

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 717 478**

51 Int. Cl.:

A61B 17/435	(2006.01) G06T 7/60	(2007.01)
C12M 1/00	(2006.01)	
C12M 1/36	(2006.01)	
C12M 3/00	(2006.01)	
C12N 5/073	(2010.01)	
C12Q 1/02	(2006.01)	
G01N 21/75	(2006.01)	
G01N 33/50	(2006.01)	
G06K 9/00	(2006.01)	
G06T 7/00	(2007.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.05.2013 PCT/US2013/043639**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **05.12.2013 WO13181549**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.05.2013 E 13796744 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2018 EP 2855694**

54 Título: **Métodos de predicción de blastocistos embrionarios in vitro**

30 Prioridad:

31.05.2012 US 201261653962 P
12.07.2012 US 201261671060 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.06.2019

73 Titular/es:

ARES TRADING S.A. (100.0%)
Zone Industrielle de l'Ourietaz
1170 Aubonne, CH

72 Inventor/es:

CHEN KIM, ALICE A.;
LOEWKE, KEVIN E. y
SURAJ, VAISHALI

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 717 478 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 predicción de blastocistos embrionarios *in vitro*

Campo de la invención

Esta invención se relaciona con el campo de los ensayos biológicos y clínicos, y en particular con la imagen y la evaluación de cigotos/embriones, oocitos y células madre tanto de humanos como de animales.

Antecedentes de la invención

La infertilidad es un problema común de salud que afecta a un 10-15% de parejas en edad reproductiva. Sólo en los Estados Unidos, en el año 2006, se realizaron aproximadamente 140.000 ciclos de fertilización *in vitro* (FIV) (cdc.gov/art). Esto dio como resultado el cultivo de más de un millón de embriones anualmente con un potencial variable, y frecuentemente mal definido, para implantación y desarrollo a término. El índice de nacimientos vivos, por ciclo, tras FIV, era justo del 29%, mientras que, como media, un 30%> de nacimientos vivos dieron como resultado gestaciones múltiples (cdc.gov/art). Las gestaciones múltiples tienen desenlaces adversos bien documentados tanto para la madre como para los fetos, tales como aborto, nacimiento prematuro y bajo índice de nacimientos. Las causas potenciales para el fracaso de la FIV son diversas; sin embargo, desde la introducción de la FIV en 1978, uno de los mayores retos ha sido identificar los embriones que son más adecuados para la transferencia y que es más probable que resulten en una gestación a término.

La comprensión en la técnica del desarrollo básico de embriones es limitada, ya que los estudios sobre la biología de los embriones humanos siguen siendo un reto y con frecuencia están exentos de fondos de investigación. Por consiguiente, la mayor parte del conocimiento actual del desarrollo de embriones deriva de estudios de organismos modelo. Sin embargo, aunque los embriones de diferentes especies pasan por estadios de desarrollo similares, la cronología varía según las especies. Estas diferencias, y otras muchas, hacen 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 únicos para el desarrollo de los embriones humanos. Por ejemplo, en ratones, la transcripción embrionaria se activa aproximadamente 12 horas después de la fertilización, concurrentemente con la primera división de escisión, mientras que, en humanos, se produce la activación de los genes embrionarios (AGE) el día 3, alrededor del estadio de 8 células (Bell, C. E. *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, los genes que se modulan en el desarrollo humano precoz son únicos (Dobson, T. *et al.* (2004) *Human Molecular Genetics* 13(14):1461-1470). Más aún, en otras especies, tales como el ratón, más del 85% de los embriones cultivados *in vitro* alcanzan el estadio de blastocisto, uno de los primeros puntos de referencia mayores en el desarrollo de mamíferos, mientras que los embriones humanos cultivados tienen un índice medio de formación de blastocistos de aproximadamente el 30-50%, con una elevada 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 estudios del desarrollo de embriones preimplantación derivan de organismos modelo y son difíciles de relacionar con el desarrollo de embriones humanos (Zemicka-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; Zemicka-Goetz, M. (2006) *Curr. Opin. Genet. Dev.* 16:406-412; Mtango, N. R. *et al.* (2008) *Int. Rev. Cell. Mol. Biol.* 268:223-290).

Tradicionalmente, en las clínicas de FIV, se ha valorado la viabilidad de los embriones humanos mediante simples observaciones morfológicas, tales como la presencia de blastómeros mononucleados de tamaño uniforme y el grado de fragmentación celular (Rijinders PM, Jansen CAM. (1998) *Hum Reprod* 13:2869-73; Milki AA *et al.* (2002) *Fertil Steril* 77:1191-5). Más recientemente, también se han usado métodos adicionales, tales como el cultivo extendido de embriones (hasta el estadio de blastocisto el día 5) y el análisis del estado cromosómico por diagnóstico genético preimplantación (DGP) para valorar la calidad de los embriones (Milki A *et al.* (2000) *Fertil Steril* 73:126-9; Fragouli E, (2009) *Fertil Steril Jun* 21 [publicación electrónica previa a la edición impresa]; El-Toukhy T *et al.* (2009) *Hum Reprod* 6:20; Vanneste E *et al.* (2009) *Nat Med* 15:577-83). Sin embargo, también existen riesgos potenciales de estos métodos, en el sentido de que prolongan el período de cultivo y alteran la integridad de los embriones (Manipalviratn S *et al.* (2009) *Fertil Steril* 91:305-15; Mastenbroek S *et al.* (2007) *N Engl J Med.* 357:9-17).

Recientemente, se ha visto que la imagen de lapso temporal puede ser una herramienta útil para observar el desarrollo precoz de embriones. Algunos métodos han utilizado la imagen de lapso temporal para monitorizar el desarrollo de embriones humanos tras la inyección de esperma intracitoplásmica (IEIC) (Nagy *et al.* (1994) *Human Reproduction.* 9(9): 1743-1748; Payne *et al.* (1997) *Human Reproduction.* 12:532-541). Se analizaron la extrusión de cuerpos polares y la formación pronuclear y se correlacionaron con una buena morfología el día 3. Sin embargo, no se correlacionó ningún parámetro con la formación de blastocistos o los resultados de la gestación. Otros métodos han mirado a la aparición 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 de los intervalos de tiempo entre las divisiones tempranas.

Otros métodos han utilizado la imagen de lapso temporal para medir la cronología y el alcance de las divisiones celulares durante el desarrollo precoz de embriones (WO/2007/144001). Sin embargo, estos métodos describen sólo un método básico y general para la imagen de lapso temporal de embriones bovinos, que son sustancialmente diferentes de los embriones humanos en términos de potencial de desarrollo, comportamiento morfológico, programas moleculares y epigenéticos y cronología y parámetros que rodean a la transferencia. Por ejemplo, los embriones bovinos tardan sustancialmente 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 específicos o intervalos de tiempo que pudieran ser predictivos de viabilidad de los embriones humanos.

Más recientemente, se ha usado la imagen de lapso temporal para observar el desarrollo de embriones humanos durante las primeras 24 horas después de la fertilización (Lemmen *et al.* (2008) *Reproductive BioMedicine Online* 17(3):385-391). Se vio que la sincronía de núcleos tras la primera división guardaba correlación con los resultados de la gestación. Sin embargo, este trabajo concluyó que la primera división precoz no era un parámetro predictivo importante, lo que contradice estudios previos (Fenwick *et al.* (2002) *Human Reproduction* 17:407-412; Lundin, *et al.* (2001) *Human Reproduction* 16:2652-2657).

Connie C Wong *et al.*, 'Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage', *Nature Biotechnology*, vol. 28, n° 10, 1 de octubre de 2010, páginas 115-1121, describen estudios del desarrollo de embriones humanos preimplantación que correlacionan el análisis de imagen de lapso temporal y el perfil de expresión génica.

Meseguer *et al.*, 'The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation', *Human Reproduction*, vol. 26, n° 10, 9 de agosto de 2011, páginas 2658-2671, describen estudios cuyo objetivo es identificar los parámetros morfocinéticos específicos para embriones que eran capaces de implantarse. US7963906 describe métodos, composiciones y kits para determinar el potencial de desarrollo y/o la presencia de anomalías cromosómicas de uno o más embriones o células pluripotentes.

Compendio de la invención

La invención es como se reivindica en las reivindicaciones. Se proporcionan métodos, composiciones y kits para determinar la probabilidad de que uno o más embriones o células pluripotentes en uno o más embriones alcancen el estadio de blastocisto y/o el estadio de blastocisto utilizable. Estos métodos, composiciones y kits hallan uso en la identificación de embriones y oocitos *in vitro* que tienen una probabilidad de alcanzar el estadio de blastocisto y/o el estadio de blastocisto utilizable, es decir, la habilidad o capacidad de desarrollarse en un blastocisto, los cuales son, por lo tanto, útiles en métodos de tratamiento de la infertilidad en humanos, y similares.

En algunos aspectos aquí descritos, se proporcionan métodos para determinar la probabilidad de que un embrión o una célula pluripotente alcance el estadio de blastocisto y/o el estadio de blastocisto utilizable. En algunos aspectos, se determina la probabilidad de alcanzar el estadio de blastocisto y/o el estadio de blastocisto utilizable seleccionando con una elevada especificidad uno o más embriones humanos que no es probable que alcancen el estadio de blastocisto, donde al menos aproximadamente un 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o más o un 100% de los embriones humanos no seleccionados no es probable que alcancen el estadio de blastocisto y/o el estadio de blastocisto utilizable. En dichos aspectos, se miden los parámetros celulares de un embrión o una célula pluripotente para llegar a una medición de parámetros celulares. Se emplea entonces el parámetro celular para obtener una determinación de la probabilidad de que el embrión o la célula pluripotente alcance el estadio de blastocisto y/o el estadio de blastocisto utilizable, pudiéndose usar dicha determinación para dirigir un curso clínico de acción. En algunas realizaciones, el parámetro celular es un suceso morfológico que se puede medir por microscopía de lapso temporal. En algunas realizaciones, p. ej., cuando se estudia un embrión, los uno o más parámetros celulares son: la duración de un suceso de citocinesis, p. ej., 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 algunas realizaciones, el parámetro celular es un suceso morfológico que se puede medir por microscopía de lapso temporal. En algunas realizaciones, p. ej., cuando se estudia un embrión, los uno o más parámetros celulares son: la duración de un suceso de citocinesis, p. ej., el intervalo de tiempo entre el ciclo celular mitótico 1 y el ciclo celular mitótico 2, y el intervalo de tiempo entre el ciclo celular mitótico 2 y el ciclo celular mitótico 3. En ciertas realizaciones, también se utiliza la duración del ciclo celular 1 como parámetro celular. En algunas realizaciones, no se mide la duración de la primera citocinesis. En algunas realizaciones, se emplea la medición del parámetro celular comparándola con una medición de parámetro celular comparable de un embrión de referencia y usando el resultado de esta comparación para obtener una determinación de la probabilidad de que el embrión alcance el estadio de blastocisto. En algunas realizaciones, el embrión es un embrión humano.

En algunos aspectos aquí descritos, se proporcionan métodos para clasificar embriones o células pluripotentes en cuanto a su probabilidad de alcanzar el estadio de blastocisto y/o el estadio de blastocisto utilizable en relación a los otros embriones o células pluripotentes en el grupo. En dichas realizaciones, se miden uno o más parámetros celulares de los embriones o las células pluripotentes en el grupo para llegar a una medición de parámetro celular para cada uno de los embriones o de las células pluripotentes. Se emplean entonces las mediciones de los parámetros celulares para determinar la probabilidad de alcanzar el estadio de blastocisto y/o el estadio de blastocisto utilizable para cada uno de los embriones o las células pluripotentes en el grupo en relación unos de otros, pudiéndose usar dicha determinación para dirigir un curso clínico de acción. En algunas realizaciones, el parámetro celular es un suceso

morfológico que se puede medir por microscopía de lapso temporal. En algunas realizaciones, p. ej., cuando se clasifican embriones, los uno o más parámetros celulares son la duración de un suceso de citocinesis, p. ej., 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 algunas realizaciones, p. ej., cuando se clasifican embriones, los uno o más parámetros celulares son la duración de un suceso mitótico, p. ej., el intervalo de tiempo entre el ciclo celular mitótico 1 y el ciclo celular mitótico 2, y el intervalo de tiempo entre el ciclo celular mitótico 2 y el ciclo celular mitótico 3. En ciertas realizaciones, también se mide la duración del ciclo celular 1. En algunas realizaciones, se emplean las mediciones de los uno o más parámetros celulares comparando las mediciones de los parámetros celulares de cada uno de los embriones o células pluripotentes en el grupo entre sí para determinar la probabilidad de alcanzar el estadio de blastocisto y/o el estadio de blastocisto utilizable para los embriones o las células pluripotentes en relación unos de otros. En algunas realizaciones, se emplean las mediciones de los uno o más parámetros celulares comparando cada medición de parámetro celular con una medición de parámetro celular de un embrión o célula pluripotente de referencia para determinar la probabilidad de alcanzar el estadio de blastocisto para cada embrión o célula pluripotente, y comparando esas probabilidades de alcanzar el estadio de blastocisto y/o el estadio de blastocisto utilizable para determinar la probabilidad de alcanzar el estadio de blastocisto y/o el estadio de blastocisto utilizable de los embriones o las células pluripotentes en relación unos de otros.

En algunos aspectos aquí descritos, se proporcionan métodos para obtener embriones con una probabilidad de alcanzar el estadio de blastocisto y/o el estadio de blastocisto utilizable para transferencia a una hembra para reproducción asistida (FIV). En dichos aspectos, se cultivan uno o más embriones en condiciones suficientes para el desarrollo de embriones. Se miden entonces uno o más parámetros celulares en el uno o más embriones para llegar a una medición de parámetros celulares. Se emplea luego la medición de parámetros celulares para obtener una determinación de la probabilidad de alcanzar el estadio de blastocisto y/o el estadio de blastocisto utilizable. Se transfieren entonces los uno o más embriones que es probable que alcancen el estadio de blastocisto y/o el estadio de blastocisto utilizable a una hembra.

La invención proporciona métodos para seleccionar embriones con una probabilidad de alcanzar el estadio de blastocisto para transferencia a una hembra para FIV cultivando uno o más embriones en condiciones suficientes para el desarrollo de embriones y determinando el grado de morfología de dicho embrión. En una realización, el grado de morfología se basa en el número, la simetría y la fragmentación de las células. En una realización, se da el grado de morfología como un grado "bueno", "regular" o "malo". En otro aspecto de la invención, se da el grado de morfología como un grado de letra (es decir, A, B, C, D, F). En aún otra realización, se da el grado de morfología como un grado numérico (es decir, 1, 2, 3, 4, etc.). En otra realización, también se miden uno o más parámetros celulares para llegar a una medición de parámetros celulares. En un aspecto aquí descrito, el parámetro celular es el intervalo de tiempo entre citocinesis 1 y citocinesis 2 y/o el intervalo entre citocinesis 2 y citocinesis 3. En la invención, la medición de los parámetros celulares es el intervalo de tiempo entre mitosis 1 y mitosis 2 y el intervalo de tiempo entre mitosis 2 y mitosis 3. En otra realización, se usa la medición de los parámetros celulares como adjunto al grado de morfología en la selección de un embrión que es probable que alcance el estadio de blastocisto o el estadio de blastocisto utilizable para transferencia a una hembra, o en la congelación para uso ulterior. En algunas realizaciones, se usa la medición de los parámetros celulares como adjunto al grado de morfología en la selección de un embrión que no es probable que alcance el estadio de blastocisto o el estadio de blastocisto utilizable. En algunas realizaciones, se realizan la clasificación morfológica y las mediciones de los parámetros celulares secuencialmente. En otros aspectos, se realizan simultáneamente la clasificación morfológica y las mediciones de los parámetros celulares.

Breve descripción de los dibujos

Se entiende mejor la invención gracias a la siguiente descripción detallada cuando se lee junto con los dibujos adjuntos. Se destaca que, según la práctica común, las diversas características de los dibujos no están a escala. Por el contrario, las dimensiones de las diversas características están expandidas o reducidas arbitrariamente por razones de claridad. Se incluyen en los dibujos las siguientes figuras.

La Figura 1 describe las divisiones precoces del embrión.

La Figura 2 describe los marcos temporales de las ventanas de predicción P2 y P3.

La Figura 3 es un dato generado por el Modelo 1 para la evaluación de embriones y una tabla que muestra la estadística del modelo.

La Figura 4 es un dato generado por el Modelo 2 para la evaluación de embriones y una tabla que muestra la estadística del modelo.

La Figura 5 es un dato generado por el Modelo 3 para la evaluación de embriones.

La Figura 6 es un dato generado por el Modelo 4 para la evaluación de embriones.

La Figura 7 es una representación esquemática del flujo de trabajo del estudio clínico en cada uno de cinco sitios de FIV. Se recogieron oocitos y se fertilizaron por FIV o IEC por cada protocolo estándar de clínica. Se cultivaron 2PN fertilizados con éxito en una placa de múltiples pocillos y se obtuvo la imagen en una incubadora estándar con el

sistema *Eeva*TM, que se ajustó para capturar una imagen de campo oscuro cada 5 minutos durante 3 días (los recuadros muestran el desarrollo del embrión y los números de marco del estadio de 1 célula a 8 células). Tras la obtención de imagen, se midieron parámetros clave de la cronología de la división celular (P1=duración de la 1ª citocinesis, P2=intervalo de tiempo entre la citocinesis 1 y 2, P3=intervalo de tiempo entre la citocinesis 2 y 3) por un panel de embriólogos expertos y se usaron para desarrollar y validar independientemente un modelo que pudiera predecir la formación de blastocistos utilizables por la fase de escisión. Se obtuvieron los resultados de la formación de blastocistos y los criterios morfológicos estándar por los sitios del estudio.

La Figura 8 describe un árbol de clasificación para la predicción de blastocistos utilizables, usando 292 embriones cultivados hasta el Día 5 ó 6 y sus resultados de Blastocisto Utilizable (negro) o Detenido (gris). El modelo del árbol de clasificación reparte los datos en 10 submuestras con 5 nodos terminales, en base a períodos de tiempo de división celular óptimos para P2=intervalo de tiempo entre la citocinesis 1 y 2 y P3=intervalo de tiempo entre la citocinesis 2 y 3. Se predice que la formación de Blastocistos Utilizables será de gran probabilidad cuando tanto P2 como P3 estén dentro de los intervalos específicos de cronología de la división celular ($9,33 \leq P2 \leq 11,45$ horas y $0 \leq P3 \leq 1,73$ horas), y de baja probabilidad (probable que se Detenga) cuando P2 o P3 estén fuera de los intervalos específicos de cronología de la división celular.

La Figura 9 describe el programa de rastreo celular desarrollado y validado para permitir el análisis de imagen en tiempo real. Se muestran los resultados de rastreo celular representativos para 1 ó 18 embriones humanos capturados en diversos estadios de desarrollo en una placa de un solo pocillo (izquierda) y de múltiples pocillos (derecha). Los anillos de color representan la delineación automática del programa de rastreo celular de las membranas celulares y las divisiones celulares. Usando el programa *Eeva* para medir las divisiones celulares y hacer predicciones de blastocistos, el % global de acuerdo en comparación con la valoración manual es del 91,0% con un IC del 95% del 86,0% al 94,3%.

La Figura 10 describe los resultados del día 5/6 frente a las predicciones de *Eeva* para cohortes de embriones en el Conjunto de Datos de Desarrollo. Cada columna de puntos de datos representa la cohorte de embriones de una sola paciente y sus resultados del Día 5/6 de Blastocistos Utilizables (círculos rellenos) o Detenidos (círculos vacíos). Se segrega a las pacientes en un grupo "Sin Blastos" o un grupo con " ≥ 1 Blasto" y se las clasifica por la edad. La barra sombreada amarilla destaca todos los embriones que están dentro del intervalo de predicción de blastocistos para P2, con la excepción de los círculos azules y rojos. Los círculos azules son Blastocistos Utilizables dentro del intervalo de P2 que están fuera de intervalo para P3, y los círculos rojos son embriones Detenidos dentro del intervalo de P2 que están fuera de intervalo para P3.

La Figura 11 describe los resultados del día 5/6 frente a las predicciones de *Eeva* para cohortes de embriones en el Conjunto de Datos de Validación. Cada columna de puntos de datos representa la cohorte de embriones de una sola paciente y sus resultados del Día 5/6 de Blastocistos Utilizables (círculos rellenos) o Detenidos (círculos vacíos). Se segrega a las pacientes en un grupo "Sin Blastos" o un grupo con " ≥ 1 Blasto" y se las clasifica por la edad. La barra sombreada amarilla destaca todos los embriones que están dentro del intervalo de predicción de blastocistos para P2, con la excepción de los círculos azules y rojos. Los círculos azules son Blastocistos Utilizables dentro del intervalo de P2 que están fuera de intervalo para P3, y los círculos rojos son embriones Detenidos dentro del intervalo de P2 que están fuera de intervalo para P3.

La Figura 12 describe la predicción de Blastocistos Utilizables (% de Especificidad o % de VPP) para la Morfología el Día 3, en comparación con *Eeva* estudiado sobre el Conjunto de Datos de Desarrollo y el Conjunto de Datos de Validación. Las barras de error representan el intervalo de confianza del 95% superior. * $p < 0,01$, # $p < 0,0001$.

