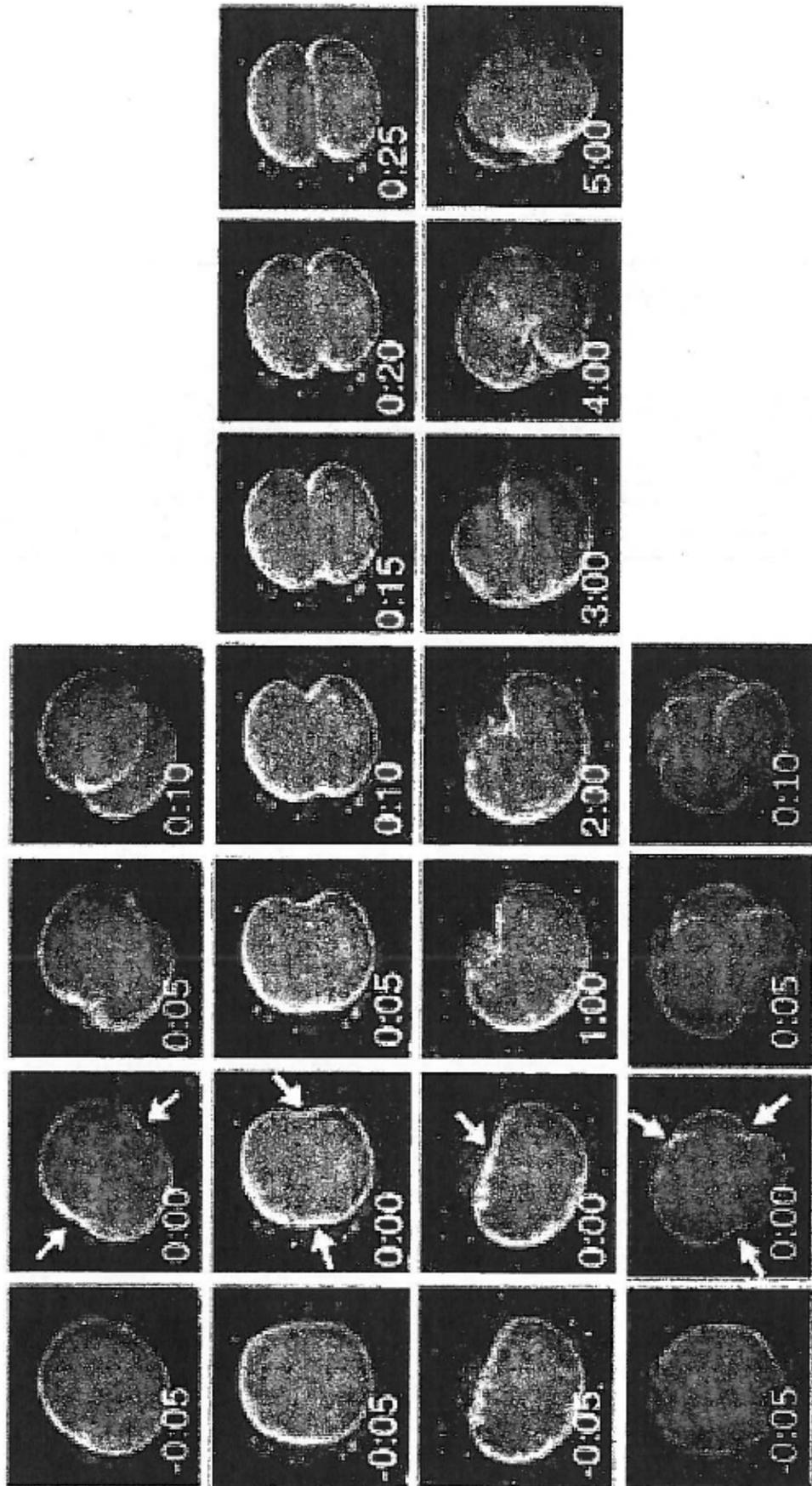
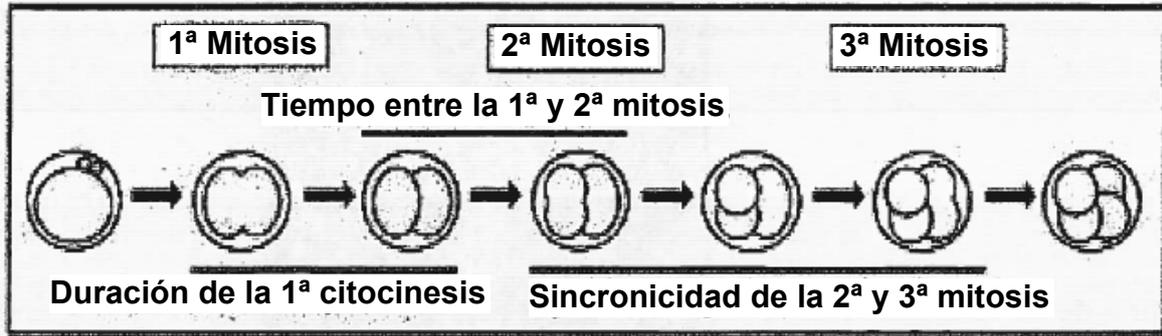


Figura 4





**Fig. 5**

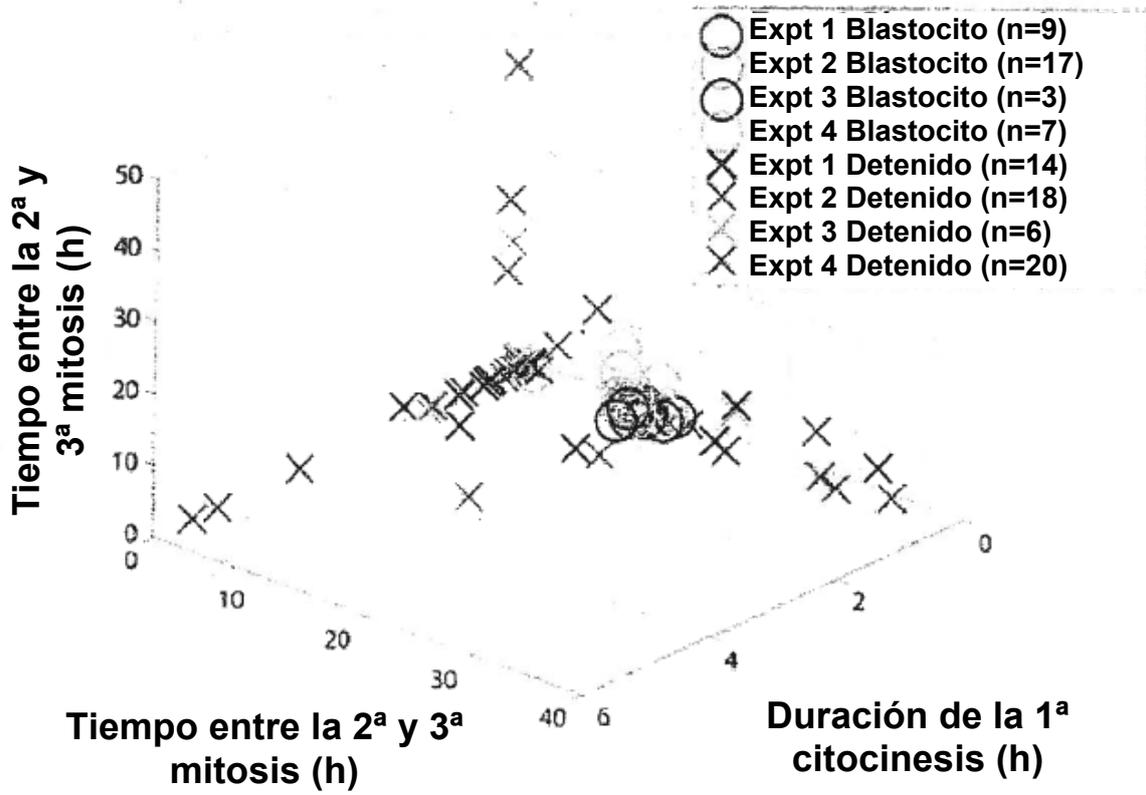
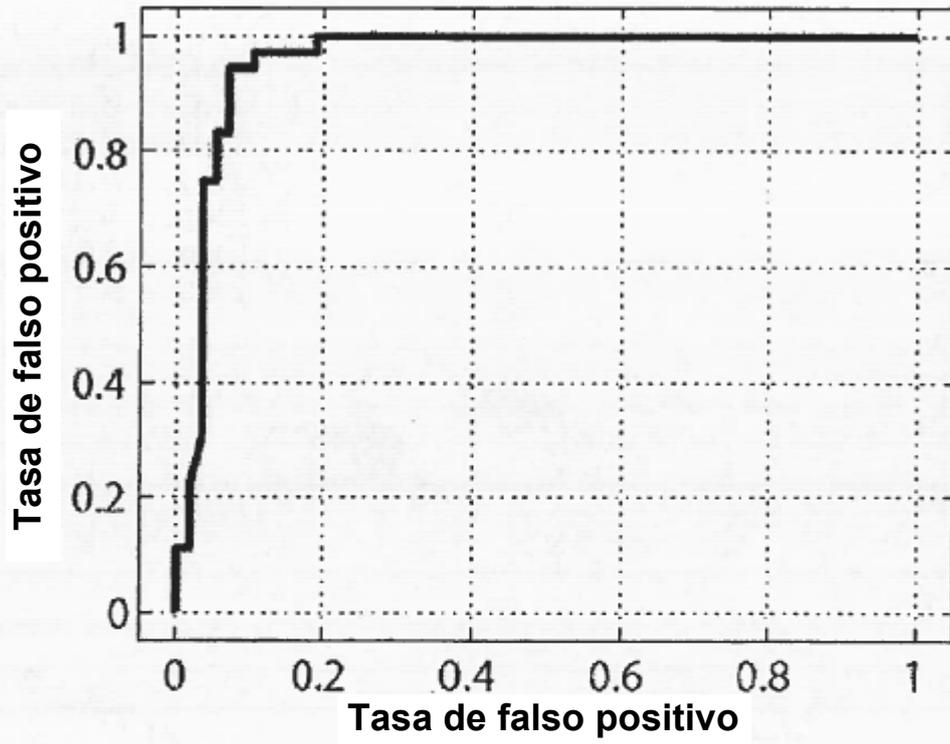


Fig. 6



**Fig. 7**

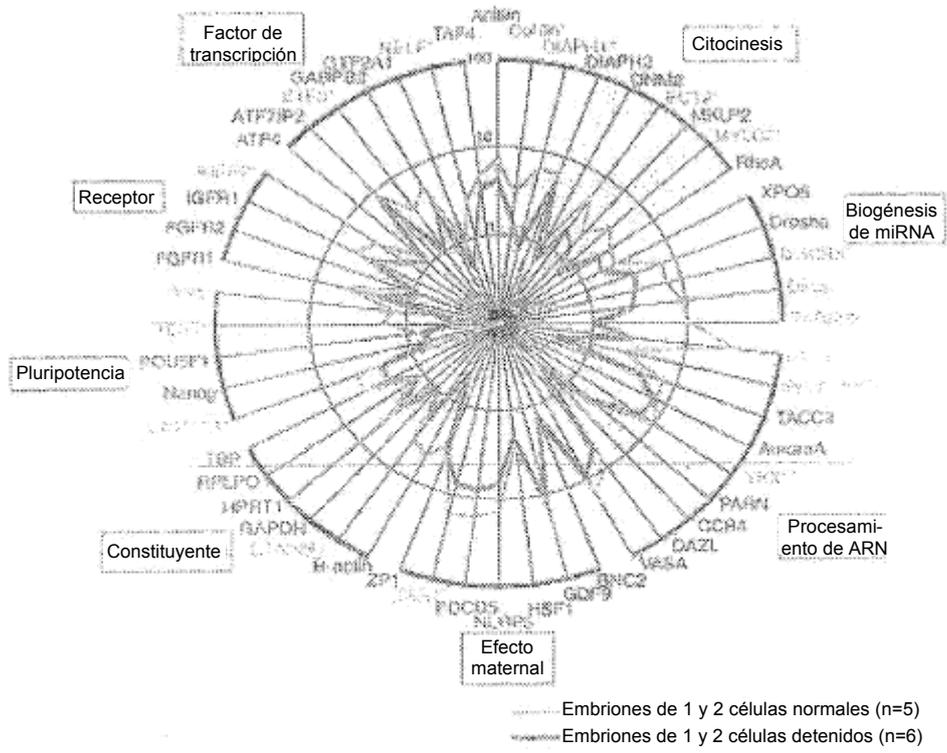


Fig. 8

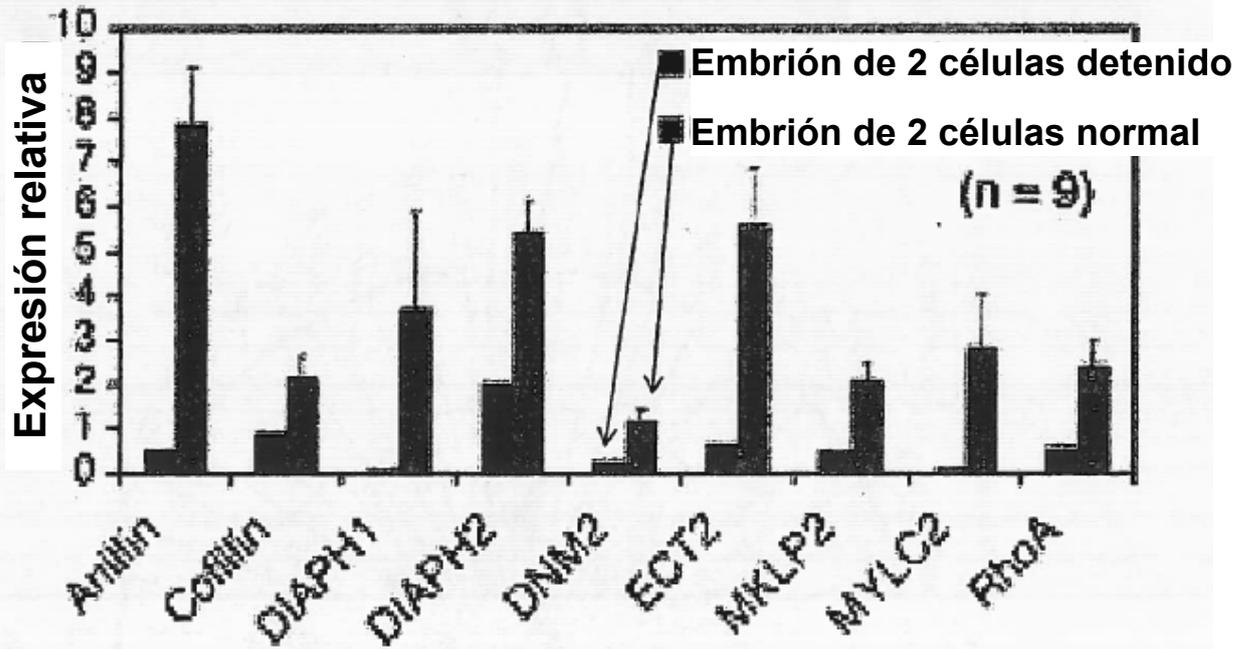
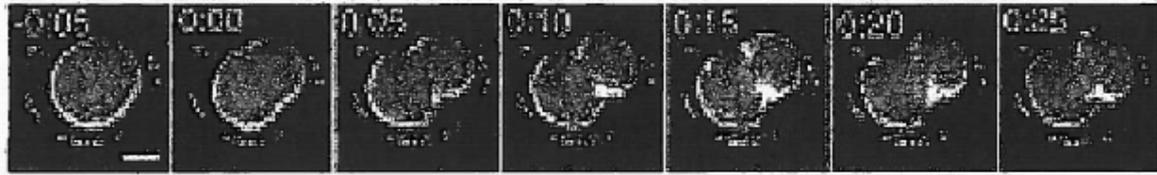