La Figura 13 describe la selección de embriones el día 3 por embriólogos individuales (1, 2 y 3) usando morfología únicamente frente a morfología más *Eeva* para (A) todos los embriones ($n=755$) y (B) embriones con "buena morfología" ($n=235$). Se define la "buena morfología" por 6-10 células, $<10\%$ de fragmentación y perfecta simetría.

La Figura 14 es una representación esquemática del "enfoque secuencial" usando clasificación morfológica y medición de parámetros celulares.

Descripción detallada de la invención

Antes de describir los presentes métodos y composiciones, hay que entender que esta invención no se limita a ningún método o composición particular descritos, ya que éstos pueden, por supuesto, variar. También hay que entender que la terminología aquí utilizada tiene únicamente el fin de describir realizaciones particulares, y no pretende ser limitante, ya que el alcance de la presente invención estará limitado sólo por las reivindicaciones adjuntas.

Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que también se describe específicamente cada valor intermedio, hasta la décima parte de la unidad del límite inferior a menos que el contexto indique claramente algo diferente, entre los límites superior e inferior de ese intervalo. Cada intervalo menor entre cualquier valor indicado o valor intermedio en un intervalo indicado y cualquier otro valor indicado o intermedio en ese intervalo indicado queda incluido en la invención. Los límites superior e inferior de estos intervalos menores pueden estar independientemente incluidos o excluidos en el intervalo, y cada intervalo en donde cualquiera, ninguno o ambos de los límites están

incluidos en los intervalos menores está también incluido en la invención, sujeto a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo indicado. Cuando el intervalo indicado incluye uno o ambos de los límites, también se incluyen en la invención los intervalos que excluyen cualquiera o ambos de esos límites incluidos.

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos aquí utilizados tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por un experto en la técnica a la que esta invención pertenece. Aunque se pueden usar cualesquiera métodos y materiales similares o equivalentes a los aquí descritos en la práctica o los ensayos de la presente invención, se describen ahora algunos métodos y materiales potenciales y preferidos. Todas las publicaciones aquí mencionadas describen los métodos y/o materiales en relación a los cuales se citan las publicaciones. Se entiende que la presente descripción está por encima de cualquier descripción de una publicación incorporada siempre que haya una contradicción.

Hay que hacer notar que, tal como se usan aquí y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen los referentes plurales a menos que el contexto dicte claramente algo diferente. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a "una célula" incluye una pluralidad de dichas células y la referencia a "el péptido" incluye la referencia a uno o más péptidos y sus equivalentes, p. ej., polipéptidos, conocidos para los expertos en la técnica, etc.

Las publicaciones aquí discutidas son proporcionadas únicamente por su descripción antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada aquí debe considerarse como una admisión de que la presente invención no está capacitada para anteceder a dicha publicación en virtud de invención previa. Además, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes de las fechas de publicación reales, que pueden necesitar ser independientemente confirmadas.

Se proporcionan métodos, composiciones y kits para determinar la probabilidad de alcanzar el estadio de blastocisto y/o el estadio de blastocisto utilizable de uno o más embriones o células pluripotentes y/o la presencia de anomalías cromosómicas en uno o más embriones o células pluripotentes. Estos métodos, composiciones y kits hallan uso en la identificación de embriones y oocitos *in vitro* que son los más útiles en el tratamiento de la infertilidad en humanos. Éstos y otros objetos, ventajas y características de la invención resultarán evidentes para los expertos en la técnica tras la lectura de los detalles de los métodos y composiciones en cuestión como se describirá más ampliamente a continuación.

Los términos "potencial de desarrollo" y "competencia de desarrollo" son aquí utilizados para referirse a la habilidad o capacidad de un embrión o célula pluripotente sanos para crecer o desarrollarse.

El término "especificidad", cuando se usa aquí con respecto a métodos de predicción y/o evaluación, se utiliza para referirse a la capacidad para predecir o evaluar un embrión para determinar la probabilidad de que el embrión no se desarrolle a un blastocisto mediante valoración, determinación, identificación o selección de embriones que no es probable que alcancen el estadio de blastocisto y/o el estadio de blastocisto utilizable. Elevada especificidad, tal como se usa aquí, se refiere a cuando al menos aproximadamente un 70%, 72%, 75%, 77%, 80%, 82%, 85%, 88%, 90%, 92%, 95% o más, o un 100% de los embriones humanos no seleccionados no es probable que alcancen el estadio de blastocisto y/o el estadio de blastocisto utilizable. En algunas realizaciones, se deseleccionan los embriones que no tienen probabilidad de alcanzar el estadio de blastocisto y/o el estadio de blastocisto utilizable.

Se usa aquí el término "embrión" para referirse tanto al cigoto que se forma cuando se unen dos gametos haploides, p. ej., un oocito secundario no fertilizado y una célula espermática, para formar una célula totipotente diploide, p. ej., un óvulo fertilizado, como al embrión que resulta de las divisiones celulares inmediatamente posteriores, es decir, de la escisión embrionaria, a través de la mórula, es decir, el estadio de 16 células, y el estadio de blastocisto (con trofoectodermo diferenciado y masa celular interna).

Se usa aquí el término "blastocisto" para describir todos los embriones o células pluripotentes que alcanzan la cavitación (es decir, la formación de cavidades), incluyendo aquéllos a los que se hace aquí referencia como "blastocistos utilizables".

Se usa aquí el término "blastocisto utilizable" para referirse a cualquier embrión que forma un blastocisto el día 5 y posteriormente o bien se transfiere, o bien se congela, o bien se almacena por algún otro medio bien conocido por los expertos en la técnica como parte de un procedimiento de fertilización *in vitro*. Los blastocistos utilizables pueden también incluir, por ejemplo, blastocistos con mayor potencial para la competencia del desarrollo, mayor potencial de desarrollo y blastocistos que tienen la capacidad de implantarse con éxito en un útero. Un blastocisto que tiene la capacidad de implantarse con éxito en un útero tiene la capacidad de pasar a través de la gestación. Un blastocisto que tiene la capacidad de pasar a través de la gestación tiene la capacidad de nacer vivo. Se usan aquí los términos "nacido vivo" o "nacimiento con vida" para incluir, aunque sin limitación, nacimientos sanos y/o cromosómicamente normales (número normal de cromosomas, estructura cromosómica normal, orientación cromosómica normal, etc.).

Se usa aquí el término "detenido" para referirse a cualquier embrión que no cumpla con la definición de blastocisto.

Se usa aquí el término "célula pluripotente" para indicar cualquier célula que tenga la capacidad de diferenciarse en múltiples tipos de células en un organismo. Como ejemplos de células pluripotentes, se incluyen células madre, oocitos y embriones de 1 célula (es decir, cigotos).

Se usa aquí el término "célula madre" para referirse a una célula o una población de células que: (a) tiene la capacidad de autorrenovarse, y (b) tiene el potencial para dar lugar a diversos tipos de células diferenciadas. Frecuentemente, una célula madre tiene el potencial para dar lugar a múltiples estirpes de células. Tal como se usa aquí, una célula madre puede ser una célula madre totipotente, p. ej., un oocito fertilizado, que da lugar a todos los tejidos embrionarios y extraembrionarios de un organismo; una célula madre pluripotente, p. ej., una célula madre embrionaria (ME), una célula del germen embrionario (GE) o una célula madre pluripotente inducida (MPi), que da lugar a todos los tejidos embrionarios de un organismo, es decir, a las estirpes del endodermo, mesodermo y ectodermo; una célula madre multipotente, p. ej., una célula madre mesenquimatosa, que da lugar a al menos dos de los tejidos embrionarios de un organismo, es decir, a al menos dos de las estirpes del endodermo, mesodermo y ectodermo, o puede ser una célula madre específica de tejido, que da lugar a múltiples tipos de células diferenciadas de un tejido particular. Como células madre específicas de tejido, se incluyen células embrionarias específicas de tejido, que dan lugar a las células de un tejido particular, y células madre somáticas, que residen en los tejidos del adulto y pueden dar lugar a las células de ese tejido, p. ej., células madre neurales, que dan lugar a todas las células del sistema nervioso central, células satélite, que dan lugar al músculo esquelético, y células madre hematopoyéticas, que dan lugar a todas las células del sistema hematopoyético.

Se usa aquí el término "oocito" para referirse a una célula germinal femenina no fertilizada, o gameto. Los oocitos de la solicitud en cuestión pueden ser oocitos primarios, en cuyo caso se sitúan para atravesar o están atravesando la meiosis I, u oocitos secundarios, en cuyo caso se sitúan para atravesar o están atravesando la meiosis II.

Por "meiosis", se quiere indicar los sucesos del ciclo celular que dan como resultado la producción de gametos. En el primer ciclo celular meiótico, o meiosis I, los cromosomas de una célula se duplican y se reparten en dos células hijas. Estas células hijas se dividen entonces en un segundo ciclo celular meiótico, o meiosis II, que no va acompañado de síntesis de ADN, para dar como resultado gametos con un número haploide de cromosomas.

Por estadio de "vesícula germinal", se quiere indicar la fase de maduración de un oocito 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. También se denomina a los oocitos en este estadio "oocitos de vesícula germinal", por el núcleo característicamente grande, denominado vesícula germinal. En un oocito humano normal cultivado *in vitro*, la vesícula germinal se produce aproximadamente 6-24 horas después del inicio de la maduración.

Por estadio de "metafase I", se quiere indicar la fase de maduración de un oocito primario que se correlaciona con la metafase I del ciclo celular de la meiosis I. En comparación con los oocitos de vesícula germinal, los oocitos en metafase I no tienen un núcleo grande claramente definido. En un oocito humano normal cultivado *in vitro*, la metafase I se produce aproximadamente 12-36 horas después del inicio de la maduración.

Por estadio de "metafase II", se quiere indicar la fase de maduración de un oocito secundario que se correlaciona con la metafase II del ciclo celular de la meiosis II. La metafase II es distinguible por la extrusión del primer cuerpo polar. En un oocito humano normal cultivado *in vitro*, la metafase II se produce aproximadamente 24-48 horas después del inicio de la maduración.

Por "ciclo celular mitótico", se quiere indicar los sucesos en una célula que dan como resultado la duplicación de los cromosomas de una célula y la división de esos cromosomas y de 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, primeramente repartiendo su material nuclear y luego dividiendo su material citoplásmico y su material nuclear repartido (citocinesis) en dos células separadas.

Por "primer ciclo celular mitótico" o "ciclo celular 1" o "P1", se quiere indicar el intervalo de tiempo desde la fertilización hasta la compleción del primer suceso de citocinesis, es decir, la división del oocito fertilizado en dos células hijas. En casos en los que los oocitos se fertilizan *in vitro*, se puede usar el intervalo de tiempo entre la inyección de gonadotropina coriónica humana (HCG) (normalmente administrada antes de la retirada de oocitos) y la compleción del primer suceso de citocinesis como un intervalo de tiempo sustituto.

Por "segundo ciclo celular mitótico" o "ciclo celular 2" o "P2", se quiere indicar el segundo suceso del ciclo celular observado en un embrión, el intervalo de tiempo entre la producción de células hijas a partir de un oocito fertilizado por mitosis y la producción de un primer conjunto de células nietas a partir de una de esas células hijas (la "célula hija avanzada" o célula hija A) por mitosis. Se puede medir el ciclo celular 2 usando varios sucesos morfológicos, incluyendo el final de la citocinesis 1 y el comienzo o el final de la citocinesis 2. Al completarse el ciclo celular 2, el embrión consiste en 3 células. En otras palabras, se puede identificar visualmente el ciclo celular 2 como el tiempo entre el embrión que contiene 2 células y el embrión que contiene 3 células.

Por "tercer ciclo celular mitótico" o "ciclo celular 3" o "P3", se quiere indicar el tercer suceso del ciclo celular observado en un embrión, típicamente el intervalo de tiempo desde la producción de un primer conjunto de células nietas a partir de un oocito fertilizado por mitosis hasta la producción de un segundo conjunto de células nietas a partir de la segunda célula hija (la "célula hija retrasada" o célula hija B) por mitosis. Se puede medir el ciclo celular 3 usando varios sucesos morfológicos, incluyendo el final de la citocinesis 2 y el comienzo o el final de la citocinesis 3. Al completarse el ciclo celular 3, el embrión consiste en 4 células. En otras palabras, se puede identificar visualmente el ciclo celular 3 como

el tiempo entre el embrión que contiene 3 células y el embrión que contiene 4 células.

Por "primer suceso de escisión", se quiere indicar la primera división, es decir, la división del oocito en dos células hijas, es decir, el ciclo celular 1. Al completarse el primer suceso de escisión, el embrión consiste en 2 células.

5 Por "segundo suceso de escisión", se quiere indicar el segundo conjunto de divisiones, es decir, la división de la célula hija avanzada en dos células nietas y la división de la célula hija retrasada en dos células nietas. En otras palabras, el segundo suceso de escisión consiste tanto en el ciclo celular 2 como en el ciclo celular 3. Al completarse la segunda escisión, el embrión consiste en 4 células.

Por "tercer suceso de escisión", se quiere indicar el tercer conjunto de divisiones, es decir, las divisiones de todas las células nietas. Al completarse el tercer suceso de escisión, el embrión típicamente consiste en 8 células.

10 Por "citocinesis" o "división celular", se quiere indicar aquella fase de la mitosis en la que una célula experimenta división celular. En otras palabras, es la fase de la mitosis en la que el material nuclear repartido de una célula y su material citoplásmico se dividen para producir dos células hijas. El período de la citocinesis es identificable como el período, o ventana, de tiempo entre el momento en que se observa primeramente una constricción de la membrana celular (un "surco de escisión") y la resolución de ese suceso de constricción, es decir, la generación de dos células
15 hijas. Se puede identificar visualmente el inicio del surco de escisión como el punto en el que la curvatura de la membrana celular cambia de convexa (redondeada hacia fuera) a cóncava (curvada hacia dentro con un diente o indentación). Se ilustra esto, por ejemplo, en la Fig. 4 de la Patente Estadounidense N° 7.963.906, panel superior, mediante flechas blancas que señalan a 2 surcos de escisión. También se puede utilizar la aparición de elongación celular para marcar la aparición de la citocinesis, en cuyo caso se define el período de citocinesis como el período de
20 tiempo entre la aparición de la elongación celular y la resolución de la división celular.

Por "primera citocinesis" o "citocinesis 1", se quiere indicar el primer suceso de división celular tras la fertilización, es decir, la división de un oocito fertilizado para producir dos células hijas. La primera citocinesis se produce normalmente aproximadamente un día después de la fertilización.

25 Por "segunda citocinesis" o "citocinesis 2", se quiere indicar el segundo suceso de división celular observado en un embrión, es decir, la división de una célula hija del oocito fertilizado (la "célula hija avanzada", o hija A) en un primer conjunto de dos nietas.

Por "tercera citocinesis" o "citocinesis 3", se quiere indicar el tercer suceso de división celular observado en un embrión, es decir, la división de la otra hija del oocito fertilizado (la "célula hija retrasada", o hija B) en un segundo conjunto de dos nietas.

30 El término "marcador fiduciario" o "marcador de referencia" es un objeto usado en el campo de visión de un sistema de imagen que aparece en la imagen producida, para uso como punto de referencia o medida. Puede ser o bien algo situado dentro de, o sobre, el objeto de la imagen, o una marca o conjunto de marcas en la retícula de un instrumento óptico.

35 El término "micropocillo" se refiere a un recipiente que tiene un tamaño a escala celular, preferiblemente para proporcionar acomodo a una sola célula eucariótica.

El término "seleccionar" o "selección" se refiere a cualquier método conocido en la técnica para mover uno o más embriones, blastocistos u otra célula o células como aquí se describe de una localización a otra localización. Esto puede incluir, aunque sin limitación, mover uno o más embriones, blastocistos u otra célula o células dentro de un pocillo, de una placa o de otro compartimento o dispositivo para separar los uno o más embriones, blastocistos u otra
40 célula o células seleccionados aquí descritos de los uno o más embriones, blastocistos u otra célula o células no seleccionados o deseleccionados aquí descritos (tal como, por ejemplo, mover de un área de un pocillo, placa, compartimento o dispositivo a otra área de un pocillo, placa, compartimento o dispositivo). Esto puede incluir también mover uno o más embriones, blastocistos u otra célula o células de un pocillo, placa, compartimento o dispositivo a otro pocillo, placa, compartimento o dispositivo. Se puede emplear cualquier medio conocido en la técnica para separar
45 o distinguir los uno o más embriones, blastocistos u otra célula o células seleccionados de los uno o más embriones, blastocistos u otra célula o células no seleccionados con los métodos de la presente invención. El término "deselección" o "deseleccionar" se refiere a cualquier método conocido para mover uno o más embriones, blastocistos u otra célula o células como aquí se describe de una localización a otra localización con el fin de no usarlos para transferencia inmediata a una hembra. Por ejemplo, se puede "deseleccionar" un embrión de mala calidad para
50 transferencia a una hembra. Se pueden transferir los embriones deseleccionados a su propio compartimento, pocillo, placa, dispositivo o cualquier otro recipiente conocido y marcarlos para no transferencia. Se pueden seleccionar estos embriones para transferencia en posteriores fases si es necesario.

En los métodos aquí descritos, se valoran uno o más embriones o células pluripotentes en cuanto a su probabilidad para alcanzar el estadio de blastocisto y/o el estadio de blastocisto utilizable midiendo uno o más parámetros celulares
55 del(de los) embrión(es) o célula(s) pluripotente(s) y empleando estas mediciones para determinar la probabilidad de que el(los) embrión(es) o célula(s) pluripotente(s) alcance(n) el estadio de blastocisto. Se han descrito dichos parámetros, por ejemplo, en la Patente Estadounidense N° 7.963.906. Se puede usar la información así derivada para

guiar decisiones clínicas, p. ej., si transferir o no un embrión fertilizado *in vitro*, si trasplantar o no una célula o células cultivadas.

Como ejemplos de embriones que se pueden valorar mediante los métodos aquí descritos, se incluyen embriones de 1 célula (a los que también se hace referencia como 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, inclusive, embriones de 16 células, mórulas y blastocistos, cualquiera de los cuales se puede derivar por cualquier modo conveniente, p. ej., a partir de un oocito que ha madurado *in vivo* o a partir de un oocito que ha madurado *in vitro*.

Como ejemplos de células pluripotentes que se pueden valorar mediante los métodos aquí descritos, se incluyen células madre totipotentes, p. ej., oocitos, tales como oocitos primarios y oocitos secundarios; células madre pluripotentes, p. ej., células ME, células GE, células MPi y similares; células multipotentes, p. ej., células madre mesenquimales; y células madre específicas de tejido. Pueden proceder de cualquier estadio de vida, p. ej., embrionario, neonatal, juvenil o adulto, y ser de cualquier sexo, es decir, XX o XY.

Los embriones y las células pluripotentes pueden derivar de cualquier organismo, p. ej., cualquier especie de mamífero, p. ej., humano, primate, equino, bovino, porcino, canino, felino, etc. Preferiblemente, derivan de un humano. Pueden ser previamente congelados, p. ej., embriones criopreservados en el estadio de 1 célula y luego descongelados, u oocitos y células madre congelados y descongelados. De manera alternativa, se pueden preparar en fresco, p. ej., embriones que se preparan en fresco a partir de oocitos por técnicas de fertilización *in vitro*; oocitos que se recogen en fresco y/o maduran en fresco por técnicas de maduración *in vitro* (incluyendo, p. ej., oocitos que se recogen de tejido ovárico *in vitro*) o que derivan de células madre pluripotentes diferenciadas *in vitro* en células germinales y maduras en oocitos; células madre preparadas en fresco a partir de la disociación y el cultivo de tejidos por métodos conocidos en la técnica; y similares. Se pueden cultivar en cualesquiera condiciones convenientes conocidas en la técnica para promover la supervivencia, el crecimiento y/o el desarrollo de la muestra que se ha de valorar, p. ej., para embriones, en condiciones tales como las utilizadas en la técnica de fertilización *in vitro*; véanse, p. ej., Patente Estadounidense N° 6.610.543, Patente Estadounidense N° 6.130.086, Patente Estadounidense N° 5.837.543; para oocitos, en condiciones tales como las utilizadas en la técnica para promover la maduración de oocitos; véanse, p. ej., Patente Estadounidense N° 5.882.928 y Patente Estadounidense N° 6.281.013; para células madre, en condiciones tales como las utilizadas en la técnica para promover el mantenimiento, la diferenciación y la proliferación; véanse, p. ej., Patente Estadounidense N° 6.777.233, Patente Estadounidense N° 7.037.892, Patente Estadounidense N° 7.029.913, Patente Estadounidense N° 5.843.780 y Patente Estadounidense N° 6.200.806, Solicitud Estadounidense N° 2009/0047263; Solicitud Estadounidense N° 2009/0068742. Con frecuencia, se cultivan los embriones/células pluripotentes en un medio comercialmente disponible, tal como DMEM KnockOut, DMEM-F12 o Medio de Dulbecco Modificado de Iscoves que se ha suplementado con suero o un sustituto del suero, aminoácidos, factores de crecimiento y hormonas adaptados a las necesidades del embrión/célula pluripotente particular que se esté valorando.

En algunas realizaciones, se valoran los embriones/células pluripotentes midiendo los parámetros celulares por imagen de lapso de tiempo. Se pueden cultivar los embriones/células pluripotentes en placas de cultivo estándar. De manera alternativa, se pueden cultivar los embriones/células pluripotentes en placas de cultivo a la medida, p. ej., placas de cultivo a la medida con micropocillos de calidad óptica como aquí se describe. En dichas placas de cultivo a la medida, cada micropocillo contiene un solo embrión/célula pluripotente, y la superficie del fondo de cada micropocillo tiene un acabado de calidad óptica, de tal forma que se puede obtener la imagen de todo el grupo de embriones en una sola placa simultáneamente mediante un solo microscopio en miniatura con suficiente resolución para seguir los procesos de mitosis celular. La totalidad del grupo de micropocillos comparte la misma gota de medio en la placa de cultivo, y también puede incluir una pared externa situada alrededor de los micropocillos para estabilizar la gota de medio, así como marcadores de referencia situados cerca de los micropocillos. Se puede ajustar la hidrofobicidad de la superficie mediante ataque con plasma u otro tratamiento para prevenir la formación de burbujas en los micropocillos cuando se llenan con medios. Independientemente de si se utiliza una placa de cultivo estándar o una placa de cultivo a la medida, durante el cultivo, se pueden cultivar uno o más embriones en desarrollo en el mismo medio de cultivo; p. ej., se pueden cultivar entre 1 y 30 embriones por placa.

Se adquieren imágenes a lo largo del tiempo y se analizan después para llegar a mediciones de los uno o más parámetros celulares. Se puede realizar la imagen de lapso de tiempo con cualquier microscopio controlado por ordenador que esté equipado para almacenamiento y análisis de imagen digital, por ejemplo, microscopios invertidos equipados con platinas calentadas y cámaras de incubación, o series de microscopios en miniatura contruidos a la medida que encajan dentro de una incubadora convencional. La serie de microscopios en miniatura permite el cultivo concurrente de múltiples placas de muestras en la misma incubadora, y se puede llevar a escala para acomodar múltiples canales sin limitaciones sobre el intervalo mínimo de tiempo entre sucesivas capturas de imágenes. Usando múltiples microscopios, se elimina la necesidad de mover la muestra, lo que mejora la precisión del sistema y la fiabilidad global del sistema. Los microscopios individuales en la incubadora pueden estar parcial o totalmente aislados, proporcionando a cada placa de cultivo su propio ambiente controlado. Esto permite transferir las placas hacia y desde las estaciones de imagen sin alterar el ambiente de las otras muestras.

El sistema de imagen para la imagen de lapso de tiempo puede emplear iluminación de campo brillante, iluminación

de campo oscuro, contraste de fases, contraste de modulación Hoffman, contraste de interferencia diferencial, luz polarizada o fluorescencia. En algunas realizaciones, se puede usar iluminación de campo oscuro para obtener un mayor contraste de imagen para posterior extracción de características y análisis de imagen. Además, se pueden usar fuentes de luz roja o próxima al infrarrojo para reducir la fototoxicidad y mejorar el índice de contraste entre las membranas celulares y la porción interna de las células.

Las imágenes que se adquieren pueden ser almacenadas ya sea sobre una base continua, como en vídeo en vivo, o sobre una base intermitente, como en fotografía de lapso temporal, donde se obtienen imágenes de un sujeto repetidamente en una imagen fija. Preferiblemente, el intervalo de tiempo entre imágenes debería ser de entre 1 y 30 minutos con objeto de capturar sucesos morfológicos significativos como se describe a continuación. En una realización alternativa, el intervalo de tiempo entre imágenes podría variar dependiendo de la cantidad de actividad celular. Por ejemplo, durante periodos activos, se podrían tomar imágenes tan frecuentemente como cada pocos segundos o cada minuto, mientras que, durante periodos inactivos, se podrían tomar imágenes cada 10 ó 15 minutos o más. Se podría usar el análisis de imagen en tiempo real sobre las imágenes capturadas para detectar cuándo y cómo variar los intervalos de tiempo. En nuestros métodos, se estima que la cantidad total de luz recibida por las muestras es equivalente a aproximadamente 24 minutos de exposición continua a luz de bajo nivel durante 5 días de imagen. La intensidad de la luz para un sistema de imagen de lapso de tiempo es significativamente inferior a la intensidad de la luz típicamente usada en un microscopio de reproducción asistida debido a la baja potencia de los LED (por ejemplo, usando un LED de 1 W en comparación con una bombilla típica de halógeno de 100 W) y a la elevada sensibilidad del sensor de la cámara. Por lo tanto, la cantidad total de energía luminosa recibida por un embrión usando el sistema de imagen de lapso de tiempo es comparable o inferior a la cantidad de energía recibida durante la manipulación rutinaria en una clínica de FIV. Además, se puede acortar significativamente el tiempo de exposición para reducir la cantidad total de exposición a la luz para el embrión/célula pluripotente. Para 2 días de imagen, con captura de imágenes 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.

Tras la adquisición de imágenes, se extraen las imágenes y se analizan en cuanto a diferentes parámetros celulares, por ejemplo, tamaño celular, grosor de la zona pelúcida, grado de fragmentación, simetría de las células hijas resultantes de una división celular, intervalos de tiempo entre las primeras pocas mitosis y duración de la citocinesis.

Los parámetros celulares que se pueden medir por imagen de lapso de tiempo son normalmente sucesos morfológicos. Por ejemplo, al valorar embriones, se puede usar imagen de lapso de tiempo para medir la duración de un suceso de citocinesis, p. ej., citocinesis 1, citocinesis 2, citocinesis 3 o citocinesis 4, donde la duración de un suceso de citocinesis se define como el intervalo de tiempo entre la primera observación de un surco de escisión (la iniciación 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 suceso del ciclo celular, p. ej., ciclo celular 1, ciclo celular 2, ciclo celular 3 o ciclo celular 4, donde la duración de un suceso 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, en la resolución de la citocinesis) y la producción de dos células hijas a partir de esa célula. Otros parámetros celulares de interés que se pueden medir por imagen de lapso temporal incluyen intervalos de tiempo que se definen por estos sucesos celulares, p. ej., (a) el intervalo de tiempo entre citocinesis 1 y citocinesis 2, definible como cualquiera del intervalo entre la iniciación de la citocinesis 1 y la iniciación de la citocinesis 2, el intervalo entre la resolución de la citocinesis 1 y la resolución de la citocinesis 2, el intervalo entre la iniciación de la citocinesis 1 y la resolución de la citocinesis 2; o el intervalo entre la resolución de la citocinesis 1 y la iniciación de la citocinesis 2; o (b) el intervalo de tiempo entre la citocinesis 2 y la citocinesis 3, definible como cualquiera del intervalo entre la iniciación de la citocinesis 2 y la iniciación 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 la iniciación de la citocinesis 2 y la resolución de la citocinesis 3, o el intervalo entre la resolución de la citocinesis 2 y la iniciación de la citocinesis 3. En una realización, los parámetros celulares que se han de medir consisten en el intervalo de tiempo entre citocinesis 1 y citocinesis 2 y el intervalo de tiempo entre citocinesis 2 y citocinesis 3.

Para los fines de fertilización *in vitro*, se considera ventajoso transferir el embrión al útero precozmente en el desarrollo, p. ej., hacia el día 2, el día 3, el día 4 o el día 5, es decir, hasta llegar al estadio de 8 células, para reducir la pérdida de embriones debido a los inconvenientes de las condiciones de cultivo en relación al ambiente *in vitro*, y para reducir resultados adversos potenciales asociados a errores epigenéticos que pueden producirse 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 parámetros celulares tenga lugar dentro de los 2 días a partir de la fertilización, aunque los presentes métodos también contemplan periodos 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.

Como ejemplos de parámetros celulares en un oocito en maduración que se pueden valorar mediante imagen de lapso temporal, se incluyen, sin limitación, cambios en la morfología de la membrana del oocito, p. ej., tamaño del oocito, la velocidad y el grado de separación de la zona pelúcida; cambios en la morfología del núcleo del oocito, p. ej., la iniciación, compleción y velocidad de destrucción de la vesícula germinal (DVG), presencia y localización del huso meiótico y agregación del retículo endoplásmico liso; la velocidad y dirección del movimiento de gránulos en el citoplasma y el núcleo, p. ej., viscosidad del ooplasma y cambios vacuolares; la citocinesis del oocito y 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 oocito secundario maduro y el segundo cuerpo polar.

Como ejemplos de parámetros celulares en una célula madre o una población de células madre que se pueden valorar por imagen de lapso de tiempo, se incluyen, sin limitación, la duración de los sucesos de citocinesis, el tiempo entre sucesos de citocinesis, el tamaño y la forma de las células madre antes de y durante los sucesos de citocinesis (p. ej., cambios en la morfología y la actividad al diferenciarse las células madre, incluyendo, aunque sin limitación, elongación, migración, cambios en las características de la membrana, cambios en la morfología nuclear), número de células hijas producidas por un suceso de citocinesis, orientación espacial del surco de escisión, la velocidad y/o el número de divisiones asimétricas observadas (es decir, donde una célula hija se mantiene como una célula madre mientras la otra se diferencia), la velocidad y/o el número de divisiones simétricas observadas (es decir, donde ambas células hijas o bien permanecen como células madre o bien se diferencian ambas), y el intervalo de tiempo entre la resolución de un suceso de citocinesis y cuando una célula madre comienza a diferenciarse.

Se pueden medir los parámetros manualmente, o se pueden medir automáticamente, p. ej., mediante un programa de análisis de imagen. Cuando se emplea un programa de análisis de imagen, se pueden usar algoritmos de análisis de imagen que emplean una técnica de estimación de modelos probabilísticos basada en el método secuencial de Monte Carlo, p. ej., generando distribuciones de modelos de embriones/células pluripotentes hipotetizados, simulando imágenes basadas en un modelo óptico simple y comparando estas simulaciones con los datos de las imágenes observadas. Cuando se emplean dichas estimaciones de modelos probabilísticos, se pueden modelar las células como cualquier forma apropiada, p. ej., como colecciones de elipses en espacio 2D, colecciones de elipsoides en espacio 3D y similares. Para tratar con oclusiones y ambigüidades de profundidad, el método puede imponer restricciones geométricas que corresponden al comportamiento físico esperado. Para mejorar la consistencia, se pueden capturar las imágenes en uno o más planos focales.

Una vez obtenidas las mediciones de los parámetros celulares, se emplean las mediciones para determinar la probabilidad de que el embrión/la célula pluripotente se desarrolle en un blastocisto y/o un blastocisto utilizable.

En algunas realizaciones, se usa directamente la medición de los parámetros celulares para determinar la probabilidad de que un embrión/célula pluripotente alcance el estadio de blastocisto. En algunas realizaciones, se usa directamente la medición de los parámetros celulares para determinar la probabilidad de que un embrión/célula pluripotente alcance el estadio de blastocisto utilizable. En otras palabras, el valor absoluto de la propia medición es suficiente para determinar la probabilidad de que un embrión/célula pluripotente alcance el estadio de blastocisto y/o estadio de blastocisto utilizable. Como ejemplos de esto, en realizaciones que usan imagen de lapso de tiempo para medir los parámetros celulares, se incluyen, sin limitación, los siguientes, los cuales, en combinación, son indicativos de la probabilidad de que un embrión/célula pluripotente alcance el estadio de blastocisto y/o estadio de blastocisto utilizable: (a) un intervalo de tiempo entre la resolución de la citocinesis 1 y la aparición de la citocinesis 2, que es de aproximadamente 8-15 horas, p. ej., aproximadamente 9-14 horas, aproximadamente 9-13 horas, aproximadamente 9-12 horas o aproximadamente 9-11,5 horas, o aproximadamente 9,33-11,45 horas; y (b) un intervalo de tiempo, es decir, sincronización, entre el inicio de la citocinesis 2 y el inicio de la citocinesis 3, que es de aproximadamente 0-6 horas, aproximadamente 0-5 horas, p. ej., aproximadamente 0-4 horas, aproximadamente 0-3 horas, aproximadamente 0-2 horas o aproximadamente 0-1,75 horas, o aproximadamente 0-1,73 horas. En algunas realizaciones, la determinación de la probabilidad de que el embrión/célula pluripotente alcance el estadio de blastocisto y/o estadio de blastocisto utilizable puede adicionalmente incluir la medición de parámetros celulares, incluyendo, aunque sin limitación: un ciclo celular 1 que dura aproximadamente 20-27 horas, p. ej., aproximadamente 25-27 horas. Como ejemplos de mediciones directas, cualquiera de las cuales, sola o en combinación, es indicativa de la probabilidad de que un embrión/célula pluripotente no alcance el estadio de blastocisto y/o estadio de blastocisto utilizable, se incluyen, sin limitación: (a) un intervalo de tiempo entre la resolución de la citocinesis 1 y la aparición 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 o menos horas; o (b) un intervalo de tiempo entre el inicio de la citocinesis 2 y el inicio de la citocinesis 3, que es de 6, 7, 8, 9 ó 10 o más horas. En algunas realizaciones, la determinación de la probabilidad de que el embrión/célula pluripotente no alcance el estadio de blastocisto y/o estadio de blastocisto utilizable puede incluir adicionalmente la medición de parámetros celulares, incluyendo, aunque sin limitación: un ciclo celular 1, que dura más de aproximadamente 27 horas, p. ej., 28, 29 ó 30 o más horas. En algunas realizaciones, no se mide la duración de la primera citocinesis.

En algunas realizaciones, se emplea la medición de los parámetros celulares comparándola con una medición de parámetros celulares de un embrión/célula pluripotente de referencia, o control, y usando el resultado de esta comparación para obtener una determinación de la probabilidad de que el embrión/célula pluripotente alcance o no alcance el estadio de blastocisto y/o el estadio de blastocisto utilizable. Los términos "referencia" y "control", tal como se usan aquí, significan un embrión o célula estandarizados para uso en la interpretación de las mediciones de los parámetros celulares de un embrión/célula pluripotente dados y la asignación de una determinación de la probabilidad del embrión/célula pluripotente de alcanzar o no alcanzar el estadio de blastocisto y/o el estadio de blastocisto utilizable. La referencia o control puede ser un embrión/célula pluripotente que se sabe que tiene un fenotipo deseado, p. ej., que es probable que alcance el estadio de blastocisto y/o el estadio de blastocisto utilizable, y, por lo tanto, puede ser un embrión/célula pluripotente de referencia o control positivo. De manera alternativa, el embrión/célula pluripotente de referencia/control puede ser un embrión/célula pluripotente que se sabe que no tiene el fenotipo

deseado, y, por lo tanto, que es un embrión/célula pluripotente de referencia/control negativo.

En ciertas realizaciones, se compara(n) la(s) medición(es) de los parámetros celulares obtenida(s) con una medición(es) de parámetros celulares comparable(s) de un solo embrión/célula pluripotente de referencia/control para obtener información concerniente al fenotipo del embrión/célula que se está estudiando. En aún otras realizaciones, se compara(n) la(s) medición(es) de los parámetros celulares obtenida(s) con la(s) medición(es) de parámetros celulares comparable(s) de dos o más embriones o células pluripotentes de referencia/control diferentes para obtener información más en profundidad concerniente al fenotipo del embrión/célula estudiados. Por ejemplo, se pueden comparar las mediciones de los parámetros celulares obtenidas del(de los) embrión(es) o célula(s) pluripotente(s) que se está(n) valorando con un embrión o célula pluripotente tanto positivos como negativos para obtener información confirmada en cuanto a si el embrión/célula tiene el fenotipo de interés.

Como ejemplo, la resolución de la citocinesis 1 y la aparición de la citocinesis 2 en embriones humanos normales es de aproximadamente 8-15 horas, más frecuentemente de aproximadamente 9-13 horas, con un valor medio de aproximadamente 11 +/- 2,1 horas, es decir, 6, 7 ó 8 horas, más normalmente de 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 está valorando en comparación con el observado para un embrión de referencia normal es indicativo de la probabilidad de que el embrión/célula pluripotente no alcance el estadio de blastocisto y/o el estadio de blastocisto utilizable. Como segundo 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 es normalmente de aproximadamente 0-5 horas, más normalmente de aproximadamente 0, 1, 2 ó 3 horas, con un tiempo medio de aproximadamente 1 +/- 1,6 horas; un intervalo mayor entre la compleción de la citocinesis 2 y la citocinesis 3 en el embrión que se está valorando en comparación con el observado en un embrión de referencia normal es indicativo de la probabilidad de que el embrión/célula pluripotente no alcance el estadio de blastocisto y/o el estadio de blastocisto utilizable. Como tercer ejemplo, el ciclo celular 1 en un embrión normal, es decir, desde el momento de la fertilización hasta la compleción de la citocinesis 1, se completa típicamente en aproximadamente 20-27 horas, más normalmente en aproximadamente 25-27 horas, es decir, aproximadamente 15, 16, 17, 18 ó 19 horas, más normalmente aproximadamente 20, 21, 22, 23 ó 24 horas, y más normalmente aproximadamente 25, 26 ó 27 horas. Un ciclo celular 1 que es más largo en el embrión que se está valorando en comparación con el observado para un embrión de referencia normal es indicativo de la probabilidad de que el embrión/célula pluripotente no alcance el estadio de blastocisto y/o el estadio de blastocisto utilizable. Se pueden derivar ejemplos de datos empíricos, p. ej., observando uno o más embriones o células pluripotentes de referencia junto con el embrión/célula pluripotente que se ha de valorar. Se puede emplear cualquier embrión/célula pluripotente de referencia, p. ej., una referencia normal que es probable que alcance el estadio de blastocisto y/o el estadio de blastocisto utilizable, o una muestra de referencia anormal que no es probable que alcance el estadio de blastocisto. 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 a las que se llega por microscopía de lapso de tiempo.

Como se ha discutido anteriormente, se pueden medir uno o más parámetros y emplearlos para determinar la probabilidad de alcanzar el estadio de blastocisto para un embrión o una célula pluripotente. En algunas realizaciones, una medición de dos parámetros puede ser suficiente para llegar a una determinación de la probabilidad de alcanzar el estadio de blastocisto y/o el estadio de blastocisto utilizable. En algunas realizaciones, puede ser deseable emplear mediciones de más de dos parámetros, por ejemplo, 3 parámetros celulares o 4 o más parámetros celulares.

En ciertas realizaciones, puede ser deseable estudiar para múltiples parámetros, ya que estudiar para múltiples parámetros puede proporcionar mayor sensibilidad y especificidad. Por sensibilidad, se quiere decir la proporción de positivos reales que se identifican correctamente como tales. Se puede representar esto matemáticamente como:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{(\text{Número de positivos reales})}{(\text{Número de positivos reales} + \text{Número de falsos negativos})}$$

Por lo tanto, en un método en el que los "positivos" son los embriones que tienen un buen potencial de desarrollo, es decir, que se desarrollarán a blastocistos o blastocistos utilizables, y los "negativos" son los embriones que tienen un mal potencial de desarrollo, es decir, que no se desarrollarán a blastocistos o blastocistos utilizables, una sensibilidad del 100% significa que la prueba reconoce todos los embriones que se desarrollarán a blastocistos o blastocistos utilizables como tales. En algunas realizaciones, la sensibilidad del ensayo puede ser de aproximadamente el 70%, 80%, 90%, 95%, 98% o más, p. ej., del 100%. Por especificidad, se quiere decir la proporción de "negativos" que se identifican correctamente como tales. Como se ha discutido anteriormente, el término "especificidad", cuando se usa aquí con respecto a los métodos de predicción y/o evaluación, se utiliza para referirse a la capacidad para predecir o evaluar un embrión para determinar la probabilidad de que el embrión no se desarrolle a un blastocisto o un blastocisto utilizable valorando, determinando, identificando o seleccionando embriones que no es probable que alcancen el estadio de blastocisto y/o el estadio de blastocisto utilizable. Se puede representar esto matemáticamente como:

$$\text{Especificidad} = \frac{(\text{Número de negativos reales})}{(\text{Número de negativos reales} + \text{Número de falsos positivos})}$$

Por lo tanto, en un método en el que los positivos son los embriones que es probable que alcancen el estadio de blastocisto y/o el estadio de blastocisto utilizable (es decir, que es probable que se desarrollen a blastocistos), y los negativos son los embriones que no es probable que alcancen el estadio de blastocisto (es decir, que no es probable que se desarrollen a blastocistos), una especificidad del 100% significa que la prueba reconoce todos los embriones que no se desarrollarán a blastocistos, es decir, que se detendrán antes del estadio de blastocisto. En algunas realizaciones, la especificidad puede ser una "elevada especificidad" del 70%, 72%, 75%, 77%, 80%, 82%, 85%, 88%, 90%, 92%, 95%, 98% o más, p. ej., del 100%. Como se demuestra en las secciones de ejemplos más adelante, el uso de dos parámetros proporciona una sensibilidad del 40%, 57%, 68%, 62%, 68%, y una especificidad del 86%, 88%, 83%, 83%, 77%, respectivamente. En otras palabras, en una realización ejemplar, los métodos de la invención son capaces de identificar correctamente el número de embriones que se van a desarrollar a blastocistos al menos aproximadamente un 40%-68% del tiempo (sensibilidad), y el número de embriones que van a detenerse antes del estadio de blastocisto al menos aproximadamente un 77%-88% del tiempo (especificidad), independientemente del modelo de algoritmo empleado, y como tal la presente invención proporciona un método de elevada especificidad para identificar los embriones que se detendrán antes del estadio de blastocisto y no se desarrollarán a blastocistos. Además, se pueden modificar los valores medios y/o los puntos de corte especificados dependiendo del conjunto de datos utilizado para calcular estos valores, así como de la aplicación específica.