Fig. 9

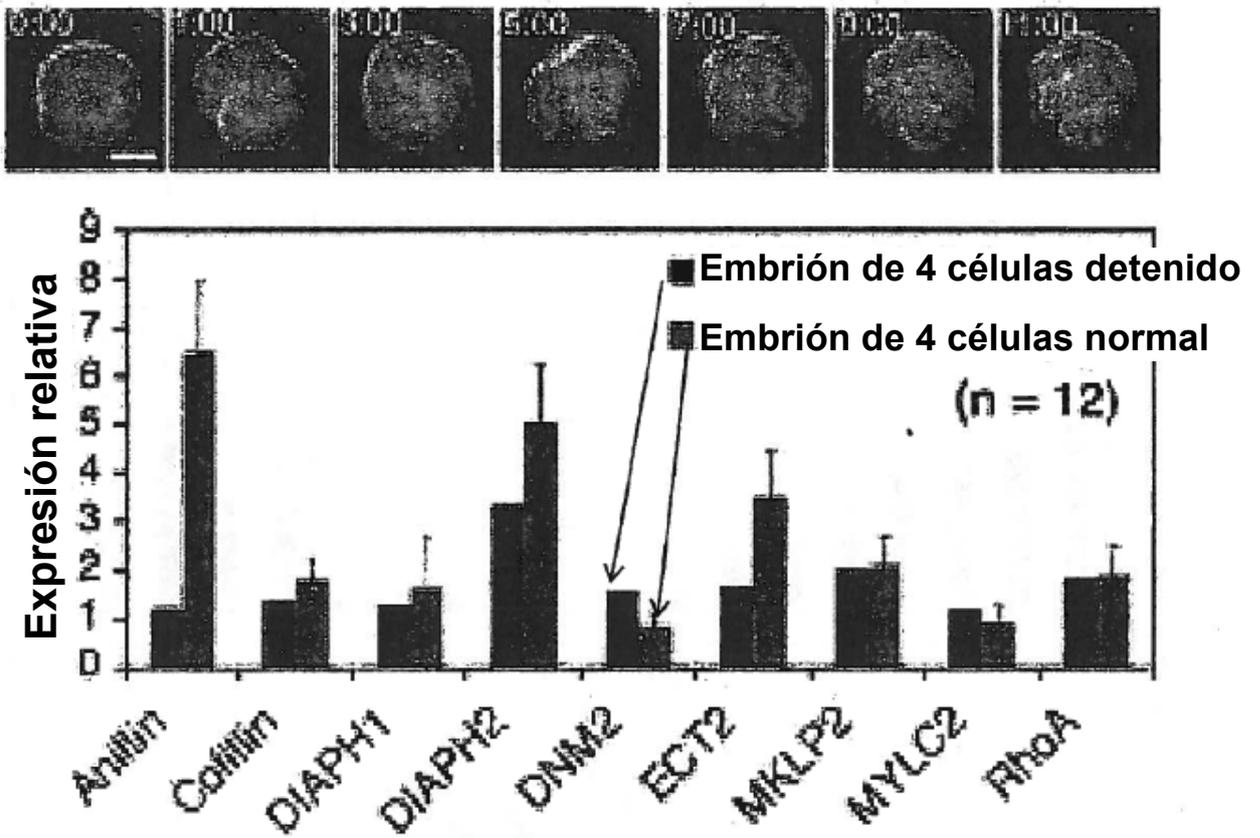


Fig. 10

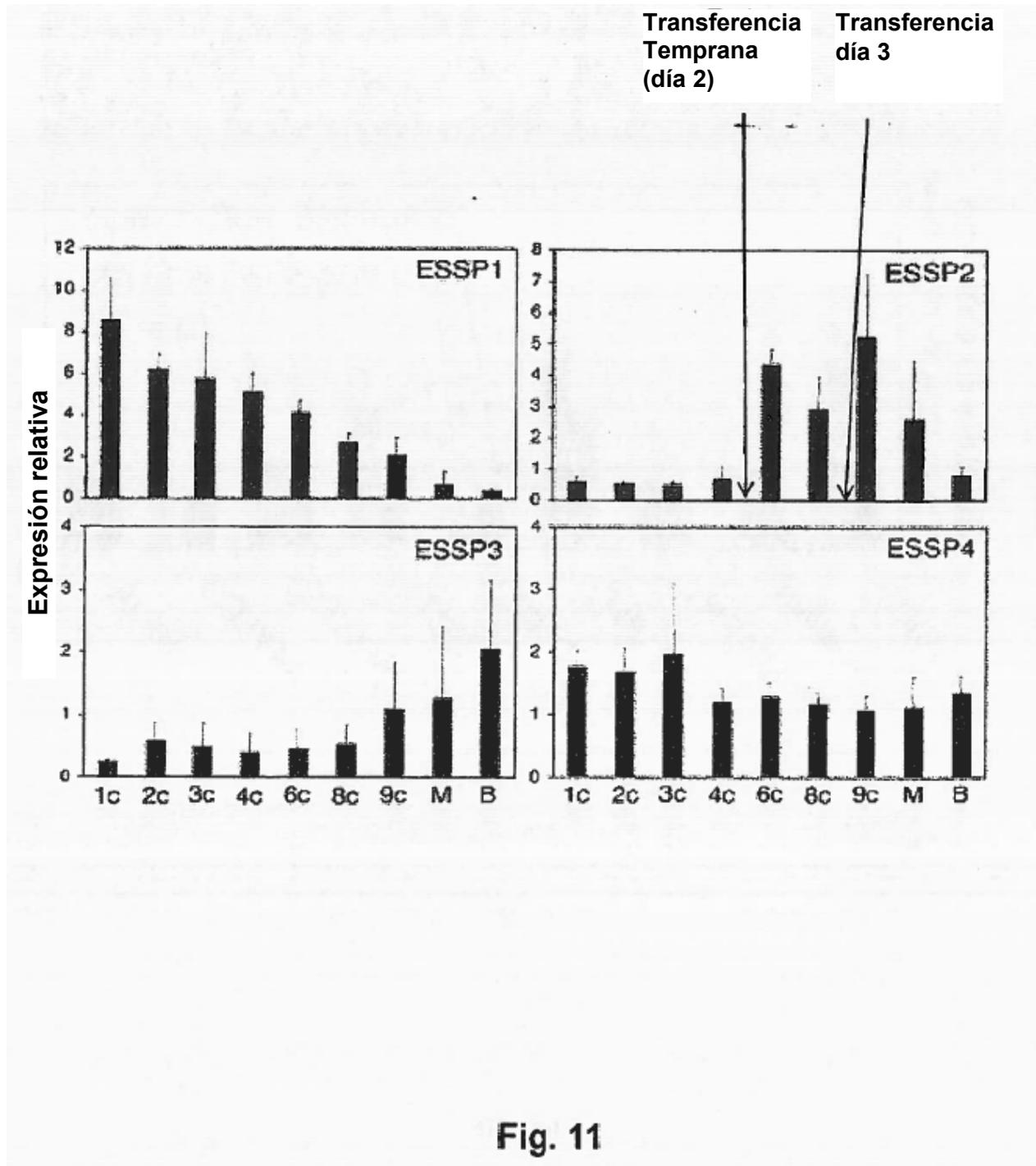
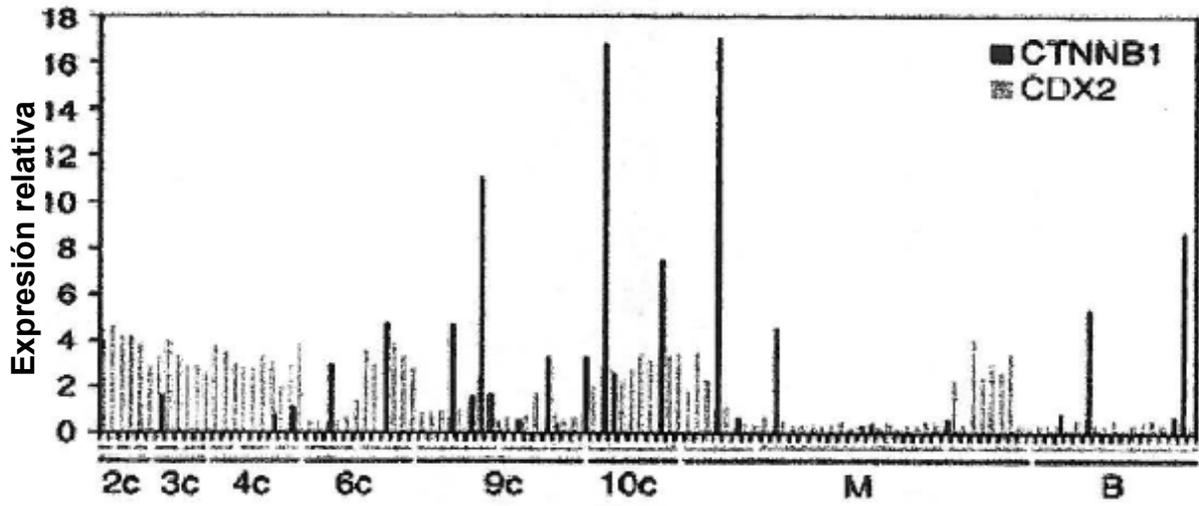


Fig. 11

a.



b.

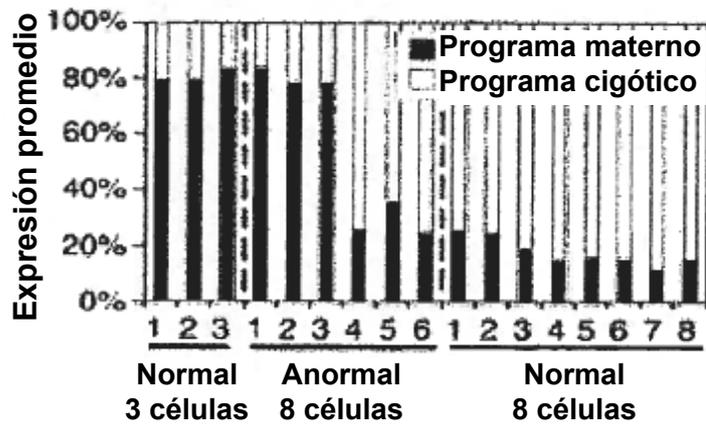
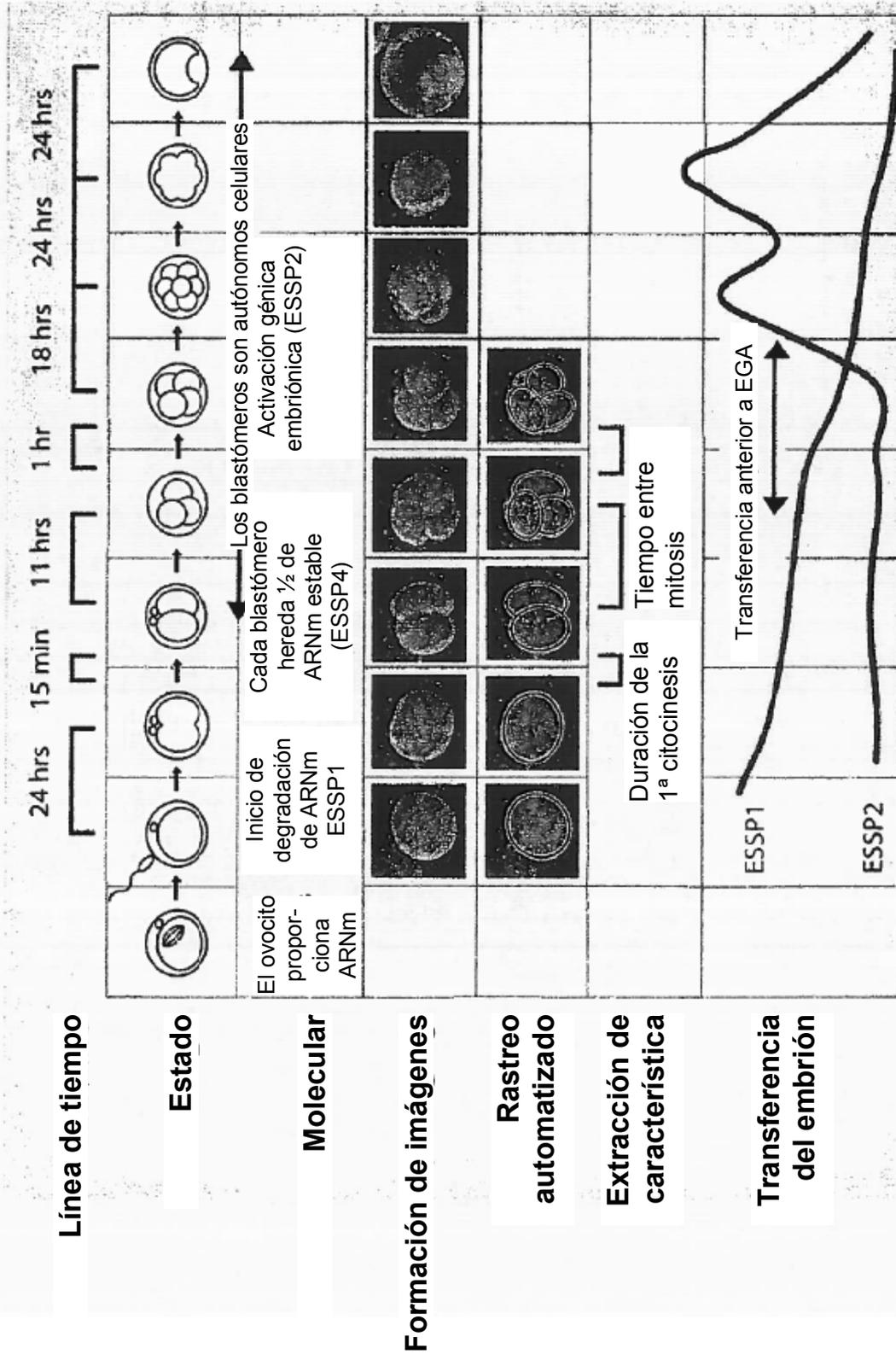
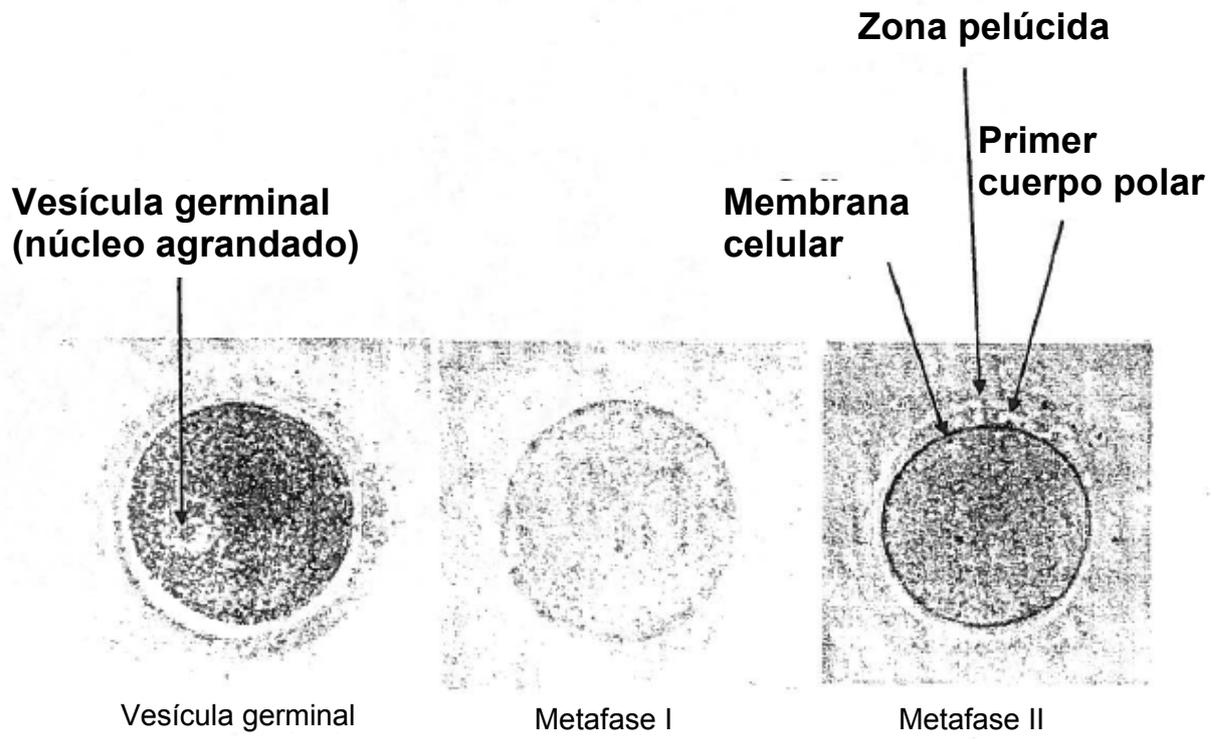