En algunas realizaciones, se puede usar la medición de los parámetros celulares como adjunto a la clasificación morfológica. Por ejemplo, se pueden clasificar los embriones el día 1, día 2, día 3, día 4 y/o día 5 en cuanto al número de células, el tamaño celular, la simetría de los blastómeros, la forma celular, la formación pronuclear, el número pronuclear, la multinucleación, el tamaño de los embriones, el grado de compactación, el grado de expansión y/o la fragmentación. En una realización, se mide la presencia o ausencia de fragmentación. En otra realización, se mide el grado, volumen o patrón de la fragmentación. En aún otra realización, se mide el porcentaje de fragmentación. En una realización particular, se clasifican los embriones el día 3 en cuanto al número de células, el porcentaje de fragmentación y la simetría de los blastómeros. En base a estos parámetros morfológicos, se clasifican los embriones como "buenos" o "regulares" o "malos". En una realización, se determina que los embriones son embriones de "buena" calidad por clasificación morfológica cuando contienen 6-10 células, tienen menos de aproximadamente un 10% de fragmentación y una simetría perfecta. En otra realización, se determina que los embriones son embriones de "buena" calidad por clasificación morfológica cuando tienen 7-8 células, menos de un 10% de fragmentación y una simetría perfecta. Por el contrario, se determina que un embrión es de "mala" calidad por valoración morfológica cuando tiene menos de 6 o más de 10 células el día 3, por ejemplo, menos de 7 o más de 8 células, tiene más de aproximadamente un 10% de fragmentación y/o tiene blastómeros asimétricos. Se determina que un embrión es de "regular" calidad cuando queda entre la definición de "bueno" y "malo". Por ejemplo, cuando el embrión tiene 6-10 células y menos de un 10% de fragmentación, pero blastómeros menos de perfectamente simétricos. La clasificación morfológica del día 3 es bien conocida en la técnica y puede variar según el embriólogo. El Istanbul Consensus Workshop on Embryo Assessment: Proceedings of an expert meeting, publicado en 2011 en el Volumen 22 de Reproductive Biomedicine Online, proporciona una discusión extensa del estado de la técnica con respecto a la clasificación morfológica del Día 3. Se han publicado otras revisiones similares por Montag *et al.* (2011); Desai *et al.* (2000); y Machtinger y Racowsky (2013). Además, se discute ampliamente la variabilidad en la clasificación morfológica entre embriólogos, que es un sello distintivo de la clasificación morfológica y que la presente invención ayuda a remediar, en Paternot *et al.* (2009). Se incorporan aquí todos estos documentos específicamente y por completo como referencia en su totalidad. Por lo tanto, un experto en la técnica entendería que se puede usar cualquier clasificación morfológica del día 3 con los métodos de la presente invención.

En una realización particular, se usan las mediciones de los parámetros celulares como adyuvante de la morfología tradicional analizando al mismo tiempo tanto los parámetros celulares como la morfología. Por ejemplo, en un embrión que se determina que es "bueno" por valoración morfológica, un embriólogo determinará si también se considera que el embrión "bueno" es "bueno" por medición de los parámetros celulares (es decir, que tiene un intervalo entre citocinesis 1 y citocinesis 2 de aproximadamente 8-15 horas, por ejemplo, aproximadamente $11 \pm 2,1$ horas, y/o un intervalo entre citocinesis 2 y citocinesis 3 inferior a aproximadamente 3 horas, por ejemplo, aproximadamente $1 \pm 1,6$ horas). En casos tales en los que tanto la valoración morfológica como la valoración de las mediciones de los parámetros celulares determinan que el embrión es "bueno", se seleccionará el embrión para implantación en la hembra receptora o para congelación para futura implantación. De forma similar, cuando tanto la valoración morfológica como la medición de los parámetros celulares determinan que el embrión es de "mala" calidad, se deseleccionará ese embrión para no ser transferido a una hembra. Cuando la valoración morfológica muestra que un embrión es de "buena" calidad y la valoración de las mediciones de los parámetros celulares muestra que el embrión es de "mala" calidad, no se debería seleccionar el embrión para implantación en una hembra, sino que más bien debería ser deseleccionado, o congelado para mayor análisis en caso de que no se encontraran embriones de mejor calidad (es decir, embriones que se determina que tienen "buena" calidad tanto por valoración morfológica como por valoración de las mediciones de los parámetros celulares). Cuando se determina que un embrión es de "mala" calidad por clasificación morfológica, pero de "buena" calidad por valoración de las mediciones de los parámetros celulares, no se debería seleccionar el embrión, o se le debería deseleccionar para no transferirlo a una hembra o congelar para

posterior análisis en caso de no encontrar embriones de mejor calidad (es decir, embriones que se determina que tienen "buena" calidad tanto por valoración morfológica como por valoración de las mediciones de los parámetros celulares).

De manera alternativa, se pueden hacer la valoración morfológica y la valoración de las mediciones de los parámetros celulares secuencialmente. Por ejemplo, un embriólogo determinará si el embrión es o no de "buena" calidad o de "mala" calidad por valoración morfológica el día 3. Si el embrión es de valoración morfológica "mala", se deseleccionará el embrión y no se harán más pruebas de parámetros celulares. Por el contrario, si se determina que el embrión tiene una "buena" calidad por valoración morfológica el día 3, se seguirá analizando el embrión para determinar el intervalo entre citocinesis 1 y citocinesis 2 y/o el intervalo entre citocinesis 2 y citocinesis 3, para determinar si el embrión es de "buena" o "mala" calidad por valoración de las mediciones de los parámetros celulares. Si la valoración de las mediciones de los parámetros celulares determina que el embrión es de "buena" calidad, se seleccionará ese embrión para transferencia a una hembra o se congelará para posterior transferencia. Por el contrario, si se determina que el embrión tiene una "mala" calidad por valoración de las mediciones de los parámetros celulares, no se selecciona ese embrión para transferencia o se deselecciona o se congela para posterior evaluación en caso de no encontrar embriones de mejor calidad.

En algunas realizaciones, la valoración de un embrión o célula pluripotente incluye la creación de un informe por escrito que incluye la valoración del experto del embrión/célula pluripotente en cuestión, p. ej., "valoración/selección/determinación de embriones que es probable y/o que no es probable que alcancen el estadio de blastocisto y/o el estadio de blastocisto utilizable", una "valoración de anomalías cromosómicas", etc. Por lo tanto, un método en cuestión puede incluir además una etapa de creación o elaboración de un informe que aporte los resultados de dicha valoración, pudiéndose presentar dicho informe en forma de un medio electrónico (p. ej., una exhibición electrónica en una pantalla de ordenador), o en forma de un medio tangible (p. ej., un informe impreso en papel u otro medio tangible).

Un "informe", tal como se describe aquí, es un documento electrónico o tangible que incluye elementos de informe que aportan información de interés en relación a una valoración a la que se ha llegado por los métodos de la invención. Se puede generar un informe en cuestión completa o parcialmente de manera electrónica. Un informe en cuestión incluye al menos una valoración de la probabilidad del embrión o célula pluripotente en cuestión de alcanzar el estadio de blastocisto y/o el estadio de blastocisto utilizable, una valoración de la probabilidad de la existencia de anomalías cromosómicas, etc. Un informe en cuestión puede además incluir uno o más de: 1) información concerniente a la instalación del estudio; 2) información del proveedor de servicios; 3) datos de la persona; 4) datos de las muestras; 5) una sección de informe de valoración detallado, que proporcione información sobre cómo se llegó a la valoración, p. ej., a) mediciones de parámetros celulares tomadas, b) valores de referencia empleados, de haberlos; y 6) otras características.

El informe puede incluir información acerca de la instalación del estudio, siendo esta información relevante para el hospital, la clínica o el laboratorio en donde se realizaron la recogida de muestras y/o la generación de datos. La recogida de muestras puede incluir cómo se generó la muestra, p. ej., cómo se recogió de un 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 relativos, por ejemplo, al nombre y la localización de la instalación del estudio, a la identidad del técnico de laboratorio que realizó el ensayo y/o que introdujo los datos de entrada, a la fecha y la hora en que se realizó y/o analizó el ensayo, a la localización en donde se guardan la muestra y/o los datos de los resultados, al número de lote de los reactivos (p. ej., kit, etc.) usados en el ensayo y similares. Se pueden rellenar, en general, los campos del informe con esta información usando la información proporcionada por el usuario.

El informe puede incluir información acerca del proveedor de servicios, que puede localizarse fuera de la instalación sanitaria en la que se localiza el usuario, o dentro de la instalación sanitaria. Como ejemplos de dicha información, se pueden incluir el nombre y la localización del proveedor de servicios, el nombre del revisor y, cuando sea necesario o se desee, el nombre del individuo que realizó la preparación de las muestras y/o la generación de datos. Se pueden rellenar, en general, los campos del informe con esta información usando datos introducidos por el usuario, que se pueden seleccionar de entre selecciones preescritas (p. ej., usando un menú desplegable). Otra información del proveedor de servicios en el informe puede incluir información de contacto para información técnica sobre el resultado y/o sobre el informe interpretativo.

El informe puede incluir una sección de datos de las personas, incluyendo la historia médica de las personas de las que se recogieron oocitos o células pluripotentes, la edad de la paciente, las características de los ciclos de fertilización *in vitro* (p. ej., índice de fertilización, nivel de hormona estimulante del folículo (FSH) el día 3) y, cuando se recogen oocitos, los parámetros de las cohortes de cigotos/embriones (p. ej., número total de embriones). Se pueden integrar estos datos de las personas para mejorar la valoración de los embriones y/o para ayudar a determinar el número óptimo de embriones para transferir. El informe puede también incluir datos administrativos de las personas (es decir, datos que no son esenciales para la valoración de la probabilidad de alcanzar el estadio de blastocisto), tales como información para identificar a la persona (p. ej., nombre, fecha de nacimiento (FDN) de la persona, sexo, dirección postal y/o de residencia, número de expediente médico (NEM), número de habitación y/o de cama en una instalación sanitaria), información de seguros y similares), el nombre del médico de la persona o de otro profesional de la salud

que solicitara la valoración del potencial de desarrollo y, si es diferente del médico solicitante, el nombre de un médico de la plantilla que es responsable de la atención a la persona (p. ej., médico de atención primaria).

El informe puede incluir una sección de datos de la muestra, que puede aportar información sobre la muestra biológica analizada en la valoración, tal como el tipo de muestra (embrión o célula pluripotente, y tipo de célula pluripotente), cómo se manipuló la muestra (p. ej., temperatura de almacenamiento, protocolos preparatorios) y la fecha y hora de la recogida. En general, se pueden rellenar los campos del informe con esta información usando datos introducidos por el usuario, algunos de los cuales se pueden proporcionar como selecciones preescritas (p. ej., usando un menú desplegable).

El informe puede incluir una sección de informe de valoración, que puede incluir información relativa a cómo se llegó a las valoraciones/determinaciones como aquí se describe. El informe interpretativo puede incluir, por ejemplo, imágenes en lapso temporal del embrión o la célula pluripotente que se esté valorando y/o resultados de la expresión génica. La porción de valoración del informe puede también incluir opcionalmente una sección de recomendación(es). Por ejemplo, cuando los resultados indican que es probable que el embrión alcance el estadio de blastocisto y/o el estadio de blastocisto utilizable, la recomendación puede incluir una recomendación de trasplantar un número limitado de embriones al útero durante el tratamiento de fertilidad como se recomienda en la técnica.

También se apreciará fácilmente que los informes pueden incluir elementos adicionales o elementos modificados. Por ejemplo, cuando es electrónico, el informe puede contener hiperenlaces que señalen a bases de datos internas o externas que proporcionen información más detallada sobre elementos seleccionados del informe. Por ejemplo, el elemento de los datos de la paciente del informe puede incluir un hiperenlace a un expediente electrónico de la paciente, o un sitio para acceder a dicho expediente de la paciente, manteniéndose dicho expediente de la paciente en una base de datos confidencial. Esta última realización puede ser de interés en un sistema intrahospitalario o un marco intraclínico. Cuando está en formato electrónico, se registra el informe en un medio físico adecuado, tal como un medio leíble por ordenador, p. ej., en una memoria de ordenador, un dispositivo 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 incluya, en general, al menos los elementos suficientes para proporcionar el análisis solicitado por la usuaria (p. ej., una valoración de la probabilidad de alcanzar el estadio de blastocisto).

Como se ha discutido anteriormente, se pueden usar los métodos aquí descritos para valorar embriones o células pluripotentes para determinar la probabilidad de los embriones o las células pluripotentes de alcanzar el estadio de blastocisto y/o el estadio de blastocisto utilizable. Se puede usar esta determinación de la probabilidad de los embriones o las células pluripotentes de alcanzar el estadio de blastocisto y/o el estadio de blastocisto utilizable para guiar las decisiones y/o acciones clínicas. Por ejemplo, con objeto de aumentar los índices de gestación, los clínicos con frecuencia transfieren múltiples embriones a las pacientes, para dar potencialmente como resultado gestaciones múltiples que plantean riesgos para la salud tanto para la madre como para los fetos. Usando los resultados obtenidos de los métodos de la invención, se puede determinar la probabilidad de alcanzar el estadio de blastocisto y/o el estadio de blastocisto utilizable para los embriones que se están transfiriendo. Como es más probable que los embriones o las células pluripotentes que es probable que alcancen el estadio de blastocisto y/o el estadio de blastocisto utilizable se desarrollen a fetos, la determinación de la probabilidad del embrión de alcanzar el estadio de blastocisto y/o el estadio de blastocisto utilizable antes del trasplante permite al practicante decidir cuántos embriones transferir para maximizar la probabilidad de éxito de una gestación a término completo minimizando al mismo tiempo el riesgo.

Las valoraciones hechas siguiendo los métodos aquí descritos pueden también hallar uso en la clasificación de embriones o células pluripotentes en un grupo de embriones o células pluripotentes en cuanto a su probabilidad de que los embriones o las células pluripotentes alcancen el estadio de blastocisto, así como en cuanto a la calidad del blastocisto que se alcance (p. ej., en algunas realizaciones esto incluiría la probabilidad de alcanzar el estadio de blastocisto utilizable). Por ejemplo, en algunos casos, múltiples embriones pueden ser capaces de desarrollarse en blastocistos, es decir, que es probable que múltiples embriones alcancen el estadio de blastocisto. Sin embargo, será más probable que algunos embriones alcancen el estadio de blastocisto, es decir, que tendrán una mayor probabilidad de alcanzar el estadio de blastocisto, o una mayor probabilidad de alcanzar el estadio de blastocisto utilizable, que otros embriones. En algunas realizaciones, será probable que algunos embriones alcancen el estadio de blastocisto utilizable. En tales casos, se pueden usar los métodos aquí descritos para clasificar los embriones en el grupo. En dichos métodos, se miden uno o más parámetros celulares por cada embrión/célula pluripotente para llegar a una medición de parámetros celulares para cada embrión/célula pluripotente. Se emplean entonces la una o más mediciones de parámetros celulares de cada uno de los embriones o células pluripotentes para determinar la probabilidad de los embriones o células pluripotentes en relación unos de otros de alcanzar el estadio de blastocisto y/o de ser un blastocisto utilizable. En algunas realizaciones, se emplean las mediciones de los parámetros celulares de cada uno de los embriones o células pluripotentes comparándolas directamente entre sí para determinar la probabilidad de alcanzar el estadio de blastocisto y/o el estadio de blastocisto utilizable. En algunas realizaciones, se emplean las mediciones de los parámetros celulares de cada uno de los embriones o células pluripotentes comparando las mediciones de los parámetros celulares con una medición de parámetros celulares de un embrión/célula pluripotente de referencia para determinar la probabilidad de alcanzar el estadio de blastocisto y/o el estadio de blastocisto utilizable para cada embrión/célula pluripotente, y comparando luego la determinación de la probabilidad de alcanzar el estadio de blastocisto y/o el estadio de blastocisto utilizable para cada embrión/célula pluripotente para

determinar la probabilidad de alcanzar el estadio de blastocisto y/o el estadio de blastocisto utilizable de los embriones o células pluripotentes en relación unos de otros.

De este modo, un practicante que valore, por ejemplo, múltiples cigotos/embriones puede escoger sólo los embriones de mejor calidad, es decir, aquéllos que tienen la mejor probabilidad de alcanzar el estadio de blastocisto y/o el estadio de blastocisto utilizable, para su transferencia, con objeto de maximizar la probabilidad de éxito de una gestación a término completo minimizando al mismo tiempo el riesgo. Por el contrario, el practicante puede minimizar el riesgo de transferir un embrión que no es probable que lleve a una gestación exitosa deseleccionando embriones que se ha determinado que no es probable que alcancen el estadio de blastocisto o el estadio de blastocisto utilizable.

También se proporcionan reactivos, dispositivos y kits de los mismos para llevar a la práctica uno o más de los métodos antes descritos. Los reactivos, dispositivos y kits de los mismos en cuestión pueden variar mucho. Como reactivos y dispositivos de interés, se incluyen los mencionados anteriormente con respecto a los métodos de medición de cualquiera de los parámetros celulares antes mencionados, donde dichos reactivos pueden incluir placas de cultivo, medios de cultivo, microscopios, programas de obtención de imágenes, programas de análisis de imagen, cebadores de ácidos nucleicos, matrices de sondas de ácidos nucleicos, anticuerpos, reactivos de sistemas de producción de señales, etc., dependiendo del protocolo de medición particular que haya que realizar.

Además de los componentes anteriores, los kits en cuestión incluirán también instrucciones para la práctica de los métodos en cuestión. Estas instrucciones pueden estar presentes en los kits en cuestión 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, p. ej., una pieza o piezas de papel sobre el cual se imprime la información, en el envase del kit, en un prospecto del envase, etc. Aún otro medio sería un medio leíble por ordenador, p. ej., un disquete, CD, etc., en el que se haya grabado la información. Aún otro medio que puede estar presente es una dirección de sitio web que se puede usar a través de internet para acceder a la información en un sitio eliminado. Puede estar presente cualquier medio conveniente en los kits.

Algunos de los métodos antes descritos requieren la capacidad de observar el desarrollo de los embriones y de las células madre por imagen de lapso temporal. Se puede conseguir esto usando cualquier sistema capaz de obtener imágenes de lapso temporal, incluyendo el sistema Eeva descrito en WO 2012/047678, el Embryoscope descrito en US 2010/041090, US 2012/0309043, US 2013/0102837, US 2011/0183367, US 2011/01656909, US 2011/0111447, WO 2012/163363, WO 2013/004239, WO 2013/029625, y el sistema Primovision descrito en US 2012/0140056, o cualquier otro sistema de imagen de lapso temporal capaz de analizar y/o medir los parámetros reivindicados y las características morfológicas de un embrión. Se incorpora aquí cada una de estas referencias como referencia en su totalidad. Se puede conseguir esto usando un sistema constituido por una serie de microscopios multicanal en miniatura que se puede encajar dentro de una incubadora estándar. Esto permite obtener la imagen de múltiples muestras rápida y simultáneamente sin tener que mover físicamente las placas. Un prototipo ilustrativo, mostrado en la Fig. 22 de la Patente Estadounidense Nº 7.963.906, consiste en una serie de microscopios de 3 canales con iluminación de campo oscuro, aunque se podrían usar otros tipos de iluminación. Por "tres canales", se quiere decir que hay tres microscopios independientes que obtienen la imagen de tres placas de cultivo distintas simultáneamente. Se usa un motor de pasos para ajustar la posición focal para enfocar o adquirir pilas de imágenes en 3D. Se usan LED de luz blanca para iluminación, aunque hemos observado que, para embriones humanos, el uso de LED rojos o próximos al infrarrojo (IR) puede mejorar el índice de contraste entre las membranas celulares y las porciones internas de las células. Este índice de contraste mejorado puede ayudar con el análisis de imagen tanto manual como automatizado. Además, moverse a la región del infrarrojo puede reducir la fototoxicidad para las muestras. Se capturan imágenes mediante cámaras web de alta resolución y bajo coste, pero se pueden usar otros tipos de cámaras.

Como se muestra en la Fig. 22 de la Patente Estadounidense Nº 7.963.906, se usa cada microscopio del sistema prototipo antes descrito para obtener la imagen de una placa de cultivo que puede contener cualquier número entre 1 y 30 de embriones. El microscopio recoge luz de un LED de luz blanca conectado a un disipador de calor para ayudar a disipar cualquier calor generado por el LED, que es muy pequeño para tiempos de exposición breves. La luz pasa a través de una zona de campo oscuro convencional para detener la luz directa, a través de una lente condensadora y sobre una "placa de Petri" marcada con el espécimen, que es una placa de cultivo que soporta los embriones que se están cultivando y estudiando. La placa de cultivo puede tener pocillos que ayudan a mantener el orden de los embriones y evitan que se muevan mientras se transporta la placa hacia y desde la incubadora. Los pocillos pueden estar espaciados lo suficientemente próximos entre sí como para que los embriones puedan compartir la misma gota de medio. Se pasa luego la luz dispersada a través de un objetivo de microscopio, después a través de un doblete achromat y sobre un sensor CMOS. El sensor CMOS actúa como una cámara digital y se conecta a un ordenador para el análisis y rastreo de imagen como se ha descrito anteriormente.

Se puede llevar este diseño fácilmente a escala para obtener significativamente más canales y diferentes técnicas de iluminación, y se puede modificar para acomodar dispositivos de fluidos para alimentar las muestras. Además, se puede integrar el diseño con un sistema de control de retroalimentación, donde se optimizan condiciones de cultivo tales como temperatura, CO₂ (para controlar el pH) y medios en tiempo real en base a la retroalimentación y a partir de los datos de imágenes. Se usó este sistema para adquirir vídeos de lapso temporal del desarrollo de embriones humanos, lo cual tiene utilidad en la determinación de la viabilidad de los embriones para procedimientos de fertilización *in vitro* (FIV). Otras aplicaciones incluyen terapia de células madre, cribado de fármacos e ingeniería de

tejidos.

En una realización del dispositivo, se proporciona iluminación mediante un diodo emisor de luz (LED) blanca Luxeon montado sobre un disipador de calor de aluminio y alimentado por un controlador regulado por corriente BuckPuck. Se pasa la luz procedente del LED a través de una lente colimadora. La luz colimada pasa entonces a través de un diafragma de zona maquinado por láser a medida, como se muestra en la Fig. 22 de la Patente Estadounidense N° 7.963.906, y se enfoca en un cono hueco de luz usando una lente condensadora esférica. La luz que se transmite directamente a través de la muestra es rechazada por el objetivo, mientras que se recoge la luz dispersada por la muestra. En una realización, se usan objetivos Olympus con aumento 20X, aunque se pueden usar menores aumentos para aumentar el campo de visión, o se pueden usar mayores aumentos para aumentar la resolución. La luz recogida pasa entonces a través de una lente de doblete achromat (es decir, lente de tubo) para reducir los efectos de aberración cromática y esférica. De manera alternativa, la luz recogida procedente del objetivo de imagen puede pasar a través de otro objetivo, que señala en la dirección opuesta, que actúa como reemplazo de la lente de tubo. En una configuración, el objetivo de imagen puede ser un objetivo 10X, mientras que el objetivo de la lente de tubo puede ser un objetivo 4X. Se captura la imagen resultante mediante un sensor CMOS con resolución de 2 megapíxeles (1600 x 1200 píxeles). También se pueden usar diferentes tipos de sensores y resoluciones.

Por ejemplo, la Fig. 23A de la Patente Estadounidense N° 7.963.906 muestra un esquema de la serie de microscopios multicanal que tiene 3 microscopios idénticos. Todos los componentes ópticos están montados en tubos de lente. En la operación del sistema de serie, se cargan placas de Petri sobre plataformas acrílicas que están montadas sobre platinas basculantes de 2 ejes manuales, que permiten el ajuste del plano de imagen en relación al eje óptico. Estas platinas se fijan a la base del microscopio y no se mueven tras la alineación inicial. Los módulos de iluminación, consistentes en los LED, las lentes colimadoras, los diafragmas de zona y las lentes condensadoras, están montados sobre platinas xyz manuales para posicionar y enfocar la luz de iluminación. Los módulos de imagen, consistentes en los objetivos, las lentes achromat y los sensores CMOS, están también montados sobre platinas xyz manuales para posicionar el campo de visión y enfocar los objetivos. Los 3 módulos de imagen se unen a portaobjetos lineales y están soportados por un solo brazo de palanca, que se acciona usando un motor de pasos. Esto permite un enfoque controlado por ordenador y una captura automática de pilas de imágenes. Se pueden usar otros métodos de enfoque automático, así como de accionamiento.

Se puso la serie de microscopios dentro de una incubadora estándar, como se muestra en, por ejemplo, la Fig. 23B de la Patente Estadounidense N° 7.963.906. Los sensores de imagen CMOS se conectan mediante una conexión USB a un único hub localizado dentro de la incubadora, que se dirige a un PC externo junto con otros cables de comunicación y eléctricos. Todos los cables eléctricos salen de la incubadora a través del centro de un tapón de caucho sellado con pegamento de silicona.

Se puede usar la serie de microscopios antes descrita, o una similar, para registrar imágenes en lapso temporal del desarrollo precoz de embriones humanos y el crecimiento documentado a partir del cigoto a través de los estadios de blastocisto. En algunas realizaciones, se pueden capturar imágenes cada 5 minutos con aproximadamente 1 segundo de baja exposición a la luz por imagen. La cantidad total de luz recibida por las muestras puede ser equivalente a 24 minutos de exposición continua, similar al nivel total experimentado en una clínica de FIV durante la manipulación. La duración de 1 segundo de exposición a la luz por imagen puede reducirse en algunas realizaciones. Antes de trabajar con los embriones humanos, realizamos experimentos de control exhaustivos con embriones de ratón preimplantación para asegurarnos de que tanto el índice de formación de blastocistos como los patrones de expresión génica no se afectaban por el proceso de imagen.

Se puede hacer un seguimiento de embriones individuales a lo largo del tiempo, incluso aunque sus posiciones en el campo fotográfico cambiaran al sufrir los embriones un cambio de medio; en algunos casos, se cambió el medio el día 3. El uso de medios secuenciales es necesario para cumplir con los requerimientos específicos de estadio de los embriones en desarrollo. Durante el cambio de medio, se retiraron los embriones de la estación de imagen durante unos minutos y se transfirieron a nuevas placas de Petri. Con objeto de seguir el rastro de la identidad de cada embrión durante el cambio de medio, se grabó en vídeo la transferencia de las muestras de una placa a la otra para verificar que los embriones no se habían mezclado. También se usó este procedimiento durante la recogida de muestras para el análisis de la expresión génica. Se puede mitigar el problema del rastreo de la identidad de los embriones usando pocillos para ayudar a organizar los embriones en un orden particular.

Placa de Petri con micropocillos

Cuando se transfieren las placas de Petri entre diferentes estaciones, los embriones pueden a veces moverse, haciendo así difícil seguir el rastro de la identidad de los embriones. Esto plantea un reto cuando se realiza la obtención de imágenes de lapso temporal en una estación, y los embriones se mueven posteriormente a una segunda estación para la selección y transferencia de los embriones. Un método consiste en cultivar los embriones en placas de Petri individuales. Sin embargo, esto requiere que cada embrión tenga su propia gota de medio. En un procedimiento de FIV típico, es normalmente deseable cultivar todos los embriones de una paciente en la misma placa de Petri y en la misma gota de medio. Para abordar este problema, hemos diseñado una placa de Petri a medida con micropocillos. Esto evita que los embriones se muevan y mantiene su disposición en la placa de Petri cuando se transfieren a y de la incubadora o las estaciones de imagen. Además, los pocillos son lo suficientemente pequeños y están espaciados

próximos entre sí, de tal modo que pueden compartir la misma gota de medio y ser todos visualizados simultáneamente por el mismo microscopio. La superficie de fondo de cada micropocillo tiene un acabado de calidad óptica. Por ejemplo, la Fig. 27A en la Patente Estadounidense N° 7.963.906 muestra un dibujo con dimensiones para una realización ejemplar. En esta versión, hay 25 micropocillos espaciados próximos entre sí en un campo de visión de 1,7 x 1,7 mm. La Fig. 27B de la Patente Estadounidense N° 7.963.906 muestra una vista en 3D de los micropocillos, que están rebajados aproximadamente 100 micras en la superficie de la placa. Se incluyen marcadores fiduciaros, incluyendo letras, números y otras marcas, en la placa para ayudar a la identificación. Se incorporan todas las referencias aquí citadas como referencia en su totalidad.

Ejemplos

Se presentan los siguientes ejemplos para proporcionar a los expertos en la técnica una divulgación y descripción de cómo hacer y usar la presente invención, y no pretenden limitar el alcance de lo que los inventores consideran como su invención ni pretenden representar que los siguientes experimentos son todos o los únicos experimentos realizados. Se han hecho esfuerzos para asegurar la exactitud con respecto a los números usados (p. ej., cantidades, temperatura, etc.), pero habría que tener en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique algo diferente, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular medio ponderal, la temperatura es en grados Centígrados y la presión es, o está próxima a, la atmosférica.

Ejemplo 1

Este ejemplo describe el desarrollo de un modelo de predicción de blastocistos y su utilidad en una clínica de FIV.

Métodos

Para desarrollar el modelo de predicción de blastocistos, se realizó un estudio clínico para recoger datos de 3 sitios, 54 personas y 292 embriones. Se cultivaron los embriones usando procedimientos estándar en un laboratorio de FIV y se obtuvo su imagen a intervalos de 5 minutos dentro de la incubadora. Analizando retrospectivamente los datos de imagen, se vio que la cuantificación de la cadencia de la división celular precoz hasta aproximadamente 48 horas tras la fertilización podía predecir si un embrión se convertiría en un blastocisto el día 5 con un alto grado de especificidad. Durante este análisis, se vio que el tiempo entre la 1ª y la 2ª mitosis (p2) y el tiempo entre la 2ª y la 3ª mitosis (p3) contribuía significativamente al poder predictivo del modelo de predicción. Por lo tanto, el modelo de predicción de blastocistos se basaba en el tiempo entre la 1ª y la 2ª mitosis (p2) y el tiempo entre la 2ª y la 3ª mitosis (p3).

La Figura 2 muestra un gráfico de todos los embriones en el estudio de desarrollo, con el intervalo de los tiempos P2 representado a lo largo del eje horizontal, y los tiempos P3 representados en el eje vertical. La tabla adjunta muestra los marcos temporales para P2 y P3 que se vio que eran predictivos de la formación de blastocistos.

Tabla 1. Intervalos predictivos de P2 y P3

P2: 2ª Mitosis	P3: 3ª Mitosis
De 9,33 a 11,45 horas	0 - 1,73 horas

En el uso clínico del modelo de predicción de blastocistos, se comparan las mediciones de los sucesos P2 y P3 con las ventanas temporales predictivas de blastocistos validadas. Se pueden hacer las mediciones de los parámetros manualmente revisando las imágenes, semiautomáticamente con ayuda de programas informáticos o herramientas de anotación, o de un modo completamente automatizado usando un programa de análisis de imagen. Si ambos sucesos están dentro de las ventanas predictivas, el modelo predice que el embrión tiene una Elevada Probabilidad de alcanzar el estadio de blastocisto. Si uno o ambos sucesos quedan fuera de las ventanas predictivas, el modelo predice que el embrión tiene una Baja Probabilidad de alcanzar el estadio de blastocisto.

Interpretación de los datos

En el marco de un laboratorio clínico de embriología, el proceso de selección de embriones estándar para un embriólogo clínico (EC) comienza con la evaluación de la cohorte de embriones con un microscopio de reproducción asistida. Se recoge la información sobre morfología en una hoja de trabajo de laboratorio y se devuelven los embriones a la incubadora. A continuación, se usa la información de la hoja de trabajo para categorizar o "clasificar" los embriones. Los EC revisan los datos de la cohorte de embriones y, en general, siguen una de dos estrategias de clasificación.

Estrategia de clasificación 1: Si la mayoría de los embriones son de *buena morfología*, el EC (1) "deseleccionará" los embriones de peor calidad para una mayor consideración, (2) seleccionará el(los) mejor(es) embrión(es) para transferencia, y (3) determinará cuáles de los embriones restantes serán criopreservados.

Estrategia de clasificación 2: Si la mayoría de los embriones son de *morfología mala*, el EC (1) seleccionará el(los) mejor(es) embrión(es) para transferencia, (2) identificará los embriones que no se han de transferir, y (3) determinará

cuáles de los embriones serán criopreservados.

El reto crítico para este proceso de selección se produce cuando una paciente tiene más embriones de buena morfología que el número de embriones planeado para la transferencia. Es sabido que, cuando se evalúan prospectivamente embriones en el marco clínico, casi un 50% de los embriones con buena morfología el Día 3 no progresan hasta convertirse en blastocistos hacia el Día 5. De manera alternativa, mirando retrospectivamente, un 80% de los embriones que se convierten en blastocistos exhiben buena morfología el Día 3. Como resultado, la selección de embriones usando morfología tradicional se caracteriza por un índice elevado de predicción de falsos positivos. En otras palabras, la morfología tradicional tiene una elevada sensibilidad para identificar embriones de buena morfología el Día 3, pero muy baja especificidad para seleccionar entre los embriones de buena morfología aquellos que progresarán al estadio de blastocisto y que son buenos candidatos para la transferencia.

Ejemplo 2

Objetivo

Este ejemplo describe el procedimiento usado para desarrollar modelos de clasificación estadísticos para predecir la formación de blastocistos en base a los parámetros de cadencia de predicción de blastocistos.

Desarrollo de modelos

Se recogió el conjunto de datos del estudio clínico para ayudar a construir y evaluar diferentes tipos de modelos de clasificación estadísticos para predecir la formación de blastocistos. Los parámetros de entrada a estos clasificadores fueron los 3 parámetros predictivos (en base al artículo de Wong CC, Loewke KE, Bossert NL, Behr B, De Jonge CJ, Baer TM, Reijo Pera RA. Non-Invasive Imaging of Human Embryos Before Embryonic Genome Activation Predicts Development to the Blastocyst Stage. Nat Biotechnol. 2010 Oct;28(10):1115-21): duración de la primera citocinesis (P1), tiempo entre 1ª y 2ª mitosis (P2) y tiempo entre 2ª y 3ª mitosis (P3).

Se probaron los modelos sobre un conjunto de datos de un estudio clínico exhaustivo. El conjunto de datos consistía en 292 embriones de 45 pacientes. La edad media del huevo es de $33,6 \pm 4,8$. Hay 25 personas con 143 embriones que usaron el método de inseminación de IEIC y 18 personas con 138 embriones que usaron el método de inseminación FIV. Había 2 personas con 11 embriones que usaron tanto IEIC como FIV.

Tabla 2: Representa la calidad del Día 3 de los embriones

	Calidad del Día 3	Total
Número total de embriones		292
Células	Media de células $\pm$ SD	6,7 $\pm$ 1,9
Fragmentación	Sin fragmentación	58/292 (20%)
	1-10%	130/292 (45%)
	11-25%	81/292 (28%)
	>25%	23/292 (8%)
Simetría	Perfecta	169/292 (58%)
	Asimetría moderada	101/292 (34%)
	Asimetría severa	22/292 (7%)
Grado	Bueno	156/292 (54%)
	Regular	97/292 (33%)
	Malo	39/292 (13%)

Resultado de blastocistos

La definición usada para "blastocisto" en este estudio era embriones que formaban blastocistos el día 5 (es decir, blastocistos utilizables) y que posteriormente fueron transferidos o congelados. Se contaron los embriones que no cumplían la definición de blastocisto como Detenidos. Por ejemplo, un embrión que no formó un blastocisto el día 5, o que formó un blastocisto el día 5 pero no fue posteriormente transferido, se denominaría Detenido para este ejemplo.

Se usó esta definición para centrarse en la construcción de modelos predictivos para blastocistos de buena calidad o 'utilizables'. En base a estas definiciones, la prevalencia de la formación de blastocistos utilizables en el conjunto de datos de desarrollo es del 23%.

Mediciones de parámetros

- 5 Se reunió a un panel de 3 embriólogos clínicos expertos. Cada embriólogo revisó independientemente los datos de todos los embriones del Conjunto de Datos de Desarrollo que se cultivaron hasta el Día 5. Los embriólogos estaban ciegos al sitio de estudio, a cualesquiera datos de identificación de las personas, al número total de embriones por persona y a las predicciones del modelo de predicción de blastocistos o de los otros miembros del panel. Se aleatorizó el orden de los embriones presentados a los miembros del panel a partir de toda la colección de embriones evaluables de todas las personas. Cada revisor recibió una lista de trabajo de aleatorización separada usando los mismos embriones.

Usando un visor de película de imágenes, cada miembro del panel revisó todos los embriones del Grupo de Estudio. Evaluaron los embriones uno de cada vez e intentaron identificar el marco de imagen y el momento específico de inicio y parada para cada uno de los 3 sucesos de desarrollo (Figura 1):

- 15 1. Tiempo de inicio P1
2. Tiempo de parada P1 / Tiempo de inicio P2
3. Tiempo de parada P2 / Tiempo de inicio P3
4. Tiempo de parada P3

P1 se define como la duración de la primera citocinesis.

- 20 P2 se define como el intervalo de tiempo entre la primera y la segunda mitosis (al que también se hace referencia como el tiempo de división de 2 células a 3 células o el intervalo de tiempo entre citocinesis 1 y citocinesis 2).

P3 se define como el intervalo de tiempo entre la segunda y la tercera mitosis (al que también se hace referencia como el tiempo de división de 3 células a 4 células o el intervalo de tiempo entre citocinesis 2 y citocinesis 3).

- 25 Si el miembro del panel determinó que el embrión no alcanzó un suceso de desarrollo (es decir, que el embrión se para en algún punto de desarrollo o se detiene), entonces se registró ese punto de tiempo de desarrollo como un "no suceso".

Si un embrión era visible, pero la calidad de imagen era insuficiente para que el miembro del panel emitiera un juicio del estado del embrión (es decir, desenfocado, iluminación insuficiente, etc.), entonces eso se indicó como "mala calidad de imagen".

- 30 Para cada embrión, se exportaron los resultados del panel a un archivo CSV. El archivo CSV contenía los tiempos de inicio/parada y el tiempo transcurrido, o un no suceso para cada uno de los sucesos individualmente de los embriólogos del panel.

Modelos

- 35 Se exploraron varios tipos de modelos, tales como árboles de clasificación, bosques aleatorios, análisis discriminario lineal y cuadrático y Naïve Bayes. Los modelos descritos en este ejemplo son modelos ejemplares.

Los cuatro modelos candidatos se basaban todos ellos en dos parámetros de cadencia que contribuían significativamente al poder predictivo de los modelos: el tiempo entre 1ª y 2ª mitosis (P2), y el tiempo entre 2ª y 3ª mitosis (P3).

Modelo del árbol de clasificación: Existen 2 variaciones del modelo del árbol de clasificación

- 40 Modelo 1: Modelo de árbol de clasificación con Priors empíricamente aprendidos. Se estableció el minparent (es decir, el número K tal que los nodos impuros deben tener K o más observaciones para dividirse) en 50.

Modelo 2: Modelo de árbol de clasificación con Priors iguales (50/50). Se estableció el minparent (es decir, el número K tal que los nodos impuros deben tener K o más observaciones para dividirse) en 75.

Modelo de Naïve Bayes: Existen 2 variaciones del modelo de Naïve Bayes

- 45 Un clasificador de Naïve Bayes asigna una nueva observación a la clase más probable, suponiendo que las características son condicionalmente independientes dado el valor de clase.

Modelo 3: Naïve Bayes con modelo Gaussiano y corte de probabilidad de 0,4041.

Modelo 4: Naïve Bayes con modelo Gaussiano y corte de probabilidad de 0,2944.

Selección de modelo para la validación

Se escogió el modelo 2 para el modelo de predicción de blastocistos para este ejemplo. Después de evaluar los cuatro modelos, hacemos las siguientes observaciones:

- 5 1. Se pueden preferir los modelos de árbol de clasificación debido a su simplicidad y similitud con el modelo usado en Wong *et al.*
2. Los errores de validación cruzada para los dos modelos de árbol de clasificación son muy similares y, por lo tanto, se puede soportar cualquiera de los modelos.
- 10 3. La sensibilidad y la especificidad del 68% y del 83%, respectivamente, del Modelo 2 permiten un modelo de elevada especificidad.
4. Las ventanas de cadencia predichas por el Modelo 2 son altamente relevantes en base a la biología del desarrollo de embriones y a los datos de gestación preliminares (datos no mostrados).

Modelo 1: Parámetros usados en este ejemplo

Árbol de clasificación

15 Minparent = 50

Prior = empírico

Rendimiento sobre datos de entrenamiento:

Sensibilidad = 57%

Especificidad = 88%

20 VPP = 59%

VPN = 87%

Índice de clasificación errónea (sobre datos de entrenamiento): 19%

Índice de clasificación errónea de validación cruzada 10 veces: 25%

25 Se realizó el procedimiento de validación cruzada en Matlab. El método divide la muestra en 10 submuestras, escogidas aleatoriamente pero con un tamaño aproximadamente igual. Las submuestras también tienen aproximadamente las mismas proporciones de clase. Para cada submuestra, el método ajusta un árbol al resto de los datos y lo usa para predecir el resultado en la submuestra. Reúne la información de todas las submuestras para computar el índice de clasificación errónea para toda la muestra.

Modelo 2: Parámetros usados en este ejemplo

30 Árbol de clasificación

Minparent = 75

Prior = igual (50/50)

Rendimiento sobre datos de entrenamiento:

Sensibilidad = 68%

35 Especificidad = 83%

VPP = 55%

VPN = 89%

Índice de clasificación errónea (sobre datos de entrenamiento): 25%

Índice de clasificación errónea de validación cruzada de 10 veces: 30%

40 Se realizó el procedimiento de validación cruzada en Matlab. El método divide la muestra en 10 submuestras, escogidas aleatoriamente pero con un tamaño aproximadamente igual. Las submuestras también tienen

aproximadamente las mismas proporciones de clase. Para cada submuestra, el método ajusta un árbol al resto de los datos y lo usa para predecir el resultado en la submuestra. Reúne la información de todas las submuestras para computar el índice de clasificación errónea para toda la muestra.