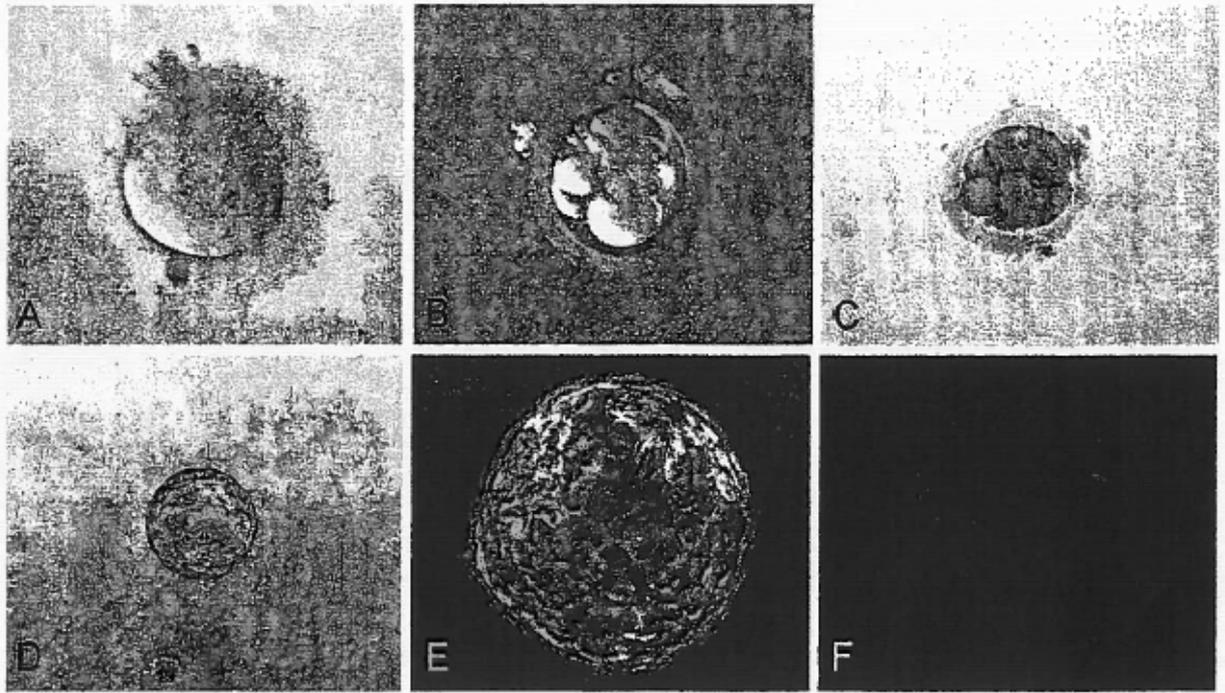
Fig. 12

Figura 13

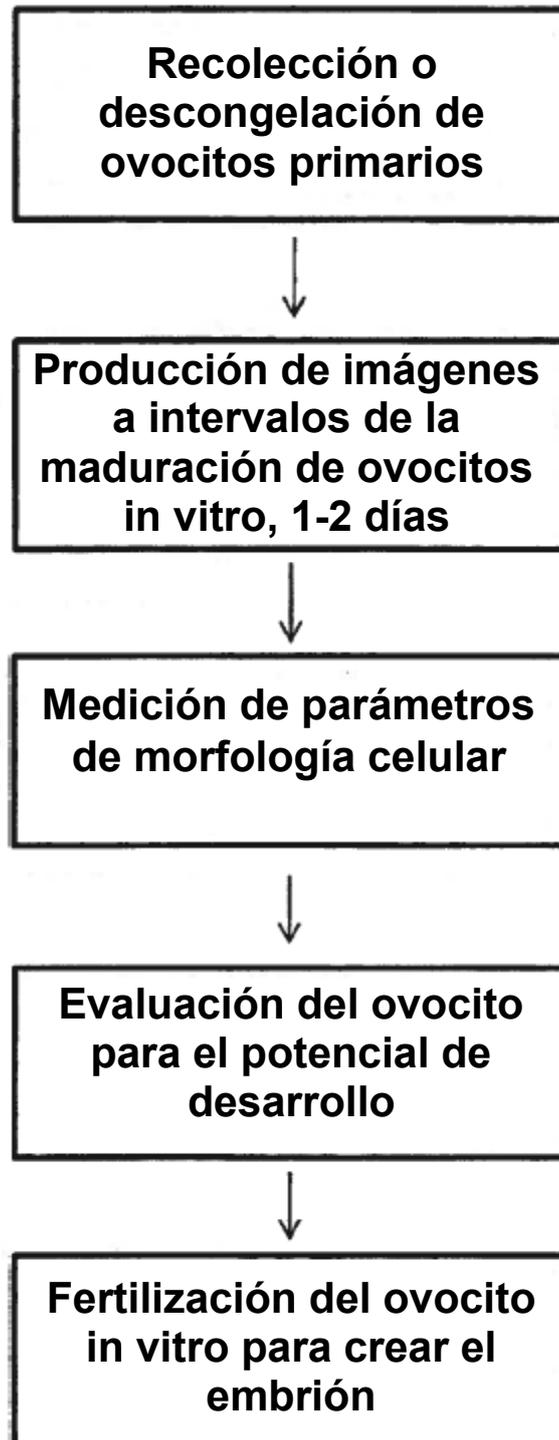




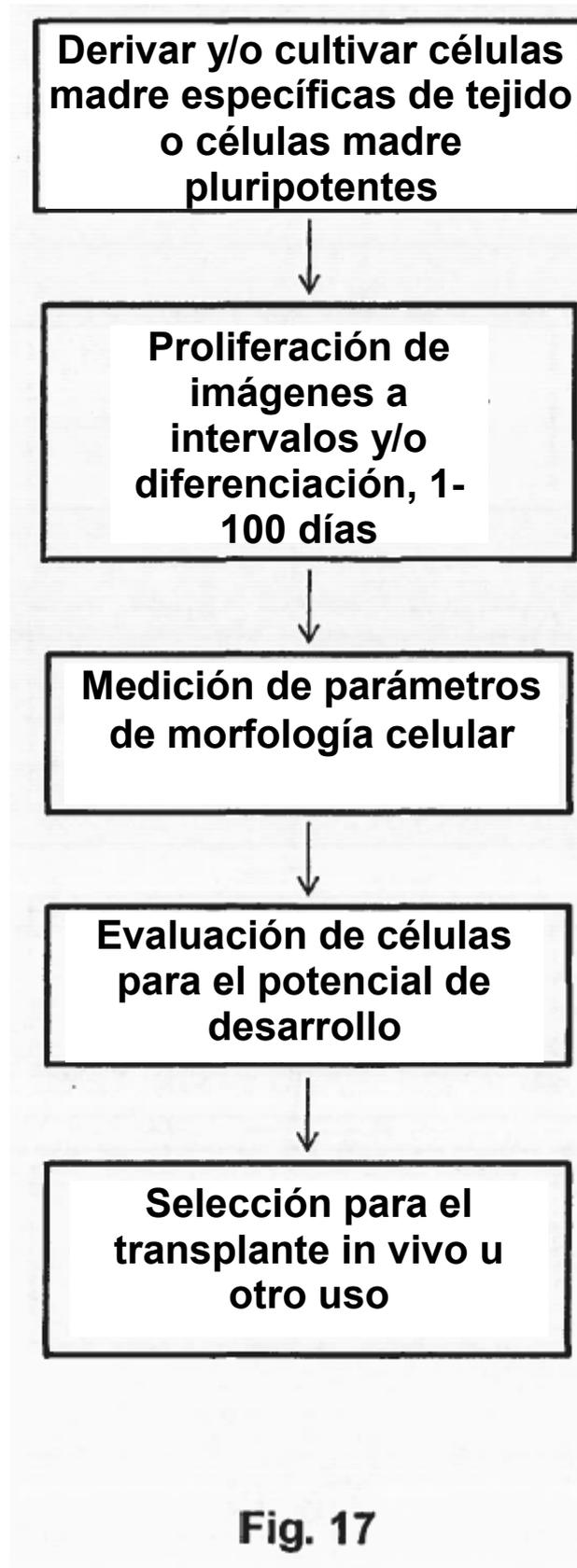
**Fig. 14**

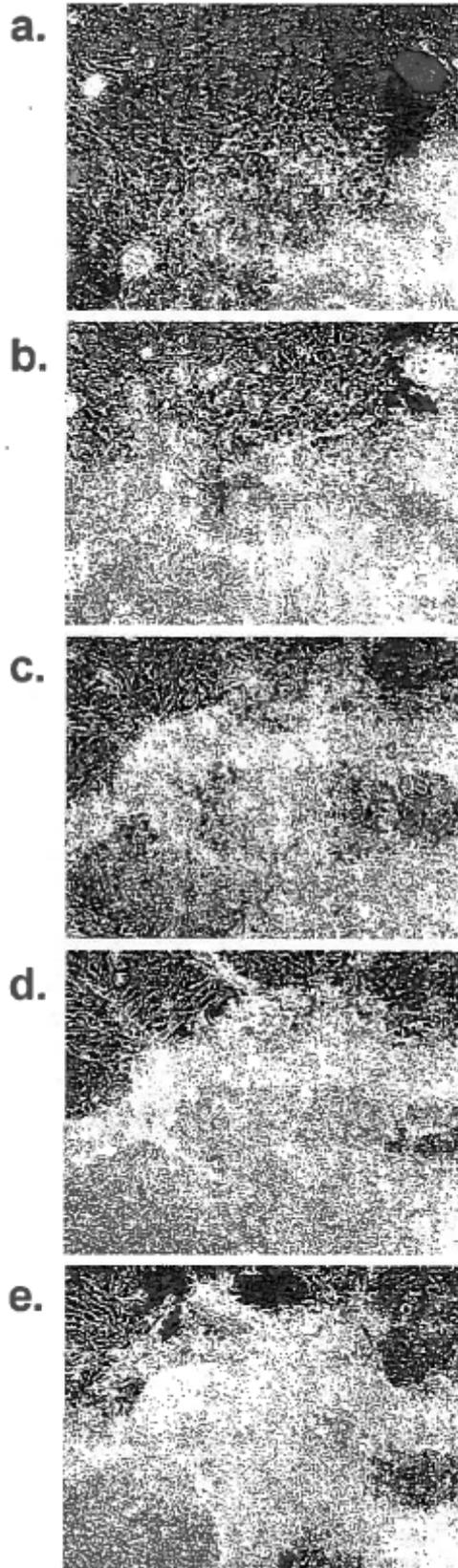


**Fig. 15**



**Fig. 16**





**Fig. 18**

Figura 19

Tabla 1

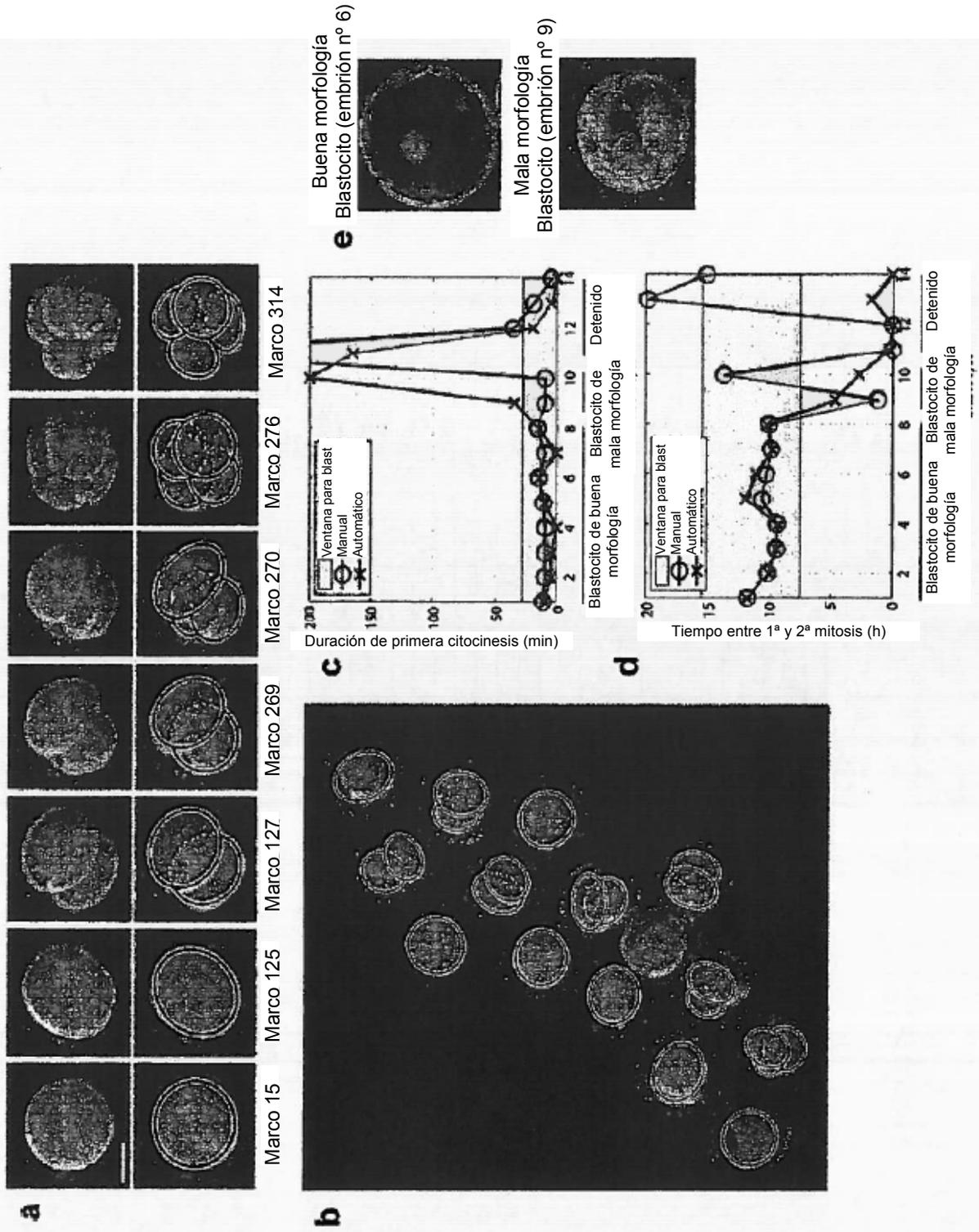
<b>Categoría</b>	<b>Nº de genes</b>
Apoptosis	5
Citocinesis	10
Diferenciación	9
Activación génica embrionaria	10
Epigenética	5
Célula germinal	9
Constitutivo	10
Ligando / receptor	11
Efecto materno	8
miRNA	5
Pluripotencia	7
Procesamiento de ARN	7
Específico del sexo	2
TE / ICM	14
Factor de transcripción	11

**Tabla 2**

**Figura 20**

Modelo 1	Modelo 2	Modelo 4
Anillin	CCNA1	CTK7
ATG5	CCR4	FABP5
ATP2C1	DNM2	FGFR2
Aurora A	EIF1AX	GAPDH
Bclaf1	EIF4A3	HMOX2
Cofilin	EOMES	Hsp70
CPEB1	GDF3	IGF2R
DAZL	GTF2A1	LSM3
Dgcr8	H2AFZ	PABPC1
DIAPH1	JARID1B	PRMT5
DIAPH2	Nanog	RPLPO
Dicer	NES	YY1
DNAJA4	Prdm14	
DNMT3B	PTMA	Undefined
Drosha	RUNX2	ATF4
ECT2	SERPINA1	ATF7IP
EHMT2	SERTAD1	ATF7IP2
FGFR1	SOX2	B2M
FYN	STELLAR	BNC2
GABPB2	YY1	BTF3
GDF9		CDX2
HMOX2	Pattern 3	CTNNB1
HPRT1	B-actin	Dby
HSF1	Bcl2	Hsp70.1
IGF1R	GCM1	PRDM1
IGF2R	HDAC7A	Symplekin
LAMB1	IFITM1	TARBP2
MKLP2	POU5F1	Xist
MYLC2	SALF	
NLRP5		
PARN		
PDCD5		
PVR		
RhoA		
Sycp3		
TACC3		
TAF4		
TBP		
TERT		
VASA		
XPO5		
YBX2		
Zar1		
ZP1		

Figura 21



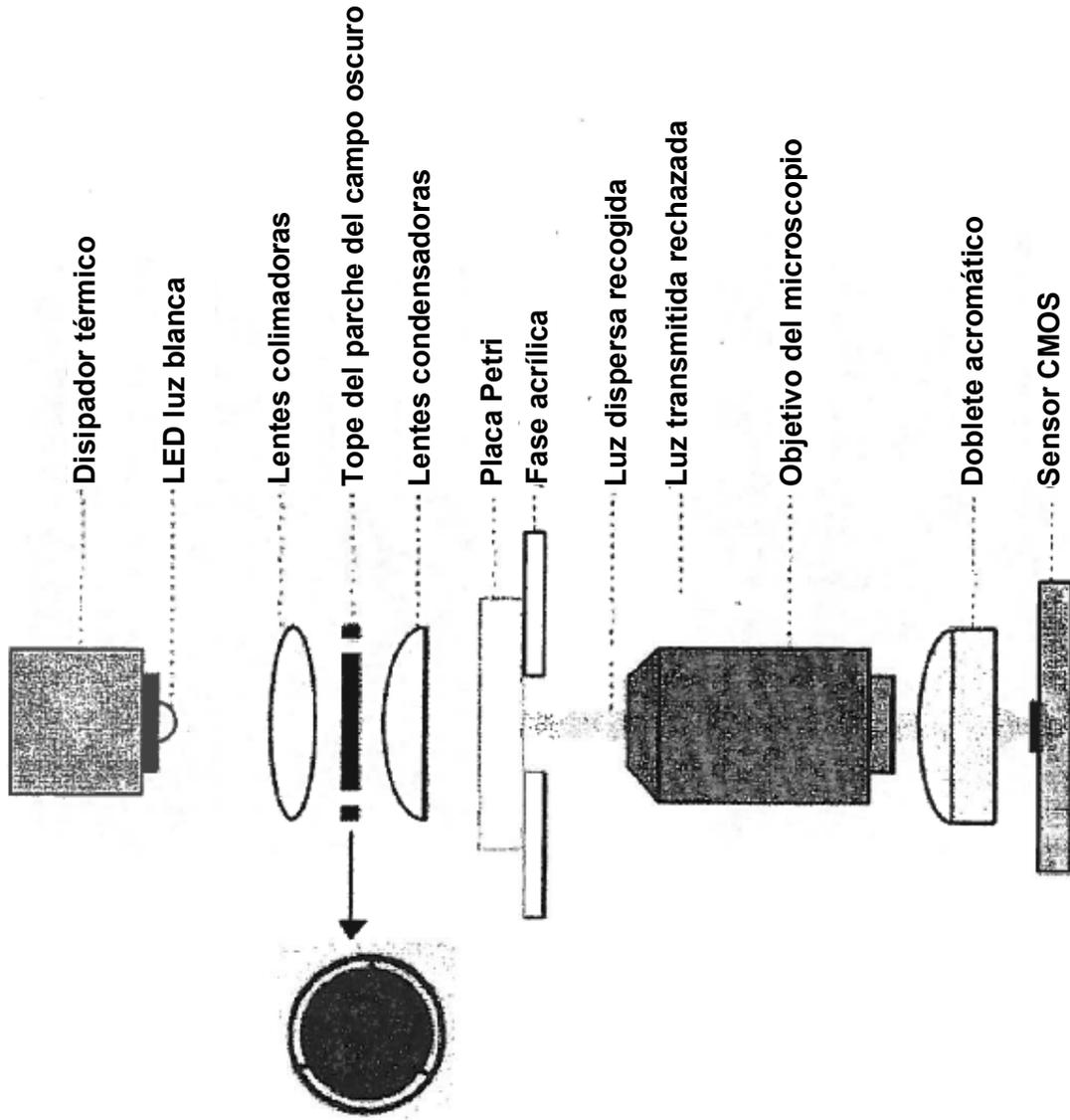
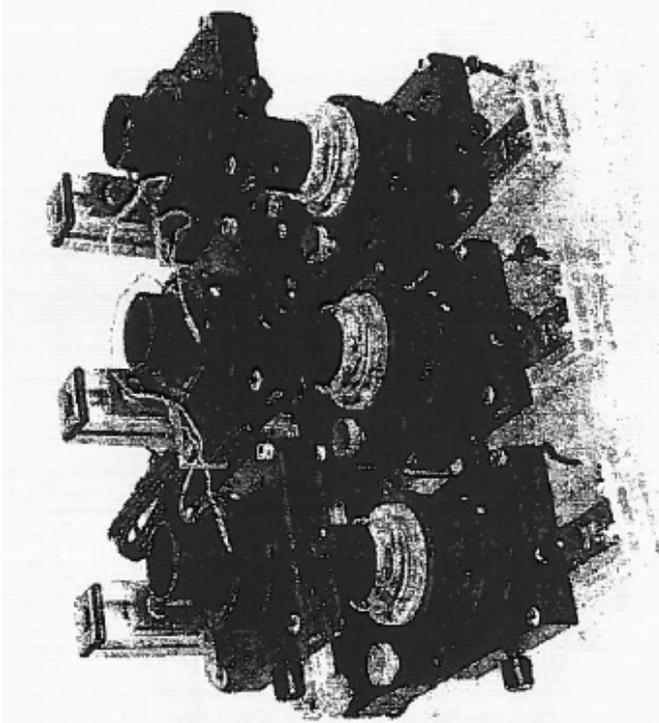
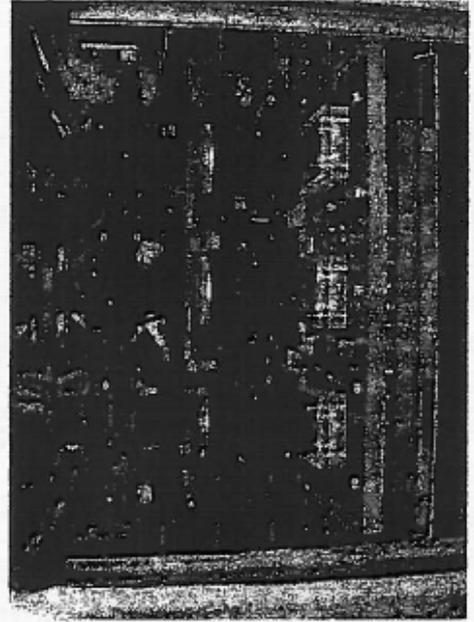


Fig. 22



23A



23B

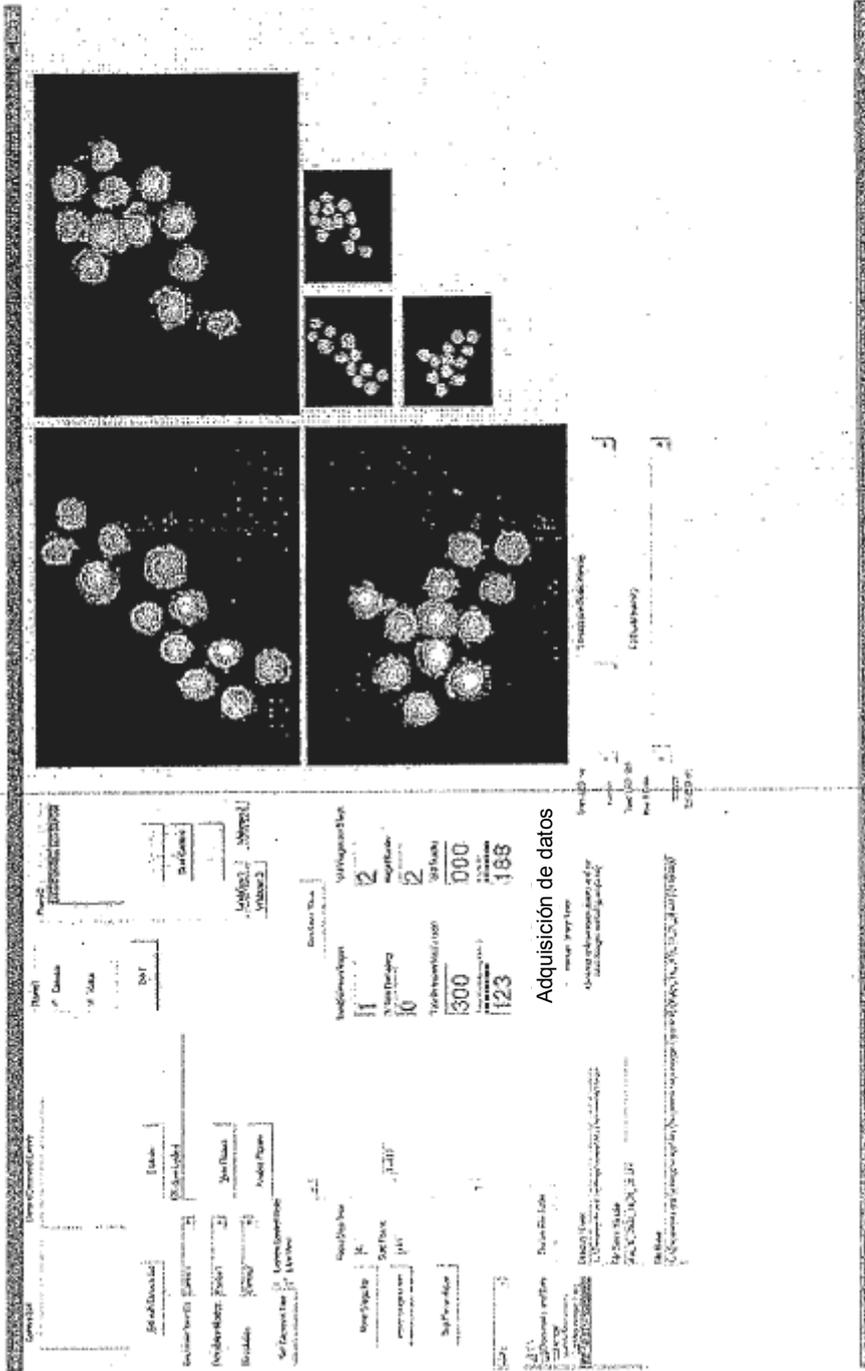
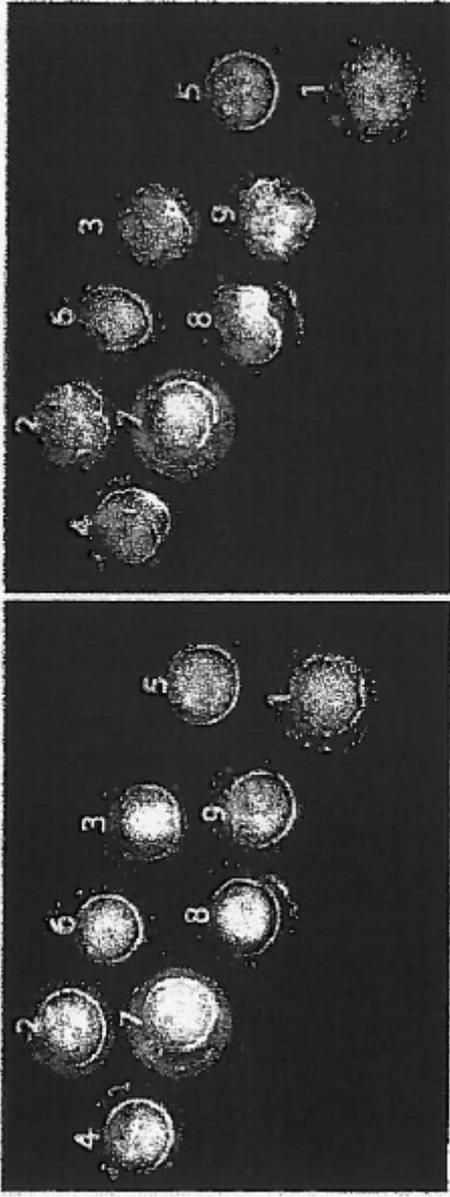
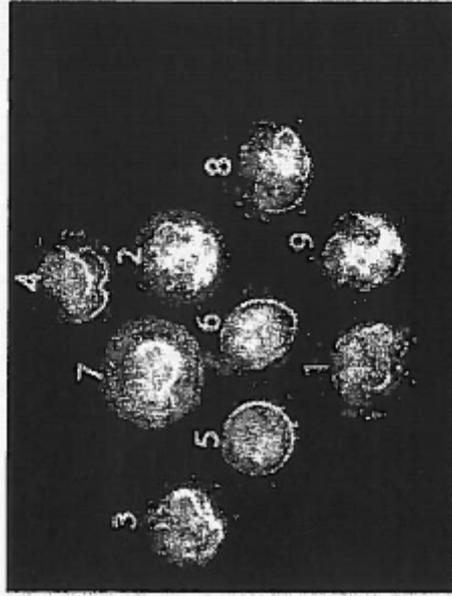


Fig. 24



(a) Experimento 2, Estación 2, Día 1

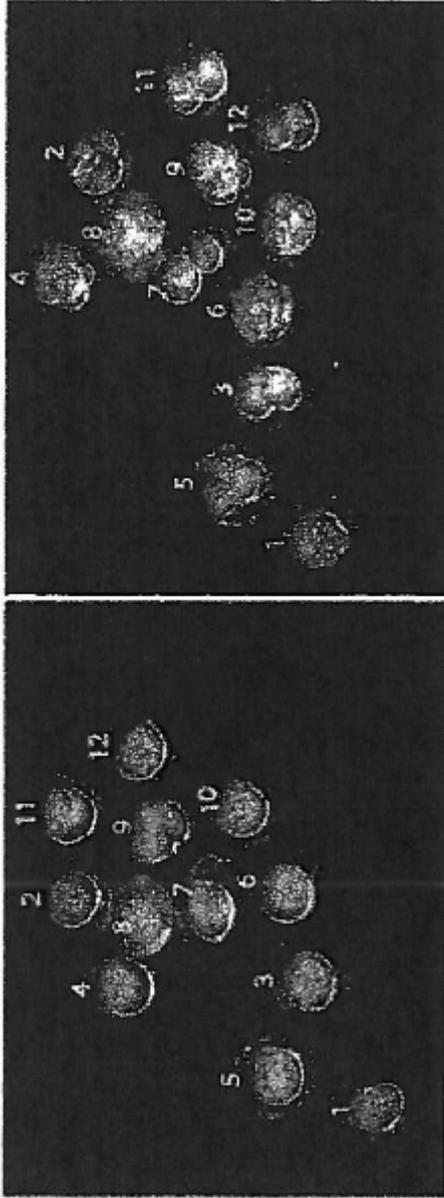
(b) Experimento 2, Estación 2, Día 2,5



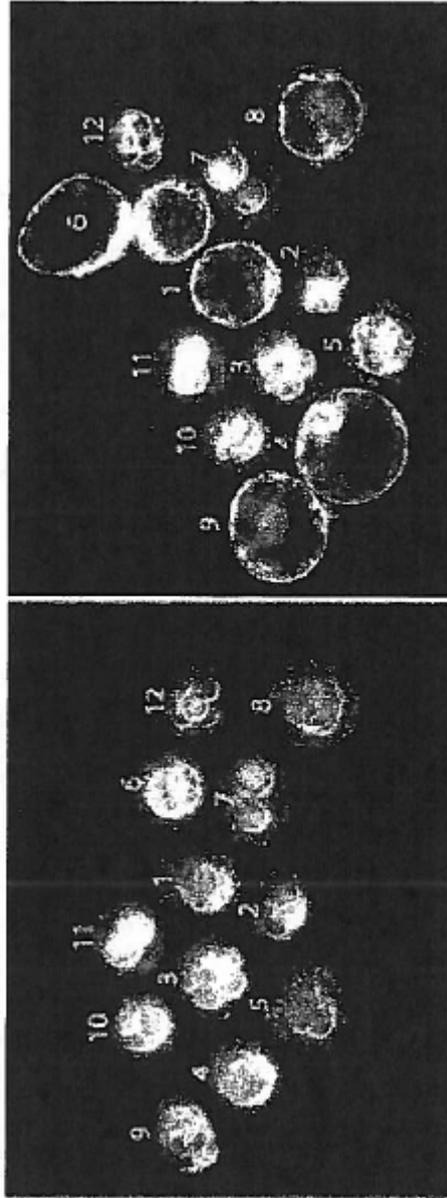
(c) Experimento 2, Estación 2, Día 4

(d) Experimento 2, Estación 2, Día 5,5

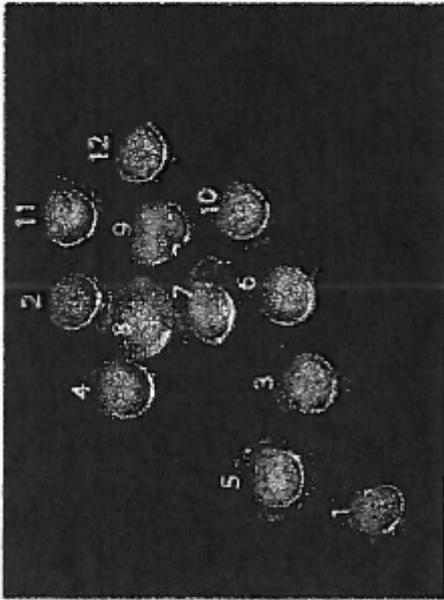
**Fig. 25**



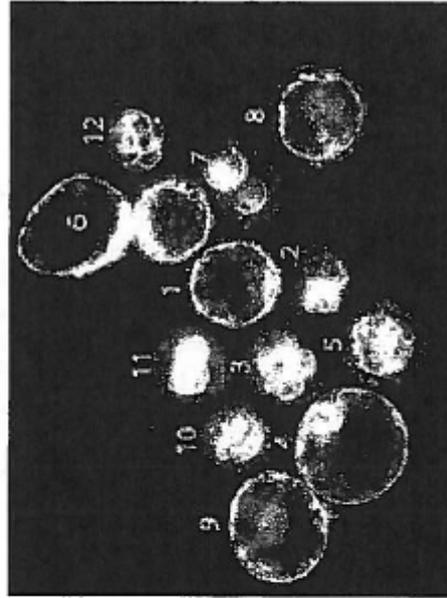
(a) Experimento 1, Estación 2, Día 1



(b) Experimento 1, Estación 2, Día 2,5



(c) Experimento 1, Estación 2, Día 4



(d) Experimento 1, Estación 2, Día 5,5

**Fig. 26**

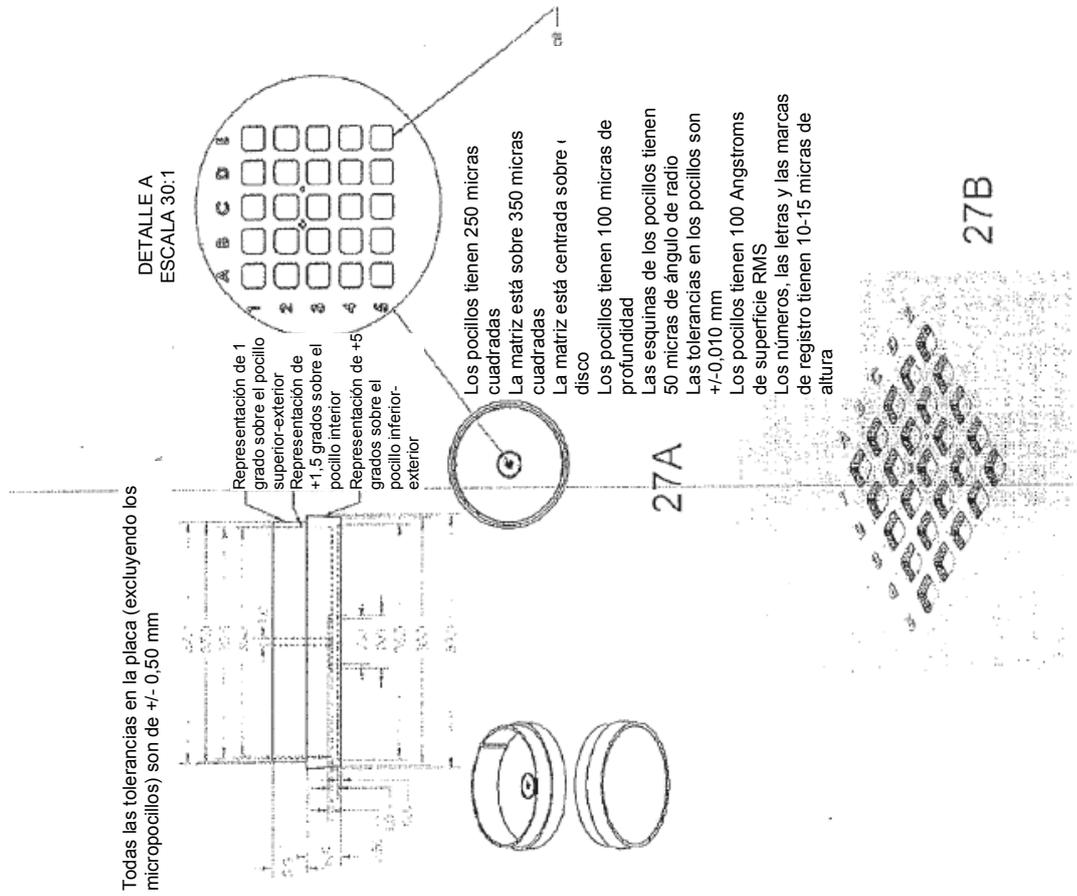
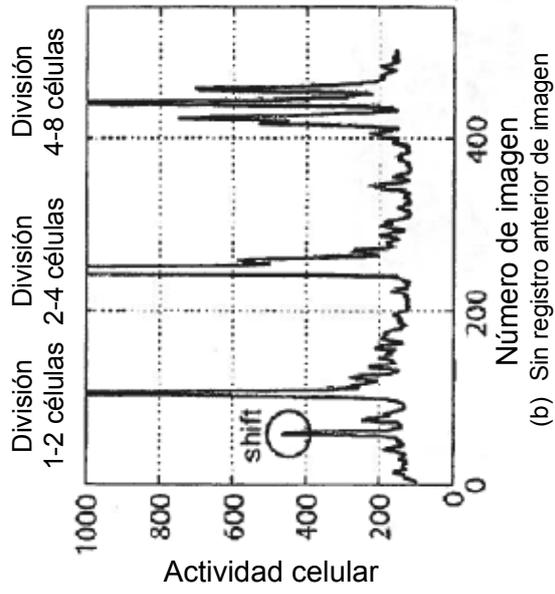
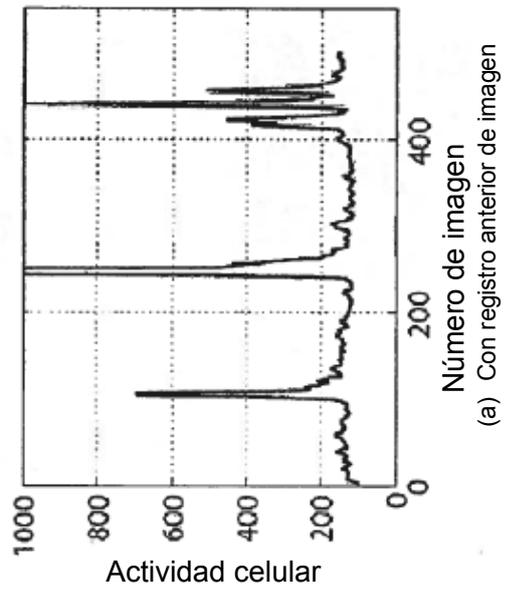