Modelo 3: Parámetros de Naïve Bayes usados en este ejemplo

5	Probabilidad anterior de clase $P(\text{blast})=0,3024$
	$E(P2 \text{blast})=10,8454$
	$E(P3 \text{blast})=0,5381$
	$\sigma^2_{P2 \text{blast}} = 0,859$
	$\sigma^2_{P3 \text{blast}} = 0,2191$
10	$E(P2 \text{detención})=11,8749$
	$E(P3 \text{detención})=0,6716$
	$\sigma^2_{P2 \text{detención}} = 1,8873$
	$\sigma^2_{P3 \text{detención}} = 0,3807$
	Corte de probabilidad = 0,4041
15	AUC sobre datos de entrenamiento: 0,793
	Rendimiento sobre datos de entrenamiento para corte de 0,4041:
	Sensibilidad = 62%
	Especificidad = 83%
	VPP = 53%
20	VPN = 88%

Modelo 4: Parámetros de Naïve Bayes usados en este ejemplo

	probabilidad anterior de clase $P(\text{blast})=0,3024$
	$E(P2 \text{blast})=10,8454$
	$E(P3 \text{blast})=0,5381$
25	$\sigma^2_{P2 \text{blast}} = 0,859$
	$\sigma^2_{P3 \text{blast}} = 0,2191$
	$E(P2 \text{detención})=11,8749$
	$E(P3 \text{detención})=0,6716$
	$\sigma^2_{P2 \text{detención}} = 1,8873$
30	$\sigma^2_{P3 \text{detención}} = 0,3807$
	Corte de probabilidad = 0,2944
	AUC sobre datos de entrenamiento: 0,793
	Rendimiento sobre datos de entrenamiento para corte de 0,2944:
	Sensibilidad = 68%
35	Especificidad = 77%
	VPP = 47%
	VPN = 89%

Ejemplo 3

Desarrollo y validación de una nueva prueba para predecir la viabilidad de embriones en base a la imagen de lapso temporal y al rastreo automatizado de células.

Resumen

- 5 El objetivo de este estudio era desarrollar y validar prospectivamente una nueva plataforma de valoración precoz de la viabilidad de los embriones en tiempo real para mejorar la selección de los embriones en laboratorios de fertilización *in vitro* (FIV).

10 La especificidad, el valor predictivo positivo y la precisión global de la identificación de Blastocistos Utilizables (blastocistos considerados adecuados para transferencia o congelación) en la fase de escisión mejoran significativamente cuando se usa la nueva prueba en comparación con la morfología del Día 3 tradicional.

15 Se espera que los nuevos métodos de selección de embriones mejoren los índices de éxito de la FIV y reduzcan la necesidad de transferir múltiples embriones, pero faltan enfoques por etapas para validar nueva tecnología en cuanto a utilidad clínica. En este estudio, se integran marcadores de imagen de lapso temporal científicamente basados con capacidades de rastreo celular para crear el primer método para medir cuantitativamente embriones y generar predicciones de blastocistos en tiempo real, y se valida independientemente el método en cuanto a precisión diagnóstica y utilidad clínica.

20 Éste era un estudio de cohortes prospectivo, multicéntrico, de un solo grupo, no aleatorizado, realizado entre junio de 2011 y febrero de 2012. Se diseñó el estudio para recoger los datos de imagen de embriones seguidos hasta la escisión (Día 3) o el estadio de blastocisto (Día 5), con objeto de caracterizar la seguridad y eficacia del Sistema Eeva™ (Early Embryo Viability Assessment -Valoración Precoz de la Viabilidad de los Embriones-) para predecir qué embriones se desarrollarían a Blastocistos Utilizables. Un total de 160 pacientes dieron su consentimiento para que se obtuvieran imágenes de sus embriones usando Eeva. Embriólogos experimentados trabajaron ciegos al resultado de los embriones, y revisaron independientemente los vídeos en cuanto a intervalos de tiempo específicos de la división celular desde el estadio de 1 hasta el de 4 células, P1 (duración de la primera citocinesis), P2 (tiempo entre citocinesis 1 y 2) y P3 (tiempo entre citocinesis 2 y 3). Se construyó un árbol de clasificación para predecir Blastocistos Utilizables en base a estos intervalos, y se desarrolló un sistema informático de rastreo celular para medir automáticamente las cadencias de la división celular y generar predicciones en tiempo real del desarrollo de embriones. Se validaron las capacidades de predicción y de rastreo celular del programa informático sobre un conjunto independiente de 1.029 embriones y se valoraron en cuanto a rendimiento.

30 Como el criterio de valoración de este estudio era la formación de blastocistos, los criterios de inclusión en el estudio eran: mujeres de al menos 18 años de edad que estaban bajo tratamiento reciente de FIV usando sus propios huevos o huevos de donantes, recuento de folículos antrales (RFA) basales de al menos 8 medido por ultrasonido antes de la estimulación, hormona estimulante del folículo (FSH) basal < 10 UI y al menos 8 oocitos normalmente fertilizados (2PN). Se realizó el estudio en cinco sitios clínicos de FIV en los EE.UU.

35 Se determinó estadísticamente que Eeva predecía una elevada probabilidad de desarrollo de Blastocistos Utilizables cuando tanto P2 como P3 están dentro de intervalos específicos de cadencia de la división celular ($9,33 \leq P2 \leq 11,45$ horas y $0 \leq P3 \leq 1,73$ horas). Usando Eeva prospectivamente sobre un Conjunto de Datos de Validación independiente, la especificidad y el valor predictivo positivo (VPP) para la predicción de blastocistos mejoraban significativamente sobre la predicción media hecha por embriólogos experimentados usando la morfología del Día 3 (especificidad 84,7% vs. 57,0%, $p < 0,0001$; VPP 54,7% vs. 33,7%, $p < 0,0001$). La sensibilidad para la predicción de blastocistos era del 38,0% (IC del 95% del 32,7% al 43,5%), y el VPN era del 73,7% (IC del 95% del 70,4% al 76,8%). Se determinó que el programa informático de rastreo celular tenía una concordancia global con las mediciones y predicciones manuales del 91,0% (IC del 95% del 86,0% al 94,3%).

45 El resultado del estudio de la formación de blastocistos requería hacer pruebas en una población de pacientes cuyos embriones se cultivaron hasta blastocistos; por lo tanto, la validación del rendimiento de Eeva puede ser representativa de un grupo de pacientes con mejor pronóstico. Se abordarán en estudios futuros las características de los embriones de pacientes con menos de 8 folículos antrales y menos de 8 2PN.

50 Hemos desarrollado y validado una plataforma de valoración precoz de la viabilidad de embriones que identifica Blastocistos Utilizables rastreando mediciones cuantitativas de momentos clave de la división celular hasta el estadio de escisión. Las predicciones de Eeva son no invasivas, específicas y fácilmente integradas en el flujo de trabajo de los procedimientos de transferencia del Día 3 o del Día 5. Estos resultados representan una etapa sólida en el estudio riguroso, la evaluación y la validación de una nueva plataforma de selección de embriones en tiempo real para uso en la clínica de FIV.

55 Se espera que los nuevos métodos de selección de embriones mejoren los índices de gestación por fertilización *in vitro* (FIV) y den como resultado una adopción más amplia de la transferencia de un solo embrión (van Montfoort *et al.*, 2005). La valoración de embriones se basa actualmente en la evaluación morfológica altamente subjetiva y variable de sólo unas cuantas instantáneas estáticas del embrión durante su desarrollo. Sin embargo, es bien reconocido que

la morfología tradicional tiene una precisión y una especificidad limitadas para identificar los mejores embriones. Los embriólogos se enfrentan, por consiguiente, a una gran dificultad para discriminar entre embriones de buena morfología aquéllos que tienen la competencia de desarrollo más alta.

Presentamos aquí un estudio clínico para el desarrollo y la validación de una nueva plataforma de valoración precoz de la viabilidad de embriones (Eeva) basada en imagen de lapso temporal no invasiva y cadencias de división celular validadas. El estudio se extiende sobre hallazgos científicos seminales que demostraron que cadencias estrictas de división del ciclo celular pueden a la vez predecir el desarrollo de embriones y reflejar la salud subyacente de embriones humanos preimplantación (Wong *et al.*, 2010). En el estudio, se usó imagen de lapso temporal para investigar una serie de medidas dinámicas, morfológicas y cuantitativas del desarrollo de embriones humanos preimplantación. Se identificó un pequeño conjunto de parámetros de división celular precoz que predecían con precisión la formación de blastocistos viables, y también se sondaron los parámetros clave en cuanto a la significación a nivel de expresión génica. Los objetivos del actual estudio clínico prospectivo eran (1) validar el poder predictivo de esas cadencias de la división celular en marcos clínicos, usando Blastocistos Utilizables (blastocistos considerados adecuados para transferencia o congelación) como resultado; (2) desarrollar un programa informático para rastrear de manera fiable las cadencias de división celular con objeto de permitir una utilidad clínica práctica; (3) demostrar la factibilidad de rastrear con éxito la inmensa mayoría de embriones de los que se obtuvo la imagen, y (4) caracterizar la precisión diagnóstica del sistema integrado sobre un conjunto independiente de embriones, etapas importantes encaminadas a llevar Eeva a la clínica de FIV.

Materiales y métodos

Éste era un estudio clínico prospectivo, ciego, de un solo grupo, no aleatorizado, realizado en cinco sitios clínicos de FIV en los Estados Unidos entre junio de 2011 y febrero de 2012, constituido por dos componentes secuenciales, una fase de Desarrollo y una fase de Validación. Se diseñó el estudio para recoger los datos de imagen de embriones de los que se hizo un seguimiento hasta el estadio de escisión (Día 3) o de blastocisto (Día 5), con objeto de caracterizar la seguridad y la eficacia del Sistema Eeva. El plan de investigación clínica fue aprobado por una Junta de Revisión Institucional (JRI) y registrado en ClinicalTrials.gov (número de estudio NCT01369446). Se obtuvo el consentimiento informado por escrito de todas las participantes en el estudio. Las pacientes que cumplieron los criterios de elegibilidad para la fase de Desarrollo del estudio eran: mujeres de al menos 18 años de edad que estaban bajo tratamiento reciente de FIV usando sus propios huevos o huevos de donantes, recuento de folículos antrales (RFA) basal de al menos 8 medido por ultrasonido antes de la estimulación, y hormona estimulante del folículo (FSH) basal < 10 UI. Para la fase de Validación del estudio, las pacientes que cumplieron los criterios de elegibilidad para la fase de Validación del estudio eran: mujeres de al menos 18 años de edad que estaban bajo tratamiento reciente de FIV usando sus propios huevos o huevos de donantes, recuento de folículos antrales (RFA) basal de al menos 12 medido por ultrasonido antes de la estimulación, hormona estimulante del folículo (FSH) basal < 10 UI y al menos 8 oocitos normalmente fertilizados (2PN). Se diseñaron los criterios de inclusión del estudio para la fase de Validación para capturar a la población de pacientes que planeaban cultivar sus embriones hasta blastocistos, mientras que los criterios de inclusión para la fase de Desarrollo eran menos limitantes e incluían a mujeres con transferencia de embriones el día 3. Los criterios para la exclusión de pacientes en ambas fases eran aquéllas que: usaron un soporte gestacional, usaron esperma recogido quirúrgicamente, usaron oocitos reinseminados, planeaban un diagnóstico genético preimplantación o un cribado genético preimplantación, estaban participando al mismo tiempo en otro estudio clínico, se habían enrolado previamente en este estudio clínico o tenían una historia de tratamiento de cáncer.

Estimulación ovárica, fertilización y cultivo de embriones

Cada sitio clínico siguió sus procedimientos estándar para estimulación ovárica, recogida de oocitos, fertilización y cultivo de embriones. Se sometió a las pacientes a estimulación ovárica según las directrices de cada clínica, donde los protocolos incluían fase lútea agonista, estallido de microdosis de agonista y supresión de antagonistas. El día de la retirada de oocitos (Día 0), se fertilizaron los oocitos usando la discreción del sitio clínico de FIV convencional o inyección de esperma intracitoplásmica (IEIC). Inmediatamente a continuación del chequeo de fertilización, se transfirieron los oocitos fertilizados con éxito (2PN) a una placa de Eeva de múltiples pocillos para cultivo y monitorización en una incubadora estándar a 37°C. La placa de Eeva es una placa de Petri estándar de 35 mm de diámetro hecha de plástico para cultivo de tejidos convencional, con un anillo interno que contiene una serie moldeada con precisión de 25 pocillos (tamaño del pocillo 250 µm de longitud x 250 µm de anchura x 100 µm de profundidad). El formato de micropocillos mantiene los embriones individuales por separado, pero en estrecha proximidad entre sí, bajo una gotita de medio compartida (40 µl de sobrecapa con aceite mineral), mientras que los marcajes fiduciales proporcionan una referencia visual de la localización específica de cada embrión en la serie de la placa. Se realiza el rastreo de pocillos individuales bajo un solo campo óptico de visión, que reduce la necesidad de partes motorizadas, frecuentemente usado en sistemas de imagen para dirigirse individualmente a cada embrión y monitorizarlo (Vajta *et al.*, 2000; Sugimura *et al.*, 2010; Cruz *et al.*, 2011; Meseguer *et al.*, 2011; Hashimoto *et al.*, 2012). Al mismo tiempo, el medio compartido permite el cultivo en grupo, lo que puede mejorar los índices de formación de blastocistos promoviendo la señalización paracrina positiva entre embriones (Rijnders *et al.*, 1999; Blake *et al.*, 2007). A través de todo el cultivo de embriones, se permitió a cada sitio clínico usar sus propios protocolos de laboratorio, incluyendo sus medios de cultivo estándar y su ambiente de incubación (p. ej., CO₂ en aire o bajo O₂).

Imagen de embriones

Se capturaron imágenes de embriones en desarrollo con el Sistema Eeva™ (Early Embryo Viability Assessment), un sistema de imagen de lapso temporal integrado que incluye: (1) la placa de Eeva para cultivar una cohorte de embriones; (2) un microscopio de lapso temporal invertido digital con iluminación de campo oscuro, autoenfoco y cámara de 5 megapíxeles, y (3) un programa de adquisición de imagen para capturar imágenes durante el desarrollo de embriones y para salvar las imágenes que se han de archivar. El microscopio Eeva captura una sola imagen de alta resolución de todos los micropocillos de la placa de Petri una vez cada 5 minutos. Durante el proceso de análisis, el programa de adquisición de imágenes segmenta las imágenes en una serie de subimágenes. Se realiza el análisis por separado para cada embrión, y se paraleliza el cómputo de tal modo que todos los embriones en todos los microscopios pueden ser procesados en tiempo real.

Se diseñó Eeva para registrar el desarrollo de embriones con exposición mínima a la luz de los embriones a partir de un diodo emisor de luz a 625 nm de longitud de onda. Usando un medidor de potencia óptica, se determinó que la potencia de la luz del LED iluminador del Microscopio Eeva es de aproximadamente 0,6 milivatios/cm². Como comparación, la potencia de un microscopio invertido de FIV típico (medida en los sistemas de Contraste de Modulación Olympus IX-71 y CK40 Hoffman) puede ser de hasta 10 milivatios/cm². Eeva captura una frecuencia de imagen relativamente alta (una imagen cada 5 minutos), a una intensidad de luz y un tiempo de exposición relativamente bajos (0,6 segundos por cada imagen). Por lo tanto, Eeva produce sólo 0,36 milijulios/cm² de energía por imagen, o una exposición de energía total de sólo 0,32 julios/cm² a lo largo de 3 días de imagen. En conjunto, la energía lumínica total experimentada por los embriones durante 3 días de imagen con Eeva se aproxima a 21 segundos de exposición a partir de un microscopio de campo brillante de FIV tradicional. La duración de la imagen Eeva desde el chequeo posfertilización hasta el Día 3 produce aproximadamente 865 marcos de imagen por embrión.

Durante el proceso de imagen, no se permitió ningún cambio de medio u observación. Se continuó con la obtención de imágenes hasta el Día 3 y se detuvo en el momento de la clasificación rutinaria de embriones el Día 3.

Clasificación morfológica

Tras completarse la imagen por Eeva el Día 3, se continuó con el resto del proceso de FIV según los procedimientos convencionales en cada sitio. Se realizó la clasificación de embriones el Día 3 según los protocolos estándar de la clínica. El embriólogo usó criterios morfológicos tradicionales para decidir qué embriones se seleccionaban para transferencia, cultivo extendido, congelación o eliminación. Si el caso estaba designado para cultivo de blastocistos, se movieron los embriones de la placa de Eeva a una placa de cultivo regular, y se llevó a cabo el cultivo de blastocistos en base a los protocolos estándar de la clínica para la clasificación morfológica del Día 5 o Día 6 y la transferencia de blastocistos.

Los formatos de registro para la clasificación morfológica de embriones varían entre clínicas; por lo tanto, se recogieron los datos de la clasificación morfológica de embriones, tanto para el estadio de escisión como para el estadio de blastocisto, usando el estándar de la Society of Assisted Reproductive Technologies (SART) (Racowsky *et al.*, 2010; Vernon *et al.*, 2011). Se recogió el destino de los embriones, registrado como "transferido", "congelado" o "eliminado", en cada sitio clínico según el propio protocolo establecido de cada sitio.

Manejo de datos y mediciones manuales de las cadencias de la división celular

Se segregaron los datos brutos de imagen recogidos de los sitios en dos conjuntos de datos distintos para cada fase del estudio: un Conjunto de Datos de Desarrollo (n=736 embriones de 63 pacientes) y un Conjunto de Datos de Validación secuestrados separado (n=1.029 embriones de 75 pacientes). Ninguna paciente estaba representada en ambos conjuntos de datos; en lugar de ello, sólo se añadieron todas las imágenes de embriones de una paciente individual a uno de los conjuntos de datos. Se empleó una herramienta de base de datos de imagen para (1) compilar imágenes en un vídeo de lapso temporal con marcadores de buena identificación y marcas de fecha; (2) permitir la reproducción del vídeo, y (3) permitir la anotación manual de los tiempos de inicio/parada de sucesos notables de desarrollo. Un panel de tres embriólogos revisaron independientemente los vídeos de embriones siguiendo un protocolo ciego aleatorizado. Para cada embrión, cada miembro del panel registró los tiempos de inicio/parada de intervalos de tiempo específicos de la división celular desde el estadio de 1 a 4 células que previamente se había reportado que predecían el desarrollo exitoso hasta el estadio de blastocisto: P1 (duración de la primera citocinesis), P2 (tiempo entre citocinesis 1 y 2) y P3 (tiempo entre citocinesis 2 y 3) (Wong *et al.*, 2010). Cada embriólogo trabajaba ciego a cualquier dato de las pacientes, incluyendo el número total de embriones por paciente, los resultados de predicción de Eeva o las mediciones de cualquier otro embriólogo.

Programa de predicción y rastreo celular

Se completó el desarrollo del programa de predicción y rastreo de células embrionarias Eeva usando un subconjunto de n=292 vídeos de embriones de 43 pacientes del Conjunto de Datos de Desarrollo. Primeramente, se construyó un modelo de árbol de clasificación para valorar la capacidad predictiva de las mediciones de P1, P2 y P3 para un resultado específico del desarrollo de embriones: formación de Blastocistos Utilizables. Se definieron los Blastocistos Utilizables como embriones que se clasificaron morfológicamente como blastocistos el Día 5 o el Día 6, y que eran de calidad suficiente como para ser seleccionados para transferencia o congelación por los embriólogos de los sitios clínicos. Se contaron los embriones que no cumplían con la definición de Blastocisto Utilizable como "Detenidos", ya

que fueron desechados por los embriólogos de los sitios clínicos.

Para automatizar la medición de los parámetros, se desarrolló un programa para el rastreo celular usando un marco probabilístico dirigido por datos y geometría computacional para rastrear la división celular desde el estadio de 1 célula hasta el de 4 células. Las características primarias rastreadas por el algoritmo son las membranas celulares, que exhiben un elevado contraste de imagen mediante el uso de iluminación de campo oscuro. El programa genera un modelo de embriones que incluye una estimación del número de blastómeros, así como del tamaño, localización y forma de los blastómeros, en función del tiempo. Se introducen las mediciones de los parámetros de los modelos de embriones a través del árbol de clasificación que predice la formación de Blastocistos Utilizables.

Se probaron el modelo de predicción y el programa de rastreo celular sobre un Conjunto de datos de Validación independiente de $n=1.029$ embriones de 75 pacientes para evaluar la precisión y la consistencia.