Fig. 27

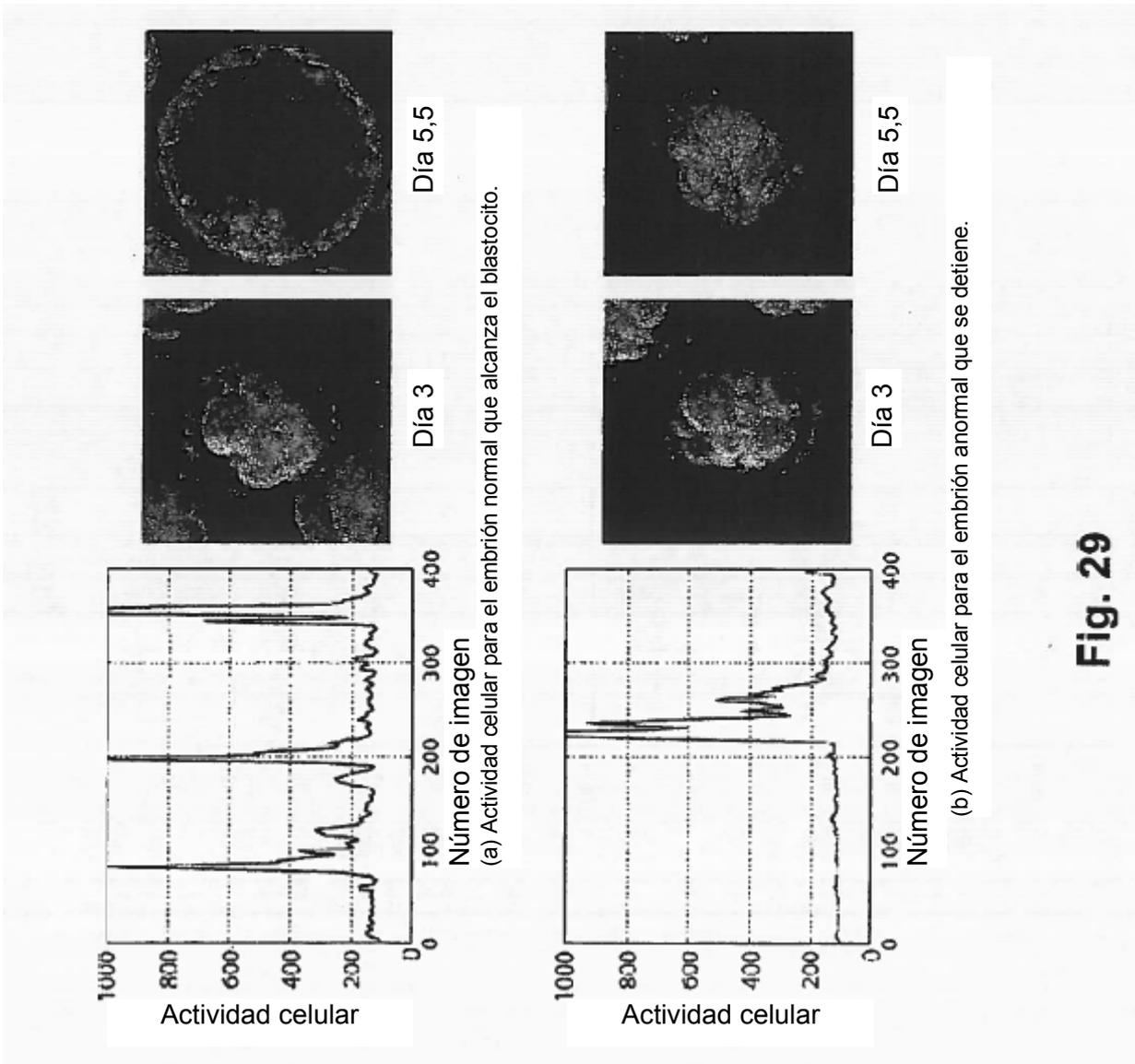


(b) Sin registro anterior de imagen



(a) Con registro anterior de imagen

**Fig. 28**



**Fig. 29**

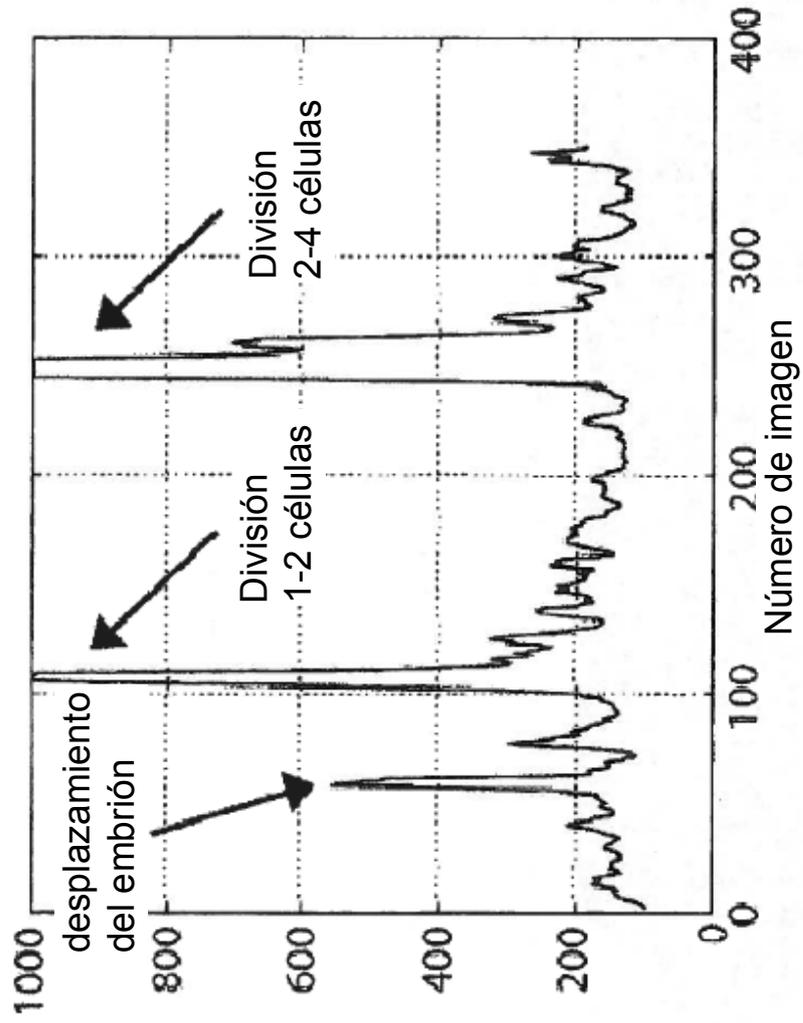
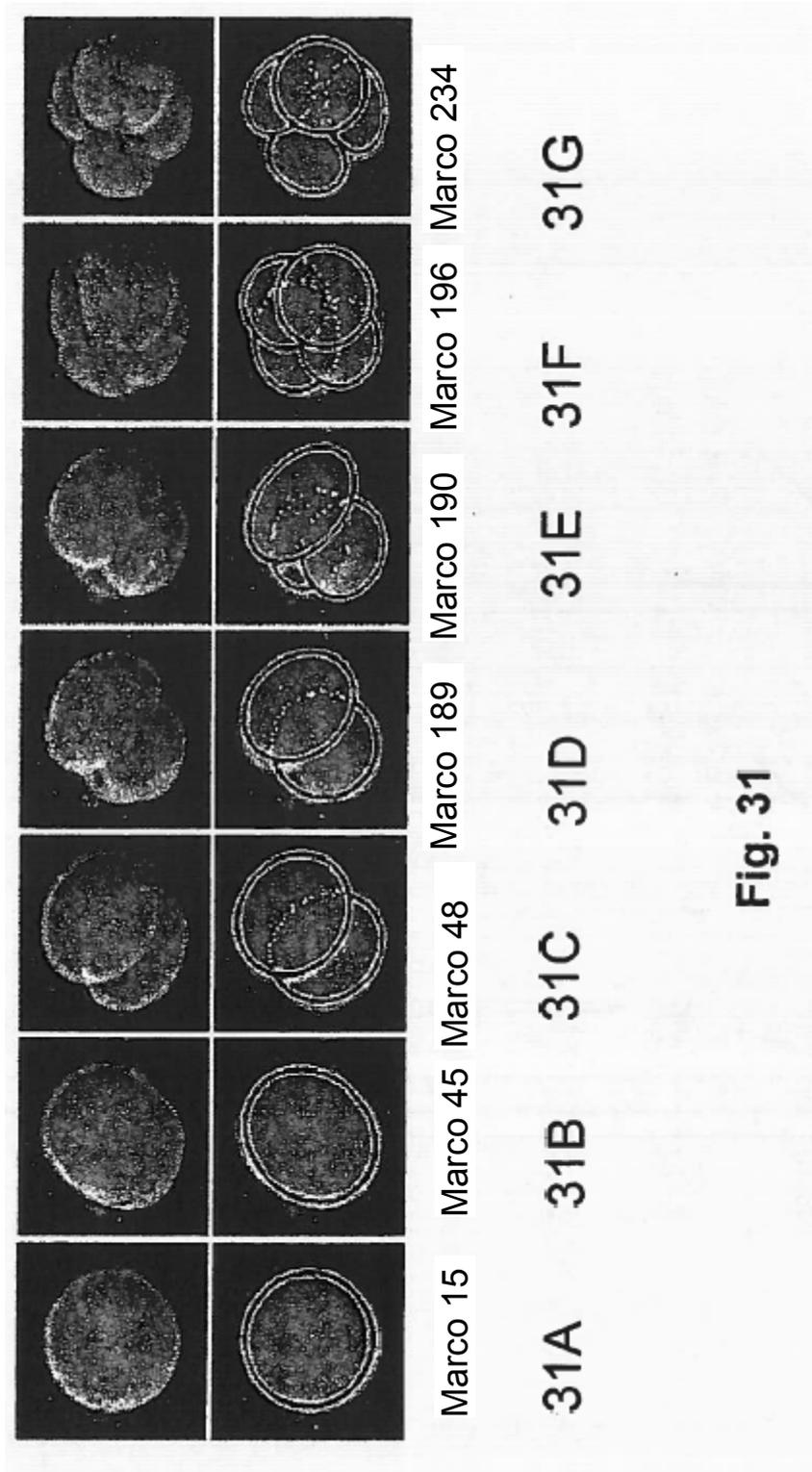
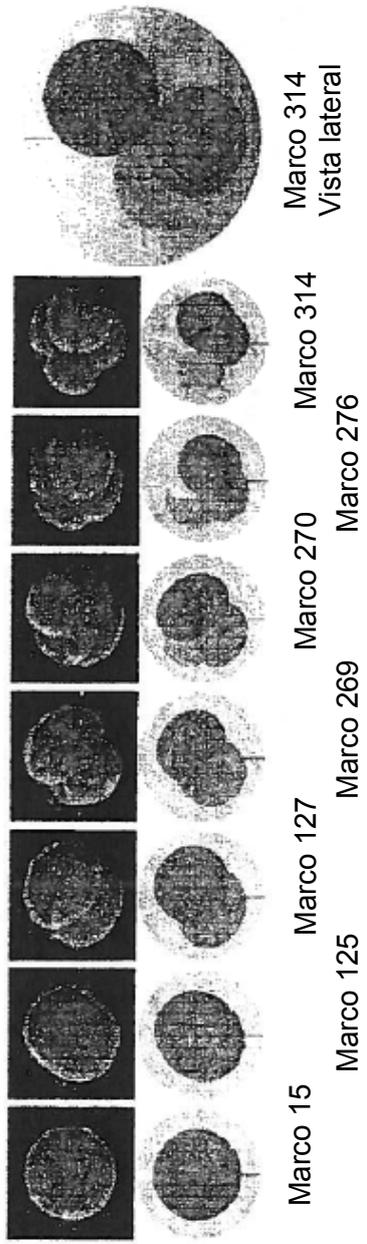
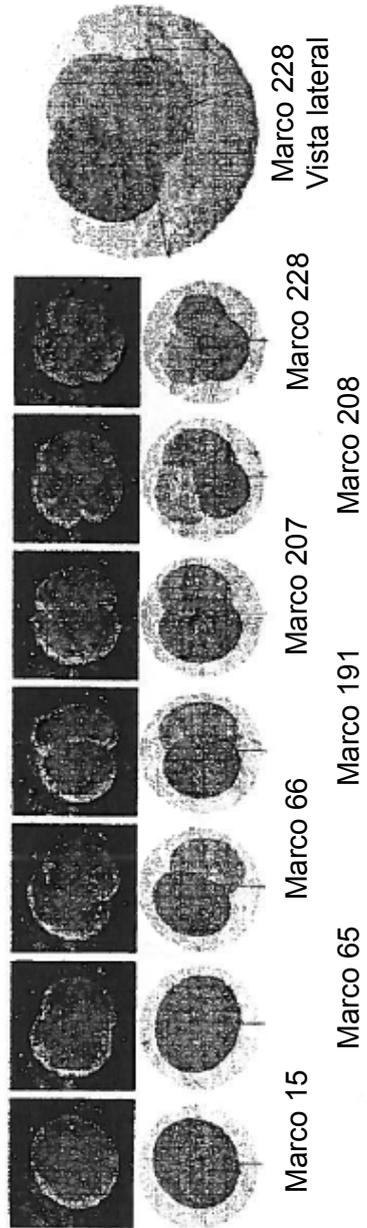


Fig. 30





31A



32B

Fig. 32

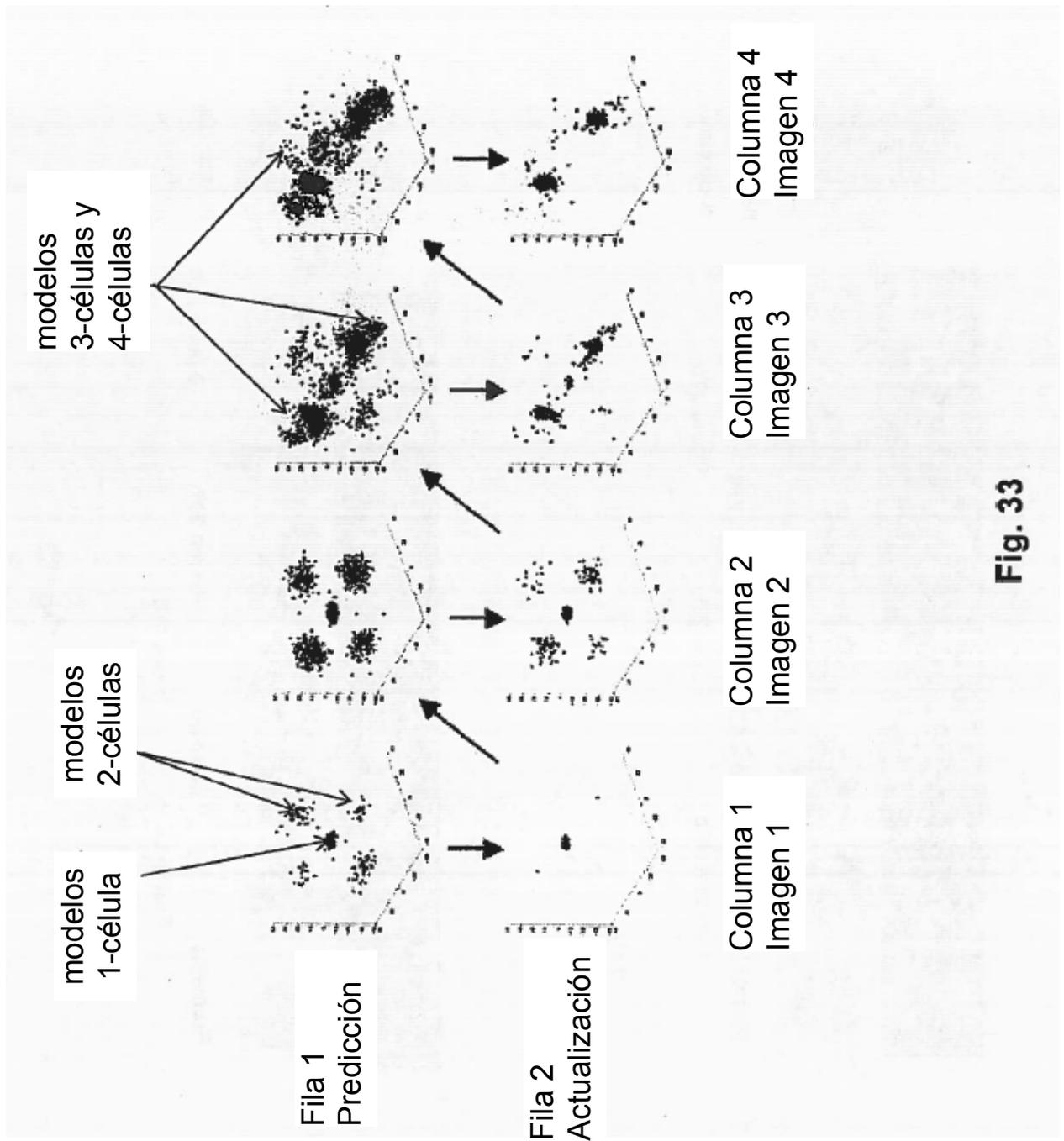
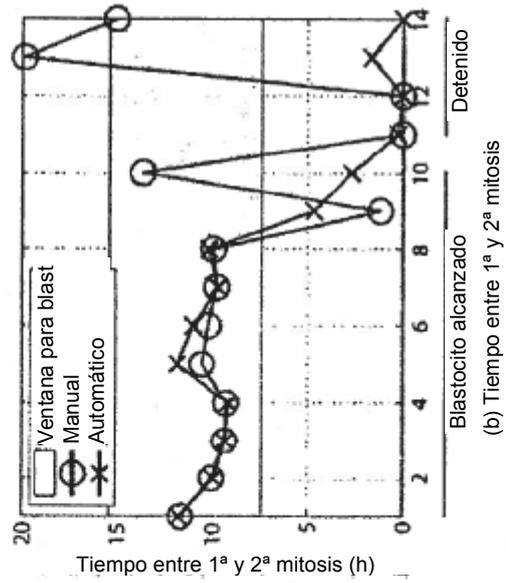
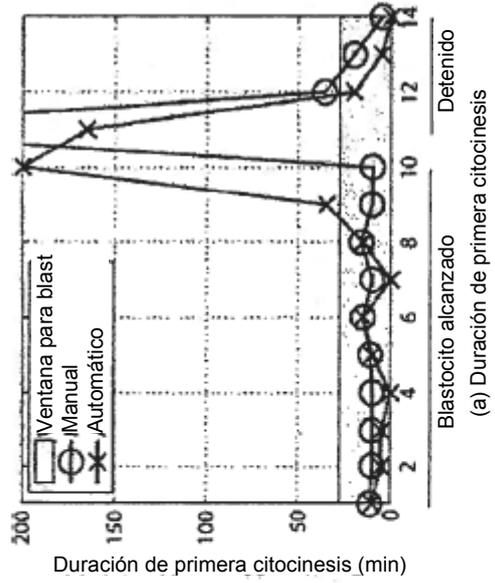