Análisis estadísticos

Se realizaron todos los análisis de datos y estadísticos usando el Programa SAS versión 9.2 y Matlab versión R2010a. Se construyó el modelo de árbol de clasificación estadística para determinar lo bien que las cadencias de los parámetros de "Blastocistos Utilizables" y embriones "Detenidos" se dividen en los nodos definidos por los parámetros de cadencia de división celular P1, P2 y P3. Se probó el modelo sobre 292 embriones con mediciones manuales de los parámetros y resultados de blastocistos conocidos. Para estudiar la no inferioridad entre mediciones manuales y con el programa, se utilizaron métodos de Blackwelder con potencia $(1-\beta)\% = 0,8$ y significación $\alpha\% = 0,05$. También se determinó el porcentaje global de concordancia entre los dos métodos usando un análisis de concordancia de métodos. Se calcularon las medidas diagnósticas (p. ej., especificidad, sensibilidad, VPP, VPN) y los intervalos de confianza del 95% asociados para valorar el rendimiento de la predicción del resultado de Blastocistos Utilizables. Para comparar el rendimiento de las predicciones basadas en morfología con las predicciones de Eeva, se realizó una prueba de proporciones. Se consideró un valor de $p < 0,05$ como estadísticamente significativo.

Resultados

Características clínicas

Un total de 160 pacientes en 5 sitios clínicos de FIV cumplieron con los criterios de elegibilidad y dieron su consentimiento para que se tomaran imágenes de sus embriones usando el sistema Eeva. En conjunto, se retiraron 2.682 oocitos y se fertilizaron por FIV o IEC. Tras la fertilización, se confirmaron 1.765 como 2PN y se transfirieron a placas de Eeva para imagen desde la posfertilización hasta el estadio del Día 3. Al completarse la imagen por Eeva el Día 3, se recogió la clasificación morfológica del Día 3 tradicional para 1.727 embriones. Según el protocolo estándar de cada sitio clínico, se seleccionaron algunos embriones para transferencia, mientras que se cultivaron otros embriones dos días más. Se recogió la morfología del Día 5 para 1.494 embriones y se utilizó para calcular la formación global de blastocistos ($838/1.494 = 56\%$) y la formación de Blastocistos Utilizables ($443/1.494 = 30\%$), definida como la formación de blastocistos que eran de calidad suficiente como para seleccionarlos para transferencia o congelación (Figura 7).

Los embriones que eran utilizables en las fases de Desarrollo y Validación del programa de predicción y rastreo de células eran embriones que se cultivaron hasta el estadio de blastocisto. De las 160 pacientes enroladas, se excluyó a 22 del Desarrollo y Validación: se asignaron los 2 ó 3 primeros casos de cada sitio a entrenamiento y aseguración del uso apropiado del sistema Eeva (total 12 casos), y 10 pacientes adicionales fueron casos de transferencia el Día 3 con datos de resultados de blastocistos incompletos. Se resumen las características clínicas de las 138 pacientes restantes y de los embriones de ambos conjuntos de datos en la Tabla 3.

Tabla 3: Características clínicas de los Conjuntos de Datos de Desarrollo y Validación. **"Otros" incluye 11 razones: 3 de subfertilidad relacionada con la edad; 2 debido a oligoovulación; 2 debido a que la persona era una única mujer; 1 debido a amenorrea; 1 debido a menopausia; 1 debido a pérdida de gestación recurrente; y 1 debido a adherencias tubáricas.

Tabla 3: Características clínicas de los Conjuntos de Datos de Desarrollo y Validación.

Características clínicas		Conjunto de Datos de Desarrollo	Conjunto de Datos de Validación
Número total de pacientes		63	75
Número total de huevos		1.046	1.636
Número total de 2PN		736	1.029
Demografía de las pacientes (media $\pm$ SD)	Edad del huevo (años)	34,2 $\pm$ 4,5	32,5 $\pm$ 65,4
	Edad de la receptora (años)	35,6 $\pm$ 4,4	35,6 $\pm$ 5,6
	Altura (pulgadas)	66,0 $\pm$ 2,9	65,4 $\pm$ 2,9
	Peso (libras)	145,1 $\pm$ 29,7	148,5 $\pm$ 32,1
Tipo de ciclo	Pacientes que usan sus propios huevos	58/63 (92,1%)	62/75 (82,7%)
	Donante de oocitos	5/63 (7,9%)	13/75 (17,3%)
Razón para la TRA	Infertilidad masculina	20/63 (31,8%)	15/75 (20,0%)
	Historia de endometriosis	3/63 (4,8%)	1/75 (1,3%)
	Trastornos de la ovulación	4/63 (6,4%)	9/75 (12,0%)
	Reserva ovárica disminuida	3/63 (4,8%)	10/75 (13,3%)
	Ligadura de trompas	1/63 (1,6%)	0/75 (0,0%)
	Hidrosalpinx tubárico	1/63 (1,6%)	0/75 (0,0%)
	Otra enfermedad tubárica	1/63 (1,6%)	2/75 (2,7%)
	Uterino	0/63 (0,0%)	1/75 (1,3%)
	Sin explicar	11/63 (17,5%)	17/75 (22,7%)
	Múltiples razones	11/63 (17,5%)	16/75 (21,3%)
	Otros*	8/63 (12,7%)	4/75 (5,3%)
Protocolo de estimulación	Fase lútea agonista	15/63 (23,8%)	6/75 (8,0%)
	Estallido de microdosis de agonista	2/63 (3,2%)	4/75 (5,3%)
	Supresión de antagonistas	29/63 (46,0%)	49/75 (65,3%)
	Otros	17/63 (27,0%)	16/75 (21,3%)
Recuentos de estimulación y recuperación (media $\pm$ SD)	Recuento RFA	16,9 $\pm$ 7,0	21,8 $\pm$ 8,6
	Número de folículos	16,7 $\pm$ 7,8	21,2 $\pm$ 7,5
	Número de huevos	16,6 $\pm$ 7,3	21,8 $\pm$ 7,9

Método de inseminación	IEIC	39/63 (61,9%)	52/75 (69,3%)
	FIV	21/63 (33,3%)	21/75 (28,0%)
	Ambas	3/63 (4,8%)	2/75 (2,7%)
Recuento de fertilización (media $\pm$ SD)	Número de 2PN	9,6 $\pm$ 4,7	13,7 $\pm$ 4,9

Desarrollo del programa de predicción y rastreo celular Eeva

Para desarrollar el sistema Eeva para la valoración precoz de la viabilidad de embriones, se analizaron 292 embriones de 43 pacientes con datos de imagen, datos de mediciones y datos de resultados de blastocistos y se usaron para construir: (1) un modelo de árbol de clasificación estadística para predecir el resultado de Blastocistos Utilizables, y (2) un programa de rastreo celular para medir las cadencias predictivas de la división celular y generar predicciones automatizadas de Blastocistos Utilizables.

El modelo del árbol de clasificación proporcionaba una vía determinística simple para categorizar embriones como "Blastocistos Utilizables" o "Detenidos" en base a intervalos óptimos de parámetros de cadencia de división celular. Además de las cadencias de división celular P1, P2 y P3, se evaluaron otros factores, incluyendo la edad de los huevos, el número de células y el método de inseminación; sin embargo, no se vio que éstos fueran predictores importantes del resultado del desarrollo. Además, al estudiar métodos que incluían estos factores, se vio que los valores de P2 y P3 dominaban estadísticamente la predicción. Por lo tanto, el actual programa de predicción y rastreo celular Eeva se basaba en los dos parámetros de cadencia más fuertes de los tres previamente publicados: el tiempo entre 1ª y 2ª citocinesis (P2), y el tiempo entre 2ª y 3ª citocinesis (P3). El programa de predicción y rastreo celular Eeva reportó una elevada probabilidad de formación de Blastocistos Utilizables cuando tanto P2 como P3 están dentro de intervalos específicos de cadencia de la división celular ($9,33 \leq P2 \leq 11,45$ horas y $0 \leq P3 \leq 1,73$ horas), y una baja probabilidad cuando o bien P2 o bien P3 están fuera de los rangos específicos de cadencia de la división celular (véase la Figura 8).

Se implementó el programa de rastreo celular en C++ operando en tiempo real en un PC estándar. Para visualizar los resultados del rastreo, se superpusieron anillos de color sobre la imagen original del embrión en cada estadio de división celular, para cada marco de la secuencia de lapso temporal (Figura 9). Se calcularon el tiempo entre citocinesis 1 y 2 (P2) y el tiempo entre citocinesis 2 y 3 (P3) mediante el programa y se alimentaron a través del modelo de árbol de clasificación para predecir la formación de Blastocistos Utilizables comparando las mediciones calculadas con ventanas de referencia. El programa reportó una predicción de formación de Blastocistos Utilizables como "alta" (para dentro de ventana, o alta probabilidad) o "baja" (para fuera de ventana, o baja probabilidad) para cada embrión.

Validación del programa de predicción y rastreo celular Eeva

Se diseñó un estudio prospectivo, doble ciego, de comparación de métodos, para validar el modelo de predicción Eeva y la precisión del rastreo celular. Se completó la validación sobre un conjunto independiente de $n=1.029$ embriones de 75 pacientes, que se segregó de los datos usados para el desarrollo del modelo. Se usó un análisis de comparación de métodos para comparar los valores de los parámetros de cadencia y las predicciones de blastocistos de Eeva, en comparación con un panel de embriólogos expertos. Como en la fase de Desarrollo, tres embriólogos tomaron independientemente mediciones manuales de parámetros para embriones en el Conjunto de Datos de Validación. Se compararon los valores de parámetros y las predicciones generadas por Eeva con las mediciones manuales de parámetros y las predicciones aportadas por los tres embriólogos. Eeva era capaz de generar mediciones y predicciones para una mayoría aplastante ($941/998 = 94,2\%$) de embriones, y la pequeña fracción de los que no eran adecuados para rastreo celular eran casos que exhibían comportamientos extremadamente complejos (p. ej., divisiones celulares altamente anormales y/o alto % de fragmentación) con resultados primariamente Detenidos ($45/57=78,9\%$). Se valoró la concordancia entre el panel de embriólogos y Eeva y se definió como que tanto Eeva como los métodos manuales tenían "altas" (dentro de ventana) o "bajas" (fuera de ventana) predicciones de Blastocistos Utilizables. La concordancia global entre el programa Eeva y las mediciones manuales al realizar las predicciones de Blastocistos Utilizables era del 91,0% (IC del 95% del 86,0% al 94,3%) (Figura 9).

Resultados y predicciones de Eeva para pacientes y cohortes de embriones

Se realizó un análisis del número de "Blastocistos Utilizables" y de embriones "Detenidos" para la cohorte de embriones de cada paciente y se representó por sus mediciones de P2 y clasificaciones de P3 para el Conjunto de Datos de Desarrollo (Figura 10) y el Conjunto de Datos de Validación (Figura 11). Para este análisis, se evaluaron sólo los resultados para todas las pacientes que tenían un conjunto de datos de imagen completo y todos los embriones cultivados hasta el Día 5 ó 6 para transferencia de blastocistos (28 pacientes para el Conjunto de Datos de Desarrollo, 74 pacientes para el Conjunto de Datos de Validación).

De las 28 pacientes mostradas en el Conjunto de Datos de Desarrollo (Figura 10), 4 pacientes no tenían blastocistos y 24 tenían al menos un blastocisto en su cohorte de embriones. La prevalencia de Blastocistos Utilizables era del 25,2% (=67/266). La mayoría de las mediciones de Blastocistos Utilizables (41/75=54,7%) entraban bien dentro del intervalo "dentro de ventana" de las cadencias de división celular P2 y P3 definidas por el modelo de predicción del árbol de clasificación y regresión (representado en amarillo). Hubo un índice de falsos positivos Eeva del 17,1%, en base a los 34/199 embriones detenidos que estaban dentro de los intervalos tanto de P2 como de P3. En el Conjunto de Datos de Validación (Figura 11), había 74 pacientes que tenían un resultado completo de Blastocistos Utilizables e información de predicción Eeva para evaluación. En este grupo, 4 pacientes no tenían blastocistos y 70 pacientes tenían al menos un blastocisto en su cohorte de embriones. La prevalencia total de Blastocistos Utilizables era del 32,1% (n=320/998 embriones). El número total de Blastocistos Utilizables que entraban bien dentro del intervalo "dentro de ventana" de las mediciones de P2 y P3 era de 119/308 =38,6%. El índice de falsos positivos Eeva era del 15,3%, en base a los 97/633 embriones detenidos que estaban dentro de los intervalos predictivos tanto de P2 como de P3.

Se puede aprovechar el análisis realizado en las Figuras 4 y 5 para inspeccionar cualitativa y cuantitativamente el potencial de desarrollo de la cohorte de embriones de cada paciente, para comparaciones entre embriones dentro de una cohorte, así como para comparaciones entre pacientes dentro de una población. De la manera más crítica, la evaluación a nivel de cohorte revela que, incluso cuando Eeva está en situación de error al predecir el Blastocisto Utilizable (es decir, que el Blastocisto Utilizable queda fuera de la ventana de predicción de Eeva representada en amarillo), una mayoría significativa de pacientes (80/95=84%) tienen al menos un blastocisto predicho por Eeva disponible para selección. Correlación con los resultados de implantación y gestación Realizamos un análisis secundario para examinar si los marcadores de lapso temporal usados por Eeva guardan correlación con los resultados de implantación y gestación. Es importante que, como este estudio era un estudio de validación de la predicción de blastocistos, se transfirieron los embriones en el estadio de blastocisto usando los procedimientos estándar de las clínicas participantes, y no se proporcionaron las predicciones de Eeva en el momento de la transferencia. Observamos que, de 141 embriones transferidos en el estadio de blastocisto, aquéllos que tenían marcadores tanto P2 como P3 dentro de intervalo (Eeva Elevado) tenían una probabilidad estadísticamente superior de implantación que los embriones con P2 o P3 fuera de intervalo (Eeva Bajo) (49% vs. 21%, $p<0,001$) (Tabla 4). De forma similar, para estas 77 pacientes, aquéllas a las que se había transferido al menos un embrión Eeva Elevado tenían mayor probabilidad de conseguir una gestación clínica (60% vs. 40%) y una gestación continuada (56% vs. 37%) que aquéllas a las que sólo se habían transferido embriones Eeva Bajo.

Tabla 4

Población de pacientes	# Pacientes	# Embriones	Edad (años)	Índice de implantación	Índice de gestación clínica	Índice de gestación continuada
Al menos 1 Eeva Elevado transferido	47	89	32,1 ± 5,2	49% (44/89)	60% (28/47)	55% (26/47)
Sólo Eeva Bajos transferidos	30	52	32,2 ± 5,1	21% (11/52)	40% (12/30)	37% (11/30)
Valor de p			$p=0,9$	$p<0,001$	$p=0,09$	$p=0,11$

Rendimiento global de Eeva

Se valoró el rendimiento global de Eeva estadísticamente comparando las predicciones con el resultado real de Blastocistos Utilizables de las clínicas de FIV. En la fase de Desarrollo, se demostró que el programa de predicción y rastreo celular Eeva predecía correctamente hacia el Día 2 aquéllos embriones que se convirtieron en Blastocistos Utilizables con una especificidad del 84,2% (IC del 95% del 78,7% al 88,5%), una sensibilidad del 58,8% (IC del 95% del 47,0% al 69,7%), un VPP del 54,1% (IC del 95% del 42,8% al 64,9%) y un VPN del 86,6% (IC del 95% del 81,3% al 90,6%). En la fase de Validación, el programa de predicción y rastreo celular Eeva podía predecir correctamente hacia el Día 2 aquéllos embriones que se convirtieron en Blastocistos Utilizables con una especificidad del 84,7% (IC del 95% del 81,7% al 87,3%), una sensibilidad del 38,0% (IC del 95% del 32,7% al 43,5%), un VPP del 54,7% (IC del 95% del 48,0% al 61,2%) y un VPN del 73,7% (IC del 95% del 70,4% al 76,8%).

Como control basal, cinco embriólogos clínicos de cinco sitios clínicos de FIV, distintos de los utilizados para medir manualmente los parámetros de los vídeos de embriones, revisaron los datos de morfología del Día 3 para n=343 embriones. Los embriólogos clínicos hicieron una predicción ciega independiente sobre si cada embrión se convertiría en un blastocisto en base únicamente a la morfología del Día 3. Los métodos basados en morfología identificaron correctamente aquellos embriones que se convirtieron en Blastocistos Utilizables con una especificidad del 57,0% (IC del 95% del 51,2% al 62,7%), una sensibilidad del 80,8% (IC del 95% del 70,7% al 87,9%), un VPP del 33,7% (IC del

95% del 27,0% al 41,1%) y un VPN del 92,3% (IC del 95% del 87,2% al 95,3%).

Es importante el hecho de que, utilizando Eeva para predecir Blastocistos Utilizables, la especificidad y el VPP mejoraban significativamente sobre las predicciones medias de blastocistos hechas por embriólogos experimentados usando sólo la morfología del Día 3 ($p < 0,0001$ y $p < 0,0001$ para la especificidad y el VPP usando la prueba t de Student). Comparados con el enfoque de morfología (especificidad 57,0%, VPP 33,7%), los resultados de la predicción para Eeva seguían siendo significativamente mejores en todo el conjunto de datos de Desarrollo (especificidad 84,2%, VPP 54,1%) y en todo el de Validación (especificidad 84,7%, 54,7%) (Figura 11).

Los investigadores han demostrado un beneficio de la imagen de lapso temporal en la manipulación reducida y la retirada de embriones de un ambiente óptimo de incubación (Cruz *et al.*, 2011; Kirkegaard *et al.*, 2012). Es importante que estos estudios han probado que la imagen de lapso temporal es segura para la obtención continua de imágenes de embriones humanos preimplantación, no causando ningún efecto perjudicial sobre la calidad (Lemmen *et al.*, 2008; Nakahara *et al.*, 2010), la cinética del desarrollo (Barlow *et al.*, 1992; Grisart *et al.*, 1994; Gonzales *et al.*, 1995; Kirkegaard *et al.*, 2012), el índice de formación de blastocistos (Grisart *et al.*, 1994; Gonzales *et al.*, 1995; Pribenszky *et al.*, 2010; Cruz *et al.*, 2011; Kirkegaard *et al.*, 2012), el índice de fertilización (Payne *et al.*, 1997; Nakahara *et al.*, 2010), el índice de implantación (Kirkegaard *et al.*, 2012), el índice de gestación (Barlow *et al.*, 1992; Mio y Maeda, 2008; Cruz *et al.*, 2011; Kirkegaard *et al.*, 2012) o la expresión génica de embriones humanos (Wong *et al.*, 2010). Ciertamente, el sistema Eeva opera bajo iluminación de campo oscuro de baja potencia, que minimiza la exposición a la luz para los embriones a aproximadamente 21 segundos con respecto a lo que los embriones experimentan bajo un microscopio convencional de reproducción asistida. Para confirmar que estas condiciones de cultivo conducían a un crecimiento apropiado de los embriones, evaluamos el índice global de formación de blastocistos para pacientes que tuvieron transferencias de blastocistos en el estudio, y determinamos que el índice medio de formación de blastocistos era del 49,9%, con un intervalo del 16,9-60,0% a través de los sitios. Estos valores son similares a la media (45,4%) y al intervalo (28,0-60,3%) de los índices de formación de blastocistos reportados entre 1998 y 2006 (Blake *et al.*, 2007), lo que sugiere que los embriones sometidos a imagen por Eeva tienen competencia para un desarrollo normal.

A pesar de las potentes observaciones posibles con la imagen de lapso temporal, y su seguridad confirmada, pocos estudios han validado la correlación entre parámetros de imagen y resultados de desarrollo sobre grandes tamaños de muestras de datos independientes. Además, los retos en la investigación de embriones humanos han limitado las oportunidades de alcanzar una comprensión mecanística de biomarcadores de imagen prometedores. Entre un número de estudios fundacionales que reportaban las primeras observaciones de lapso temporal de embriones humanos, incluyendo las previamente descritas y otras (Payne *et al.*, 1997; Mio y Maeda, 2008), Wong *et al.* describieron el primer informe de parámetros cuantitativos no solapantes directamente medibles que se pueden aplicar fácilmente para categorizar embriones en base a su potencial de desarrollo y perfiles de expresión génica intrínsecos. Sus resultados demostraron no sólo que los períodos de tiempo de las dos primeras divisiones de escisión eran predictivos de éxito o fracaso en la formación de blastocistos, sino que estas duraciones se asocian a cambios moleculares que indican degradación de los ARNm maternos y activación del genoma embrionario. Por lo tanto, en este estudio clínico, nuestro objetivo era validar sistemáticamente el poder predictivo y la utilidad clínica en tiempo real de las cadencias de división celular en múltiples marcos clínicos, usando Blastocistos Utilizables como resultado.