Fig. 33



34A

34B

Fig. 34

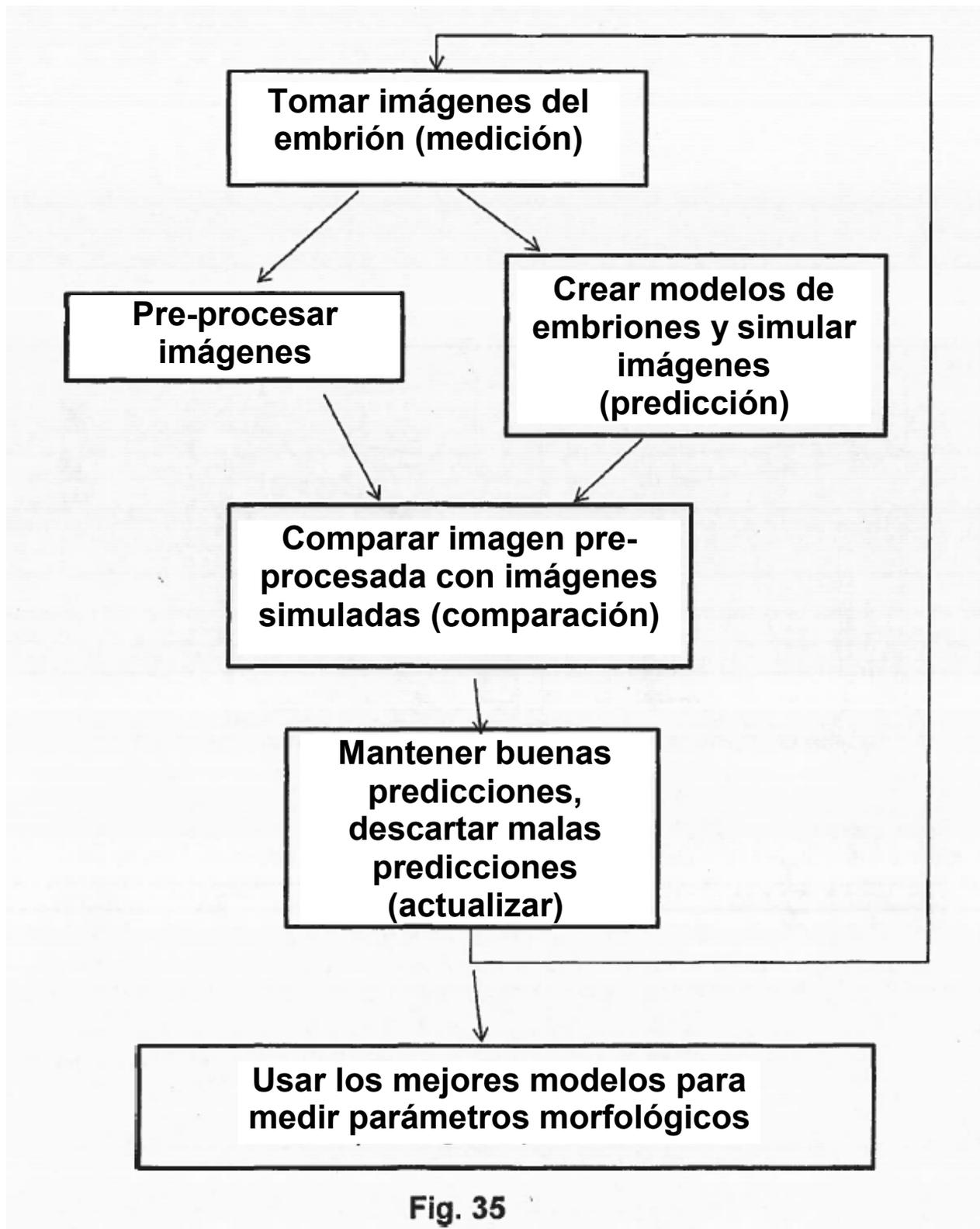


Fig. 35

Figura 36A

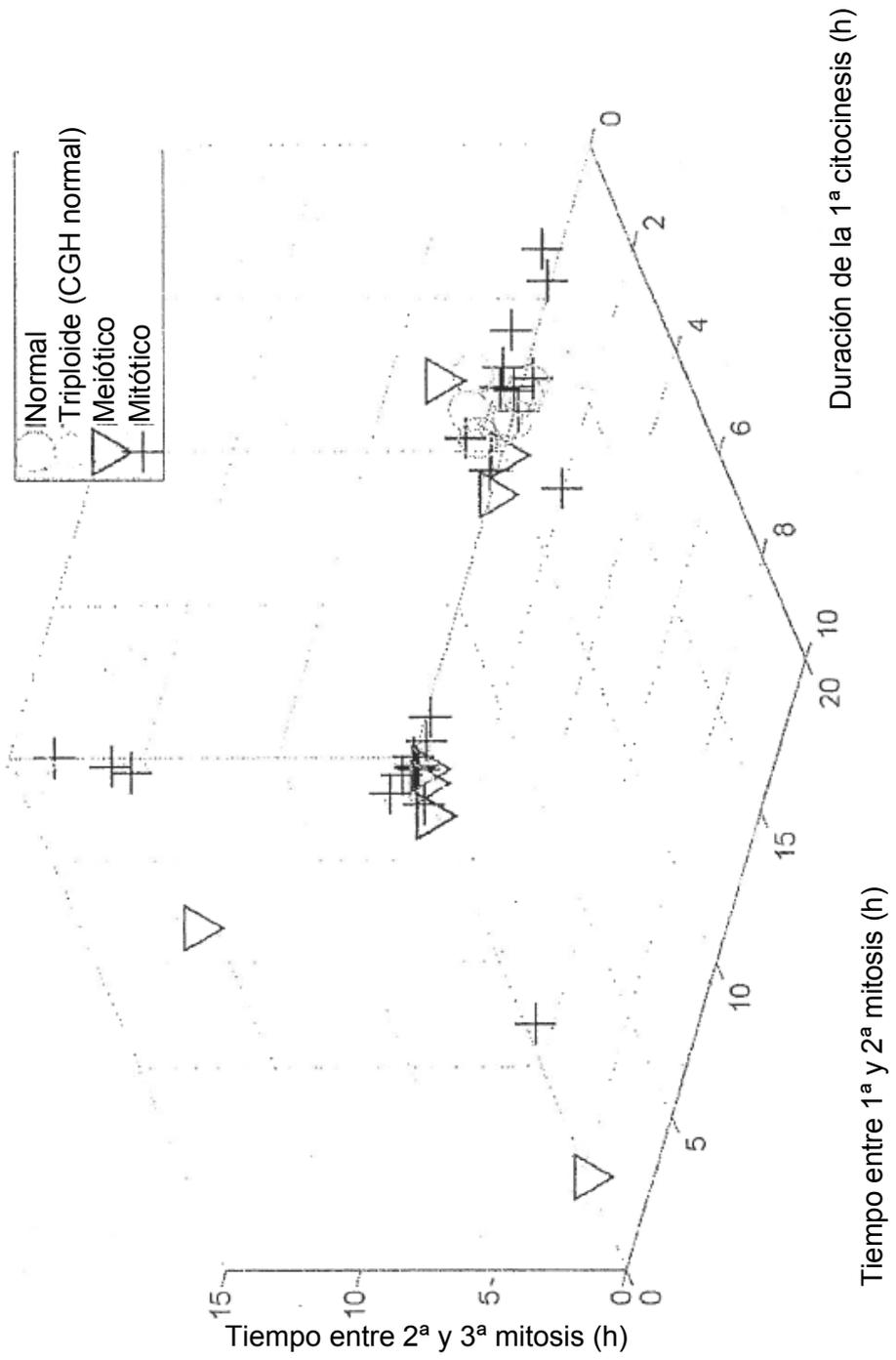


Figura 36B

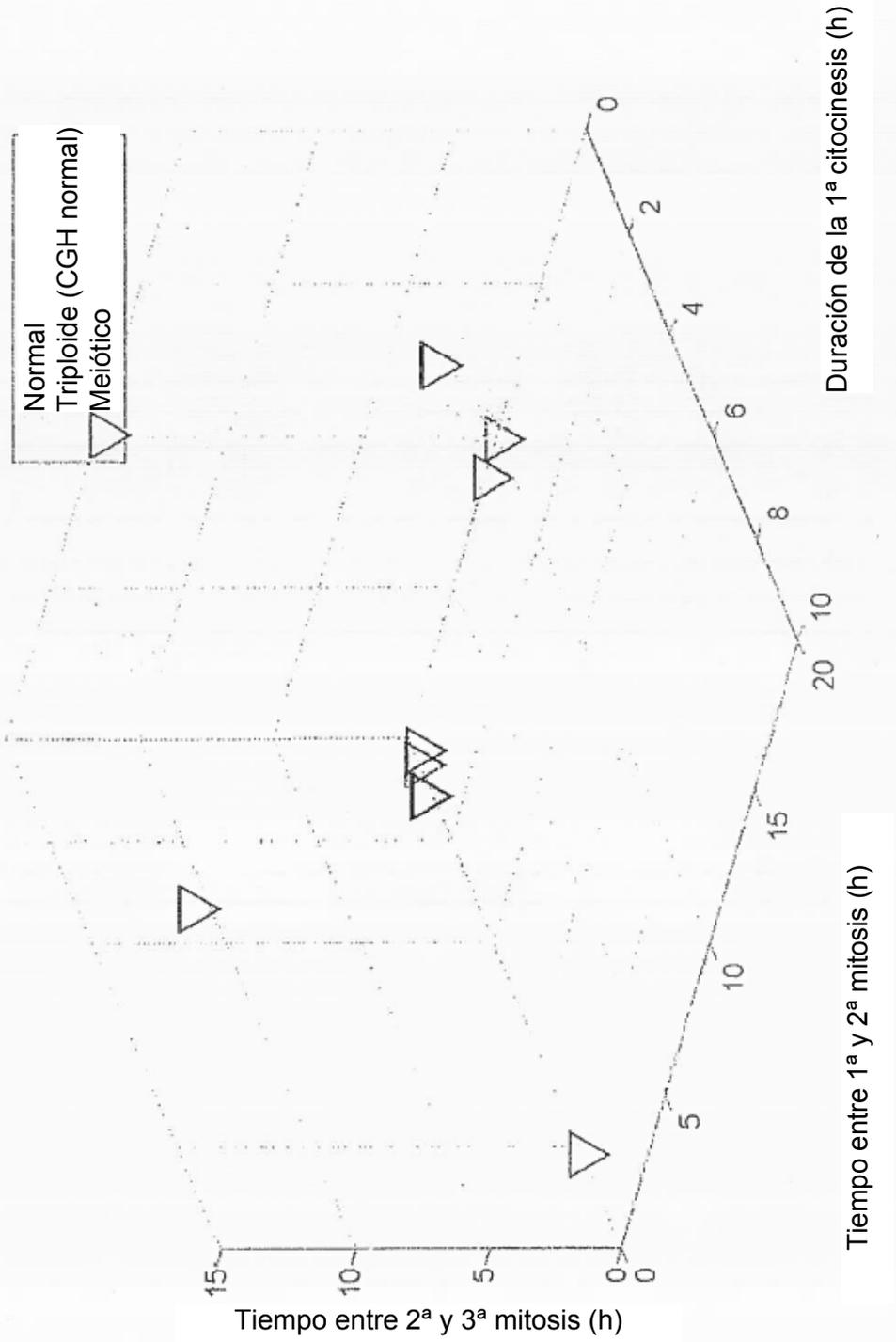




Figura 37A

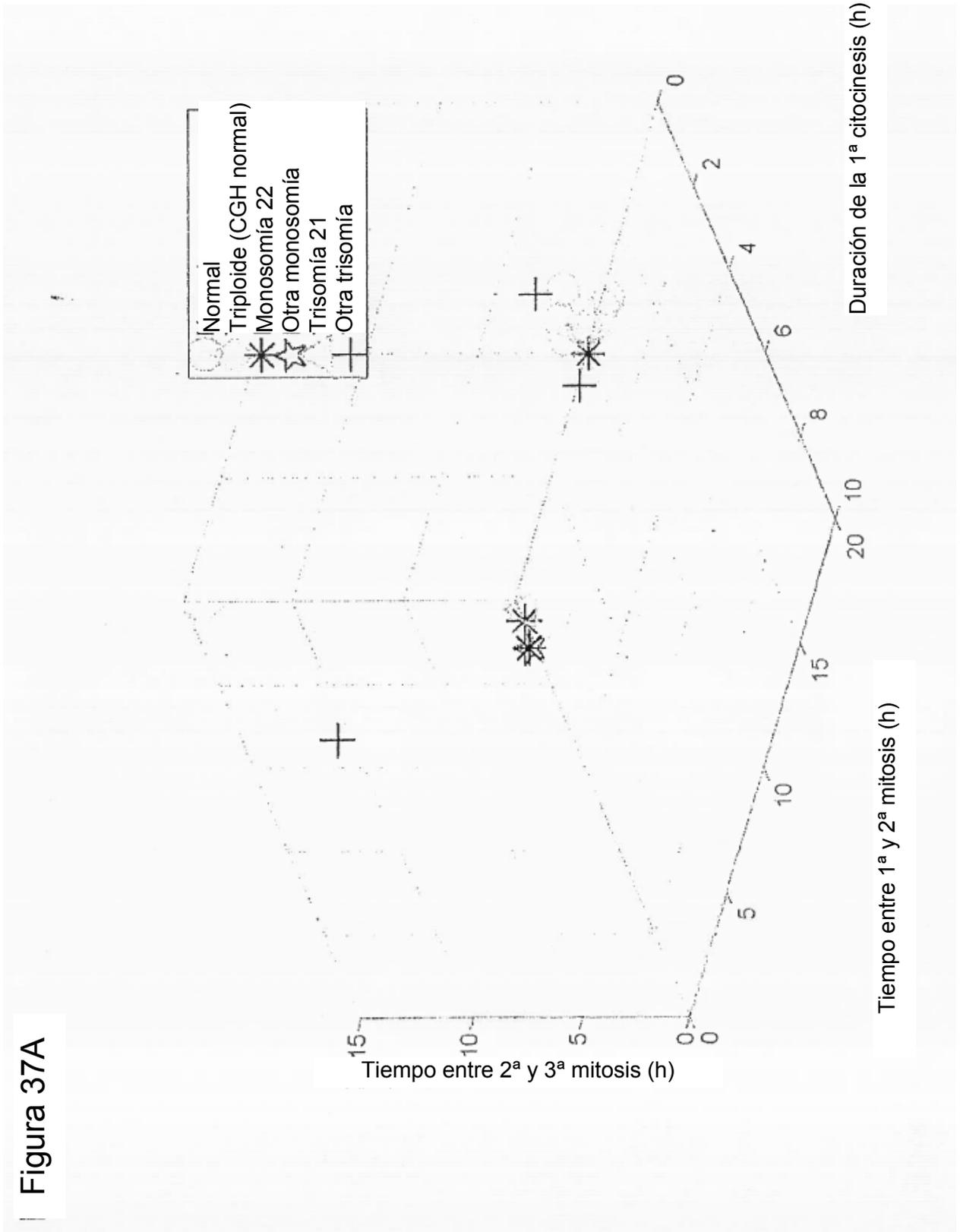


Figura 37B

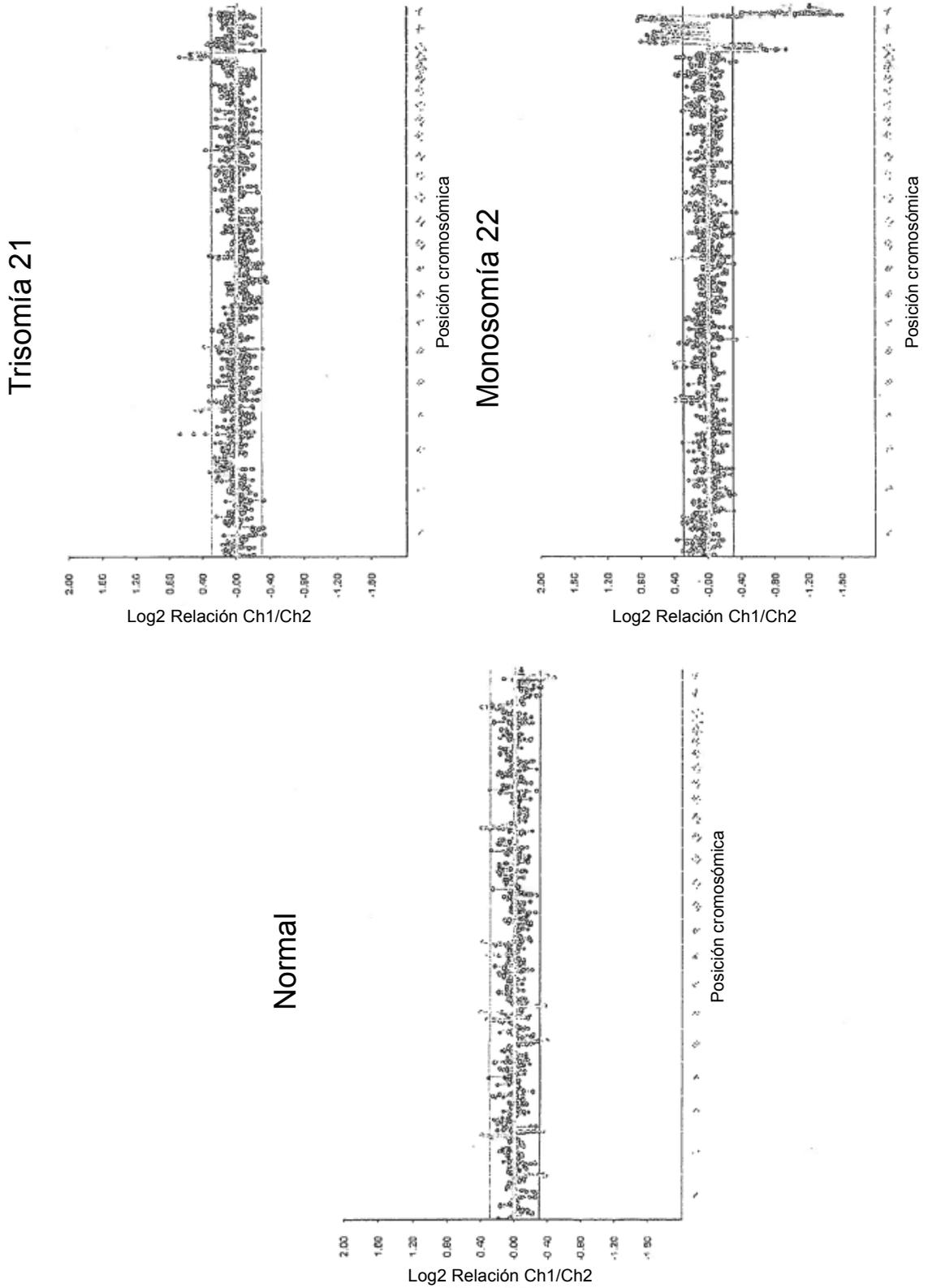


Figura 38A

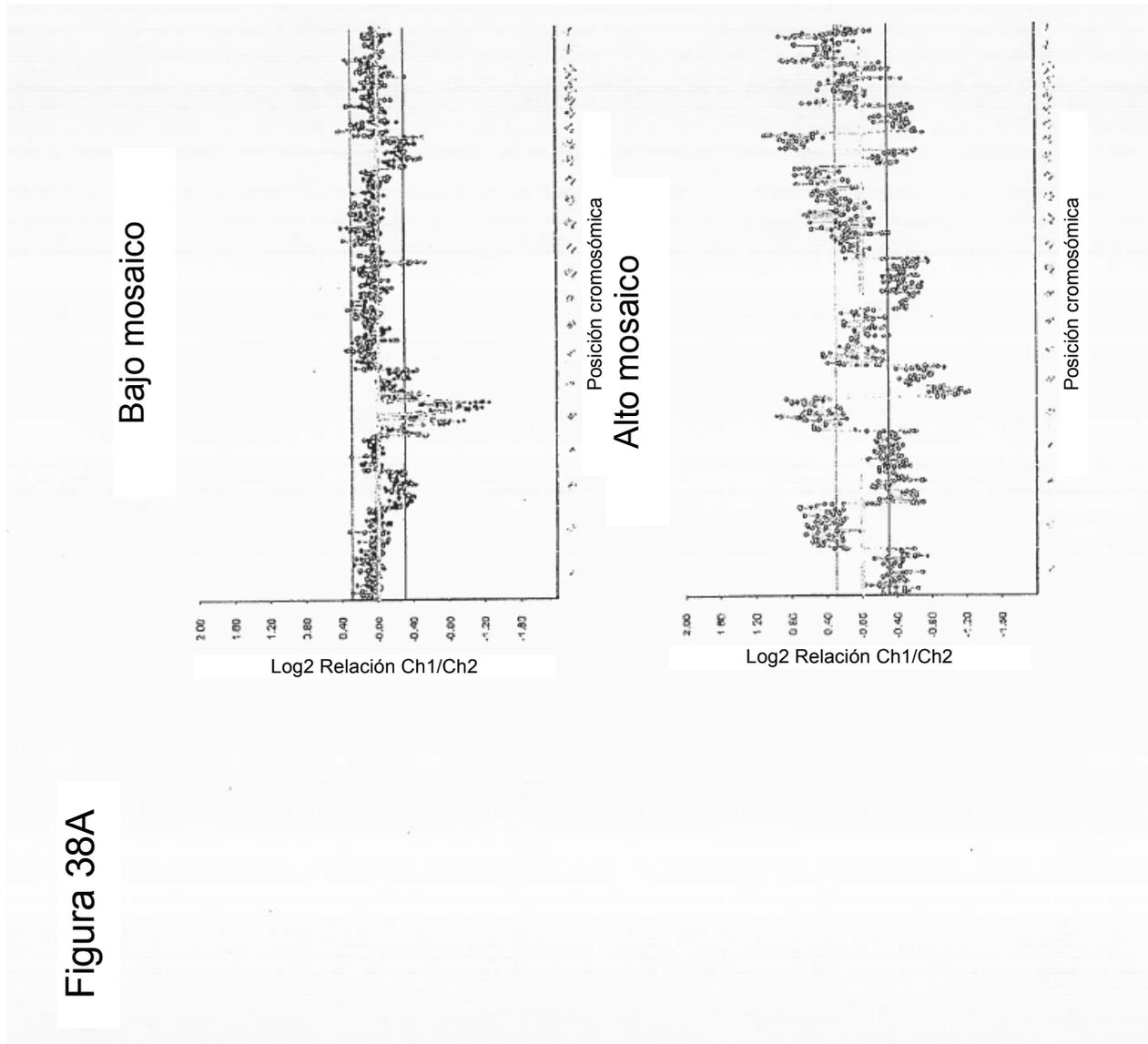


Figura 38B

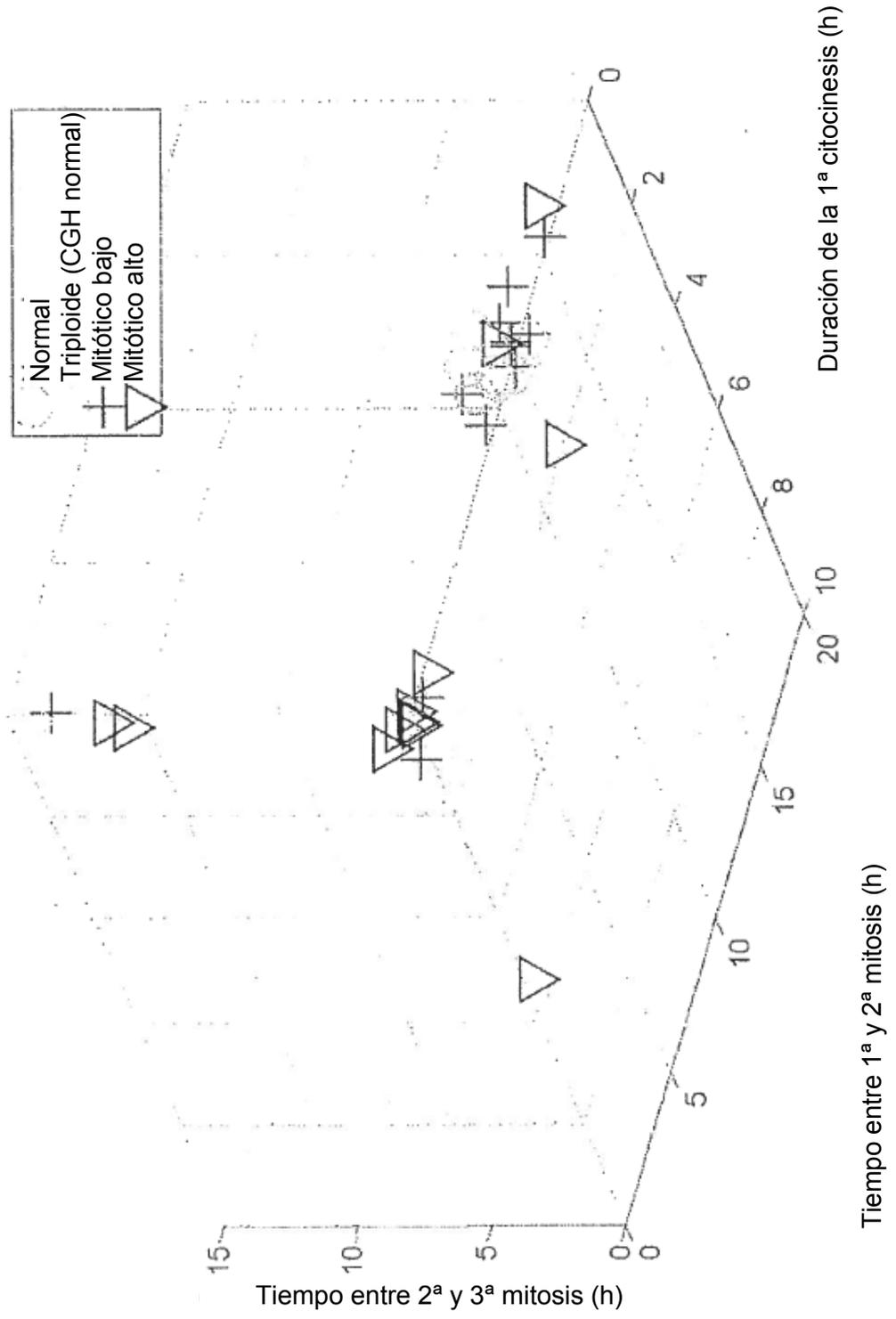


Figura 39

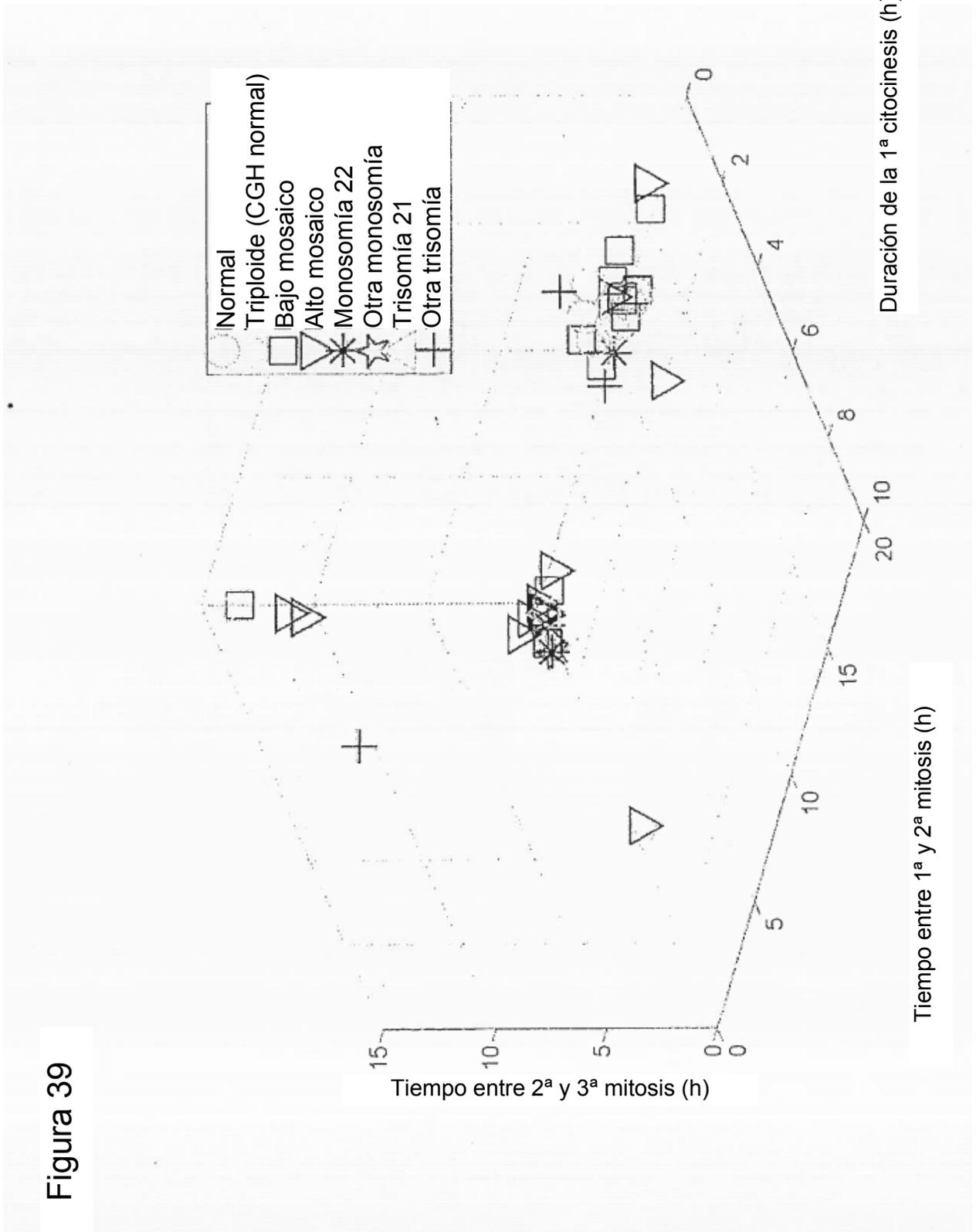


Figura 40

Tabla 3

Mediciones de parámetros	CGH normal	Error meiótico	Error mitótico
Duración de la 1ª citocinesis (h)	14,4±4,2 min	117,2±166,5 min	36,0±66,9 min
Tiempo entre la primera y la segunda mitosis	11,8±0,71 horas	4,0±5,2 horas	6,4±6,6 horas
Tiempo entre la segunda y la tercera mitosis	0,96±0,84 horas	2,0±4,3 horas	2,0±3,9 horas



Figura 41B

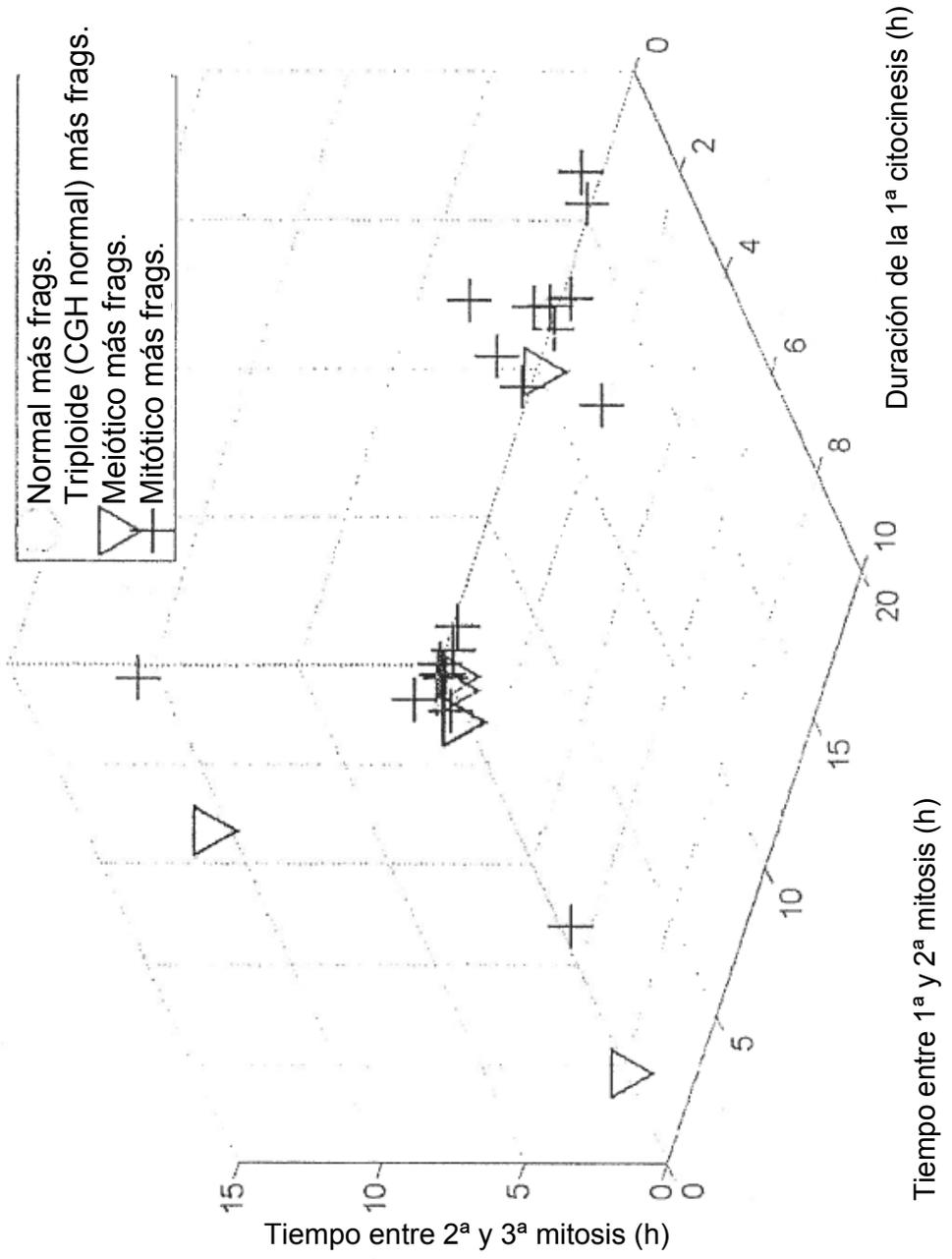


Figura 41C

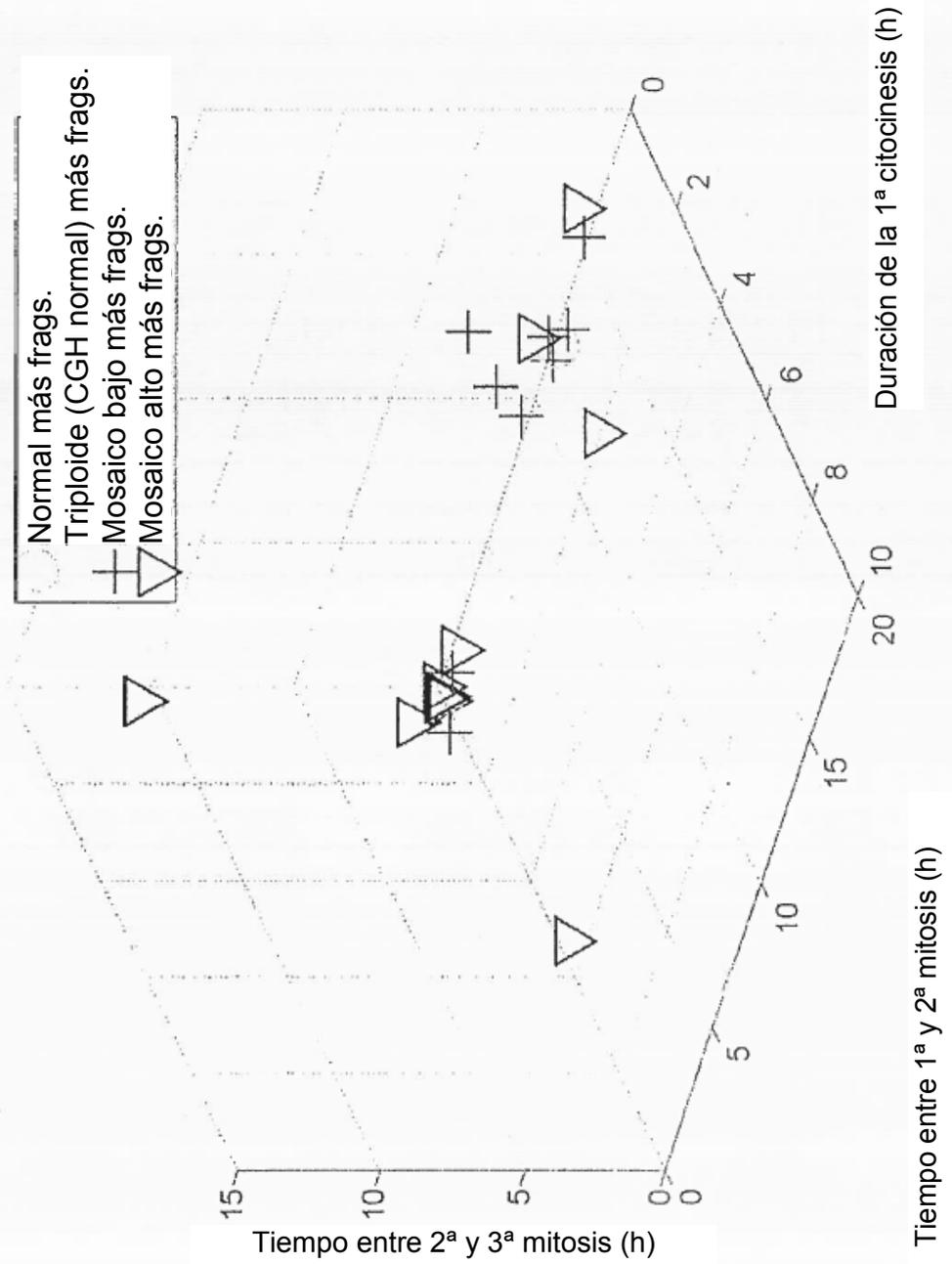


Figura 41D

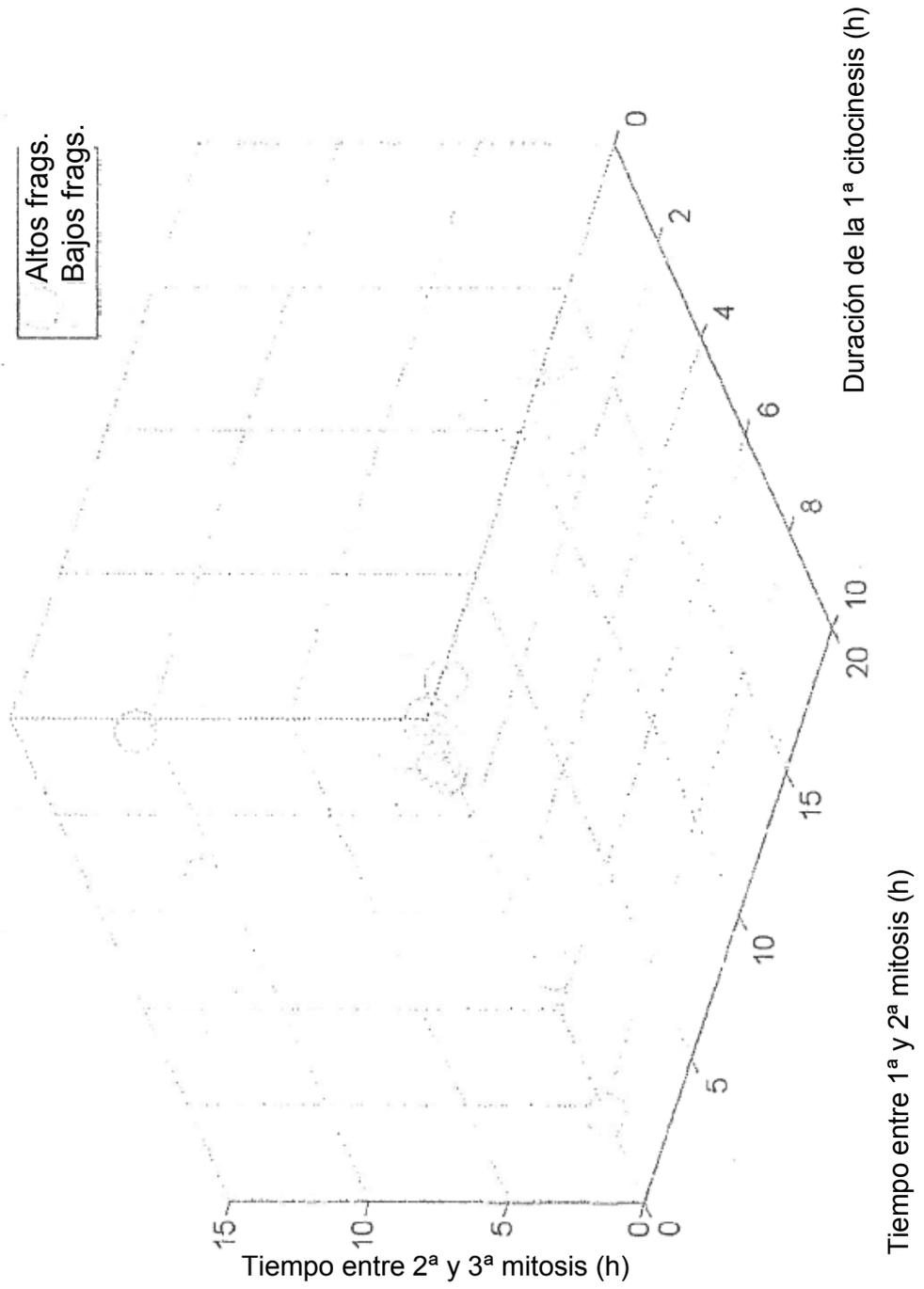
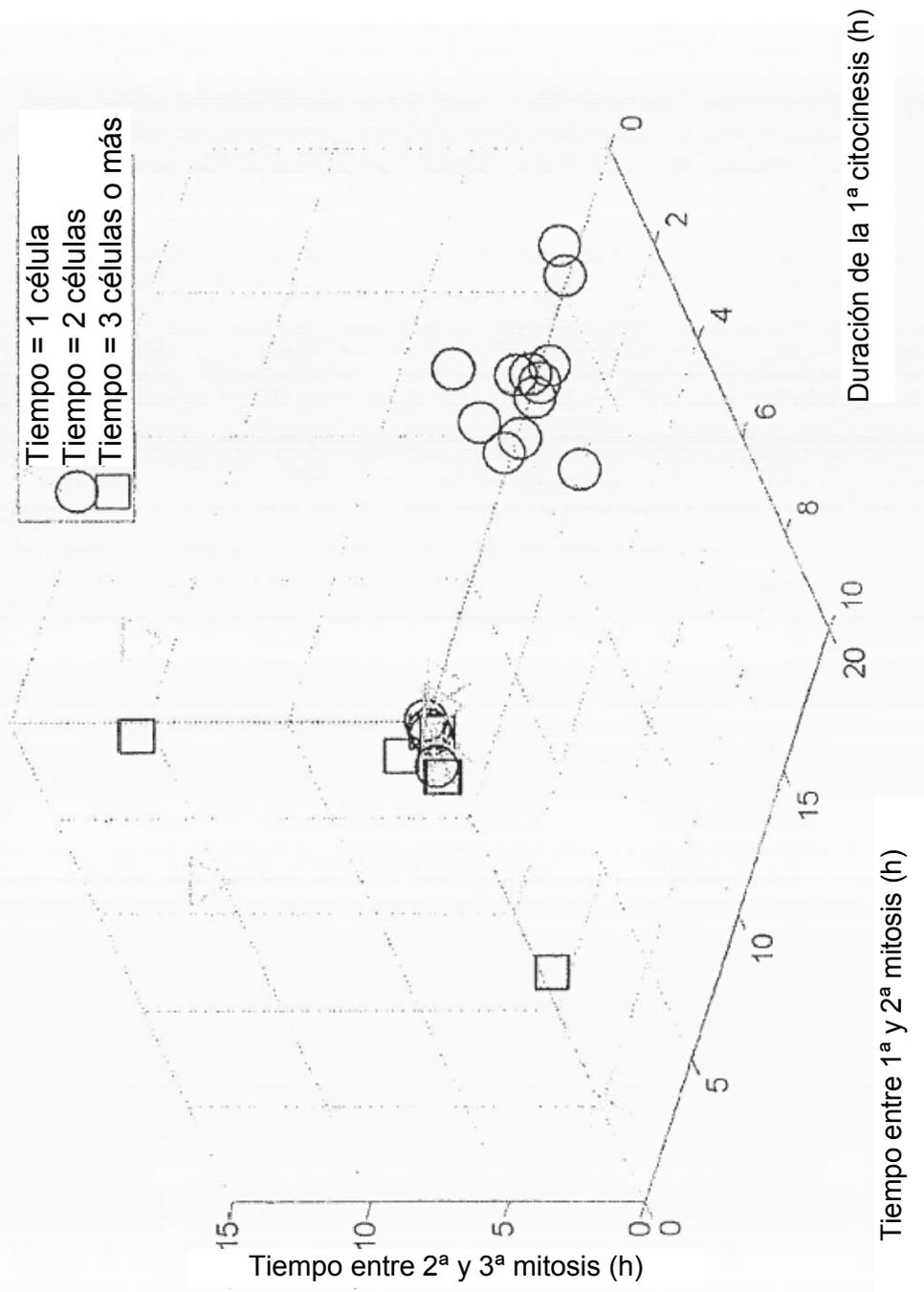


Figura 41E



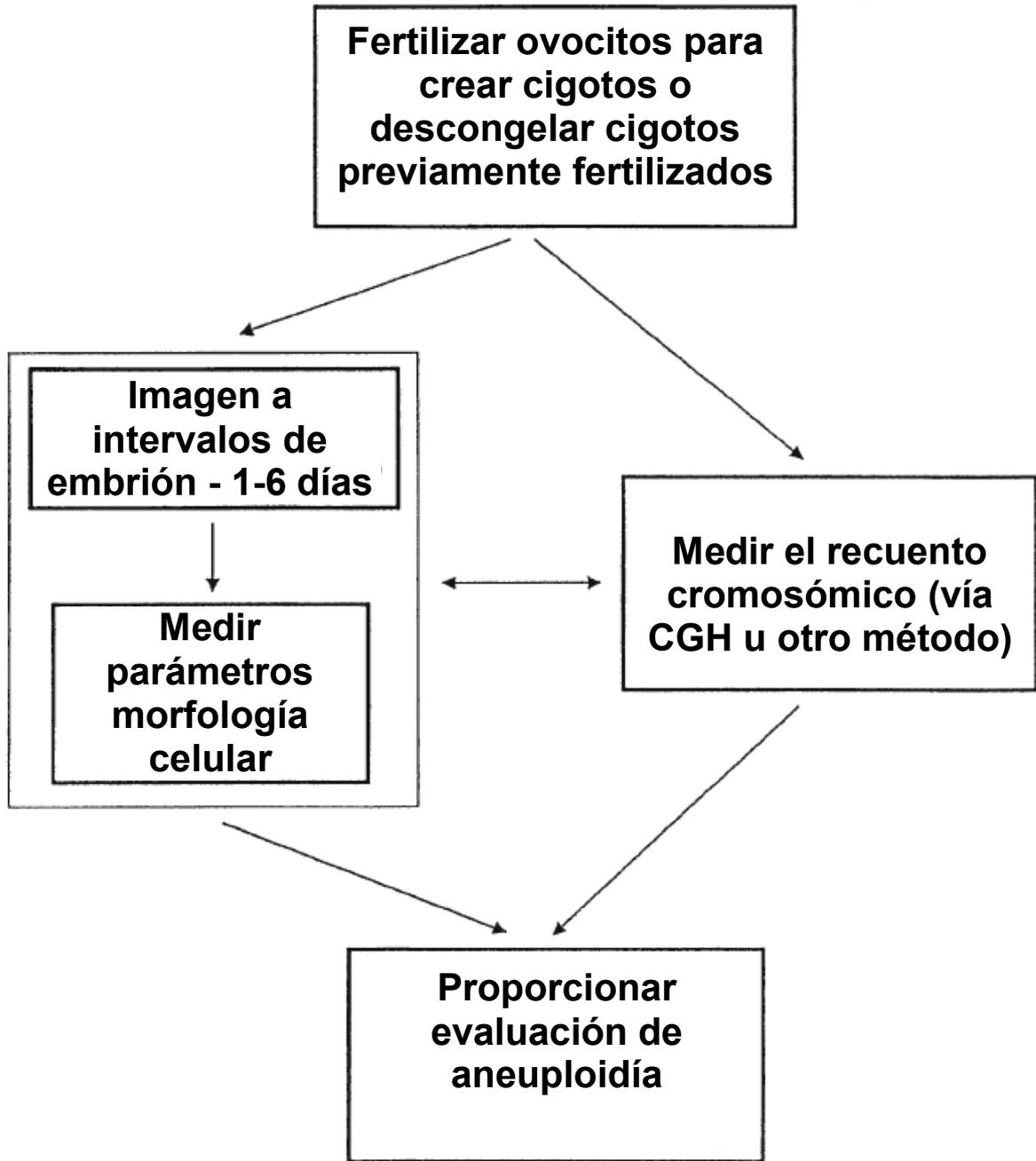


Fig. 42

Figura 43

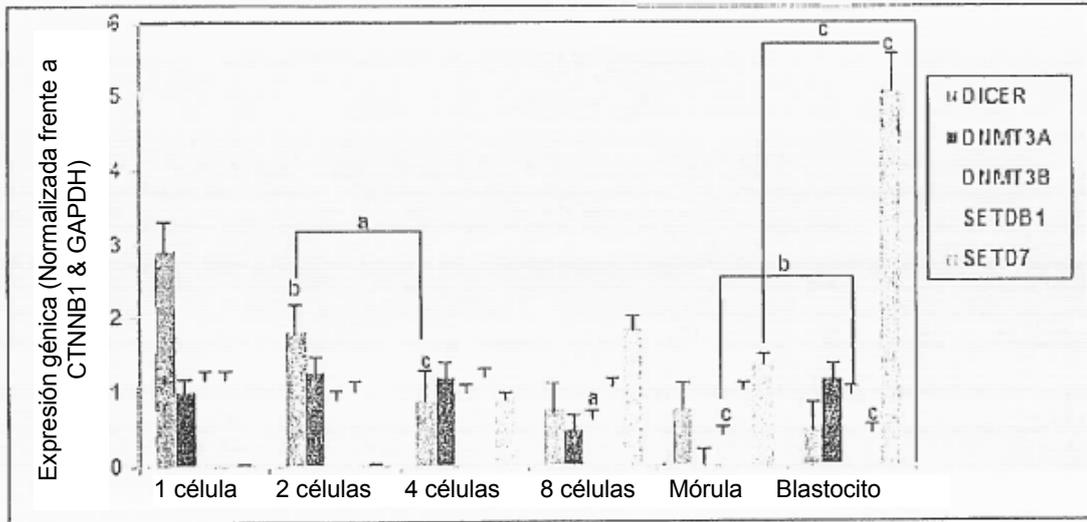


Figura 44

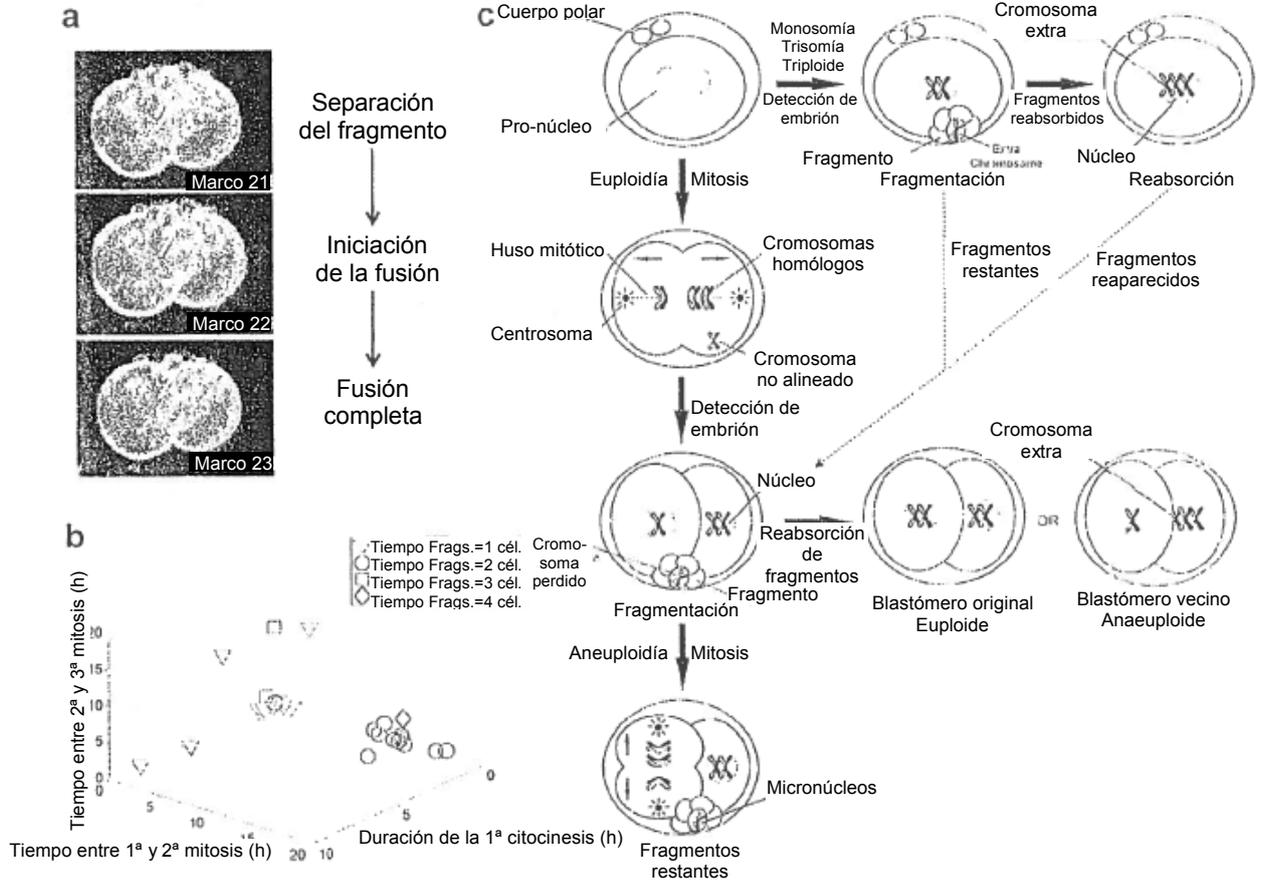


Figura 45