Observamos primeramente que se podían predecir los embriones que se desarrollaban a blastocistos en marcos clínicos de FIV en el estadio de escisión con cadencias de división celular similares a los informes previos. Se usaron los datos de medición de 292 embriones y 43 pacientes en un análisis de árbol de clasificación estadística frente a los resultados de formación de blastocistos de los embriones obtenidos de los sitios clínicos. Las variables predictoras para Blastocistos Utilizables eran los parámetros de los tiempos de división celular en buena alineación con las duraciones de las cadencias previamente publicadas para embriones criopreservados, en particular para P2 (el tiempo entre 1ª y 2ª citocinesis) y P3 (el tiempo entre 2ª y 3ª citocinesis). Comparada con el intervalo originalmente reportado para P1, la duración de la cadencia de P1 (duración de la 1ª citocinesis) se amplió en el conjunto de datos clínicos, pero aún quedaba dentro de un intervalo medio de tiempo relativamente estrecho de aproximadamente 30 minutos. Por lo tanto, como se esperaba, los descubrimientos de Wong *et al.* usando embriones supernumerarios criopreservados podían extenderse a embriones humanos de FIV frescos cultivados hasta el estadio de blastocisto. Este resultado no es sorprendente, ya que la determinación del perfil de la expresión génica de blastómeros simples y de embriones enteros indicaba que los parámetros de cadencia de la división celular desde el estadio de 1 hasta el de 4 células estaban ligados a la actividad transcripcional y a la salud molecular de los embriones (Wong *et al.*, 2010). Junto con los resultados clínicos de sitios que utilizaban diversos protocolos de cultivo, la ciencia que respalda estos parámetros predictivos da confianza en que la valoración de lapso temporal de estos sucesos clave del desarrollo de embriones pueda añadir valor a las técnicas actuales de selección de embriones.

Para construir el modelo estadístico para predecir Blastocistos Utilizables, se valoraron varios enfoques estadísticos, incluyendo árboles de clasificación, análisis discriminatorio lineal y cuadrático y modelos de Naïve Bayes, junto con la inclusión de factores adicionales (edad de los embriones, número de células y método de inseminación) en estos modelos. Finalmente, el programa de predicción y rastreo celular Eeva se basaba en un árbol de clasificación simple que incorporaba el tiempo entre 1ª y 2ª citocinesis (P2), y el tiempo entre 2ª y 3ª citocinesis (P3). Aunque la duración de la 1ª citocinesis (P1) era un predictor del resultado de blastocistos por sí sola, y representa una etapa biológicamente relevante en la división del primer embrión, se vio que P2 y P3 dominaban estadísticamente sobre P1

en el modelo de predicción. El Blastocisto Utilizable era un resultado importante de la competencia de los embriones para este estudio. Aunque normalmente se realizan la selección y la transferencia de embriones tras valoración el Día 3, la transferencia de blastocistos el Día 5 o el Día 6 está ganándose el favor (Gardner *et al.*, 2000) (Diamond *et al.*, 2012). La transferencia de blastocistos selecciona embriones que progresan con éxito al estadio de blastocisto, y se ha visto que da como resultado casi el doble de los índices de implantación de transferencia el Día 3 (Papanikolaou *et al.*, 2005; Papanikolaou *et al.*, 2006; Blake *et al.*, 2007;) (Gelbaya *et al.*, 2010). Sin embargo, para muchas pacientes y laboratorios, existen inconvenientes y riesgos asociados a la práctica de transferencia de blastocistos. Se ha reportado que casi la mitad de los embriones que parecen ser de buena calidad se detienen a lo largo de un cultivo prolongado desde la escisión hasta el estadio de blastocisto (Niemitz y Feinberg, 2004; Horsthemke y Ludwig, 2005; Manipalviratn *et al.*, 2009). Por consiguiente, con frecuencia se evita la transferencia de blastocistos, en particular para pacientes con un mal pronóstico que sólo tienen unos cuantos embriones que pueden no conseguir sobrevivir a las condiciones de cultivo prolongado. Además, se ha sugerido que un cultivo prolongado puede aumentar el riesgo de trastornos epigenéticos, gemelos monoigóticos y complicaciones asociadas, complicaciones en la gestación, tales como parto prematuro y bajo peso al nacer, y problemas de salud a largo plazo para la descendencia de la reproducción asistida (Milki *et al.*, 2003; Niemitz y Feinberg, 2004; Horsthemke y Ludwig, 2005; Manipalviratn *et al.*, 2009; Kallen *et al.*, 2010; Kalra *et al.*, 2012). La identificación de blastocistos mediante el estadio de escisión del desarrollo puede reducir la necesidad de realizar un cultivo prolongado con fines de selección (Coskun *et al.*, 2000; Milki *et al.*, 2002) y permitir la transferencia precoz de un solo embrión. A su vez, las prácticas de transferencia más precoz pueden tener un impacto positivo sobre las condiciones de flujo de trabajo del laboratorio y reducir los costes asociados al cultivo de embriones, así como mejorar potencialmente la salud del embrión. Es interesante el hecho de que, en nuestra población de pacientes, 4 de 7 de las pacientes que no tenían blastocistos el Día 5 tenían al menos un embrión que se predijo que se convertiría en un Blastocisto Utilizable en base a la predicción de Eeva (véanse las Figuras 10 y 11). Es concebible que la transferencia el Día 3 de estos blastocistos predichos hubiera prevenido su detención y diera lugar a resultados favorables de implantación, aunque se necesitan estudios adicionales para abordar directamente esta hipótesis.

La adopción clínica de nueva tecnología de selección de embriones depende no sólo del mérito científico y clínico de sus parámetros predictivos, sino también de cómo encaje la tecnología en el flujo de trabajo acelerado y de gran volumen del laboratorio de FIV. Se pueden extraer manualmente los parámetros de imagen de lapso temporal, a los que también se hace referencia como "morfocinéticos", de imágenes de lapso temporal, pero es un proceso lento y laborioso proclive a variabilidad del observador (Baxter Bendus *et al.*, 2006). Observamos que, como media, le llevaba aproximadamente 3 horas a un embriólogo altamente experimentado revisar las películas de embriones y medir unos cuantos parámetros específicos de cadencia de la división celular para 25 embriones (~7 minutos por embrión). Por el contrario, en la práctica clínica rutinaria, es típico asignar sólo 15-30 minutos a un embriólogo para valorar los embriones y preparar un caso para transferencia. Por lo tanto, para permitir una valoración rápida, cuantitativa y reproducible de los parámetros de lapso temporal en marcos clínicos, desarrollamos un programa de rastreo celular que rastrea automáticamente la forma celular, la localización y la división a lo largo del tiempo. Aunque ha habido unos cuantos informes técnicos recientes sobre análisis de imagen automatizado de imágenes al microscopio de embriones humanos (Filho *et al.*, 2010) (Filho *et al.*, 2012), hasta donde sabemos sólo ha habido una única demostración exitosa de programa de análisis de imagen aplicado a la imagen de lapso temporal del desarrollo de embriones humanos (Wong *et al.*, 2010). El análisis de imagen automatizado de vídeos de lapso temporal es un reto particular debido a la abundancia de datos que deben procesarse a lo largo del tiempo.

En el presente trabajo, ampliamos el marco de rastreo celular presentado en Wong *et al.* para desarrollar un programa que evalúa una serie de imágenes de embriones humanos, que detecta directamente las membranas celulares, que identifica la cadencia de las divisiones desde el estadio de 1 célula hasta el estadio de 4 células y que genera predicciones del desarrollo de embriones para todos los embriones de una placa en tiempo real. Validamos entonces la precisión de rastreo y predicción del programa Eeva sobre un conjunto de datos independiente de embriones para los que se habían ocultado los resultados de blastocistos. Las mediciones del programa Eeva tenían una concordancia muy alta (>90%) con las mediciones manuales, y discordaban en casos en que los embriones exhibían comportamientos dinámicos complejos que también fueron difíciles de valorar manualmente - en muchos de estos casos, los embriólogos exhibieron un alto grado de variabilidad entre observadores en su revisión de expertos (datos no mostrados). En general, el sofisticado programa de análisis de imagen y rastreo celular mejoraba la objetividad, la consistencia y la eficacia de las mediciones en comparación con la valoración subjetiva por observadores humanos.

En una prueba final y ciega del rendimiento de Eeva, aplicamos las capacidades de predicción y rastreo celular integradas de Eeva a un Conjunto de Datos de Validación independiente y comparamos las predicciones generadas por Eeva con las generadas por embriólogos expertos usando criterios morfológicos del Día 3. La especificidad de la predicción de Blastocistos Utilizables mejoraba significativamente cuando se usaba Eeva en comparación con la morfología (84,7% vs. 54,7%, $p < 0,0001$). Es importante que se diseñara el modelo de predicción Eeva para optimizar la especificidad sin consideración de que la limitación principal en la morfología tradicional es su elevada sensibilidad y su baja especificidad, o su tendencia a considerar la mayoría de embriones con "buena morfología" como viables. Los resultados clínicos han mostrado que muchos embriones seleccionados en base a criterios de buena morfología solamente son falsos positivos que no forman blastocistos y no se implantan. El campo de la FIV tiene, por lo tanto, necesidad de una prueba que pueda ayudar a discriminar - entre los embriones con buena morfología - aquéllos que formarán blastocistos viables con el potencial más alto de desarrollo. En el estudio actual, la especificidad de Eeva

indicaba que, de todos los embriones detenidos, Eeva podía identificar correctamente el 84,7% de ellos como "malos" o de "baja probabilidad" para formar blastocistos, mientras que la Morfología sólo podía identificar correctamente el 54,7% de ellos como "malos" ($p < 0,0001$). La especificidad también indicaba que Eeva reducía los índices de falsos positivos comúnmente asociados a la selección basada en Morfología de un 43,0% a un 15,3%.

5 El beneficio sustancial de Eeva está en su capacidad para proporcionar información cuantitativa a los clínicos que mejora la precisión en la selección de embriones mejorando significativamente la especificidad y reduciendo así los índices de falsos positivos. Los resultados de la validación independiente también determinaron el valor predictivo positivo de la predicción de blastocistos, o capacidad para identificar correctamente blastocistos, para mejorarlo significativamente de un 33,7% usando Morfología a un 54,7% usando Eeva ($p < 0,0001$). Sin embargo, tanto la
10 sensibilidad como el valor predictivo negativo disminuyeron con Eeva. Observaciones preliminares sugieren que los falsos negativos asociados a la baja sensibilidad (se predice que se detienen, pero realmente se desarrollan hasta blastocistos) pueden ser indicativos de blastocistos que tienen menor potencial de implantación. Un estudio en curso está evaluando la contribución de esta tecnología de alta especificidad a la implantación de embriones.

15 Los resultados de este estudio tienen en cuenta diferentes protocolos de estimulación, métodos de fertilización, medios de cultivo de embriones y condiciones de incubación, ya que cada una de las cinco clínicas de FIV participantes siguió sus propios protocolos a través de todo el procedimiento de FIV. Realizamos un subanálisis de la especificidad y la sensibilidad para Eeva en función del sitio clínico, del método de fertilización y de la edad del huevo y no encontramos ninguna diferencia estadística entre cada grupo (datos no mostrados). Además, desarrollamos el modelo de predicción Eeva sobre una población de pacientes relativamente amplia y representativa designada para transferencia el Día 3 o
20 el Día 5, a pesar de requerir pacientes con relativamente buen pronóstico en el Conjunto de Datos de Validación para probar el modelo para el resultado de blastocistos. Estos hallazgos sugieren que la elevada especificidad del 85% de la valoración Eeva puede ser ampliamente aplicable y proporcionar información útil que pueda tener un impacto sobre la selección de embriones para muchas usuarias a través de diferentes sitios clínicos y protocolos.

25 La validación basada en la evidencia de la utilidad clínica es esencial antes de implementar nuevas herramientas de diagnóstico en laboratorios de FIV. Éste es el primer enfoque de valoración precoz de la viabilidad de embriones que integra imagen de lapso temporal con (1) parámetros predictivos arraigados en la fisiología molecular de embriones subyacente, (2) un programa automatizado de rastreo celular y (3) una validación clínica exitosa. Se consiguió aquí la validación de un modo estable y por etapas que ampliaba nuestro informe científico original a un estudio diseñado prospectivamente que analizaba los valores predictivos positivos y negativos de los parámetros, así como la precisión
30 de la primera herramienta de programa de rastreo celular diseñada para automatizar las mediciones de los parámetros de lapso temporal.

En general, los resultados del presente estudio demuestran que se puede implementar Eeva con seguridad y facilidad en el laboratorio con resultados discernibles en un número aplastante (94,2%) de embriones, para dar predicciones consistentes en tiempo real de la viabilidad de los embriones con una especificidad, un VPP y una precisión global
35 significativamente mejorados con respecto a la morfología.

Ejemplo 4

Para mejorar el proceso de selección de embriones, se necesitan parámetros de valoración adicionales deseleccionando de ese grupo de embriones con buena morfología aquéllos que tienen una baja probabilidad de convertirse en blastocistos. Se puede aprovechar la elevada especificidad del modelo de predicción de blastocistos
40 para abordar esta limitación conocida en la morfología tradicional y para ayudar al embriólogo a identificar aquellos embriones con buena morfología el Día 3 que tienen una Baja Probabilidad de convertirse en blastocistos.

Tres directores de laboratorios de embriología clínica (independientes del panel de observadores utilizado para desarrollar y probar el modelo de predicción Eeva) revisaron los datos en dos sesiones independientes que valoraron su predicción de formación de blastocistos utilizables. Durante la primera sesión de predicción, se dieron a los
45 embriólogos datos de morfología D3 (SART), incluyendo: número de células, fragmentación (0%, <10%, 11-25%, >25%), simetría (perfecta, moderadamente asimétrica, severamente asimétrica) y edad de la paciente o de la donante de huevos. Cada embriólogo trabajaba ciego a las predicciones de otros embriólogos. Una semana después, durante una segunda sesión de predicción, se dieron a los mismos embriólogos datos de morfología D3 (SART) como antes y datos de Eeva para los mismos embriones. En esta sesión, cada embriólogo trabajaba ciego a las predicciones de
50 otros embriólogos y a las predicciones de la primera sesión. Los datos de Eeva incluían los valores de los parámetros del ciclo celular (P2 y P3) y una puntuación de predicción de "alta" o "baja" probabilidad de formación de blastocistos utilizables, en base a los límites del árbol de clasificación determinados en la Fase de Desarrollo. Para cuantificar el rendimiento de la selección de embriones de los dos métodos, se compararon las predicciones hechas en cada sesión (usando sólo morfología o morfología más Eeva) con el resultado de blastocistos utilizables.

55 Se examinó la utilidad de combinar Eeva con la valoración de morfología tradicional para la selección de embriones D3 usando un subanálisis de pacientes con cohortes totales de embriones D5. Usando solamente morfología D3, los embriólogos 1, 2 y 3 seleccionaron embriones con una especificidad basal del 59,7%, 41,9% y 79,5% y un VPP basal del 45,5%, 41,5% y 50,5%. Cuando se añadió información de Eeva a la morfología el D3, cada embriólogo mejoró su selección de blastocistos utilizables hasta una especificidad del 86,3% ($p < 0,0001$), 84,0% ($p < 0,0001$) y 86,6% ($p < 0,01$)

(Figura 13A) y un VPP del 56,3% ($p<0,05$), 52,1% ($p<0,05$) y 55,5% ($p=0,34$). La mejora para todos los embriólogos también iba acompañada de una reducción en la variabilidad entre embriólogos. Usando morfología D3 sólo, hubo una diferencia máxima del 37,7% en la especificidad y una diferencia máxima del 8,9% en el VPP entre embriólogos. Por el contrario, usando morfología D3 más Eeva, hubo una diferencia máxima del 2,5% en la especificidad y una diferencia del 4,2% en el VPP.

Dado que la clasificación morfológica estándar puede identificar embriones con "buena" morfología, valoramos si Eeva podría ayudar a los embriólogos a discriminar el D3 qué embriones con "buena" morfología se desarrollarían más probablemente hasta el estadio de blastocisto utilizable. Para este análisis, se definieron los embriones con "buena" morfología como los que tenían de 6 a 10 células, $<10\%$ de fragmentación y simetría perfecta. Usando sólo morfología, los embriólogos 1, 2 y 3 variaron considerablemente en su selección de qué "buenos" embriones se convertirían en blastocistos utilizables (especificidad 9,0%, 0,0% y 45,9%, respectivamente). Usando morfología más Eeva, cada embriólogo mejoró su selección D3 hasta una especificidad del 69,2% ($p<0,0001$), 66,2% ($p<0,0001$) y 69,2% ($p<0,01$), respectivamente (Figura 13B). Para embriones con criterios morfológicos "malos" el D3, las selecciones de todos los embriólogos mejoraron también (especificidad: 77,5% vs. 92,3%, $p<0,0001$ para el embriólogo 1; 56,5% vs. 90,3%, $p<0,0001$ para el embriólogo 2; 91,3% vs. 92,6%, $p=0,54$ para el embriólogo 3). Estos datos muestran que, en combinación con la valoración morfológica D3, Eeva proporciona una valiosa información para ayudar a los embriólogos a identificar qué embriones favorecidos por la morfología es probable que se detengan después.

La Tabla 5 siguiente resume recomendaciones particulares sobre cómo combinar los resultados del modelo con la morfología tradicional para la Predicción Adjunta.

Tabla 5. Recomendaciones para Predicción Adjunta

Cuando el modelo de predicción de blastocistos y la morfología están de acuerdo:	Recomendación
Cuando la morfología del embrión = 'Buena' o 'Regular' y el Modelo = 'Blastocisto de Elevada Probabilidad', - O - Cuando la morfología del embrión = 'Mala' y el Modelo = 'Blastocisto de Baja Probabilidad'	Seguir la recomendación combinada
Cuando el modelo de predicción de blastocistos y la morfología están en <u>desacuerdo</u> :	Recomendación
Cuando la morfología del embrión = 'Buena' o 'Regular' y el Modelo = 'Baja Probabilidad para Blastocisto'	Favorecer el Modelo - el embrión tiene baja probabilidad de convertirse en blastocisto
Cuando la morfología del embrión = 'Mala' y el Modelo = 'Elevada Probabilidad para Blastocisto'	Favorecer la morfología - el embrión tiene baja probabilidad de ser viable

De manera alternativa, un embriólogo puede tomar un enfoque secuencial al uso de morfología e información sobre los sucesos que se producen durante los dos primeros días de desarrollo. Se representa un esquema del "enfoque secuencial" en la Figura 14.

Este enfoque es particularmente potente en el sentido de que observamos que, utilizando morfología y Eeva secuencialmente, los embriólogos tienen una probabilidad tres veces mayor de detectar un verdadero negativo que utilizando únicamente la morfología (Tabla 6).

Tabla 6

N=54 (pacientes)		Sólo morf. %	Secuencial %	Valor de P
Embriones A, B, C (Eliminar D*)	Sensibilidad	85,6%**	40,4%	P<0,001
	Especificidad	25,7%**	76,0%	P<0,001
(n=500)				

* Excluye 258 embriones como resultado de una morfología mala

** En este estadio, la morfología es de poca utilidad para posterior selección.

5 Al analizar embriones que recibieron una clasificación A, B o C en base a la morfología, usando una predicción Eeva de seguimiento, pudimos predecir la formación de blastocistos en un 56% de los embriones. Esto es significativo, ya que la prevalencia global de blastocistos de embriones A, B, C sin usar predicción adjunta Eeva secuencial es sólo del 42%. Por lo tanto, seleccionando embriones de Eeva elevado, un embriólogo aumenta la probabilidad de un verdadero positivo en un 14% en relación a la prevalencia global de blastos en la población de embriones A, B, C. (Tabla 7)

10 Tabla 7

N=54 (pacientes)	Predicción Eeva	% Blastos (IC)	Valor de P
Embriones A, B, C (n=500*)	Elevada	56% (48%-64%)	P<0,001
	Baja	36% (31-41%)	P<0,001

* Prevalencia de blastos en la población = 42%

Es esencial una demostración de la utilidad clínica antes de introducir cualquier nueva herramienta en laboratorios de FIV. Por lo tanto, se llevó a cabo un subanálisis de Valoración Adjunta para valorar si añadir predicciones Eeva automatizadas a los métodos morfológicos tradicionales podría ayudar a los embriólogos experimentados en la selección de embriones D3.

15 Los resultados demostraron que, cuando se usaba Eeva en combinación con morfología D3, los embriólogos experimentaban una mejora significativa en la probabilidad de seleccionar embriones que se desarrollarían a blastocistos utilizables. En particular, la combinación de la elevada especificidad de Eeva con los métodos de morfología tradicionales, mejoraba drásticamente la capacidad para determinar el potencial de desarrollo de embriones de "buena" morfología. De manera notable, hay una variabilidad sorprendentemente alta en las selecciones basadas en morfología de embriólogos que revisaban embriones "buenos", ya que sus especificidades abarcaban desde el 0% (porque un embriólogo consideró que todos estos embriones se desarrollarían a blastocisto utilizable) hasta el 45,9% (debido al enfoque menos conservador de otro embriólogo).

20 Usando morfología más Eeva, la media de las especificidades de predicción de los tres embriólogos mejoraron significativamente ($68,2 \pm 1,7\%$ para morfología más Eeva vs. $18,3 \pm 23,3\%$ para morfología sola, $p<0,05$). Los rendimientos de los embriólogos también fueron más consistentes, ya que se redujo la desviación estándar entre embriólogos. Es ampliamente aceptado que la clasificación morfológica va acompañada de variabilidad significativa intra- e interoperador, que puede tener un impacto sobre los índices de éxito de la FIV (Baxter Benus, 2006; Paternot, 2009). Aquí, hemos construido un algoritmo de predicción generalizada basado en datos de múltiples clínicas y hemos demostrado que se puede añadir la información de predicción automatizada a las evaluaciones morfológicas de los embriólogos para mejorar su variabilidad interoperador. La combinación de las mediciones Eeva automatizadas no invasivas con la morfología tradicional proporcionará a los embriólogos datos más consistentes y objetivos que pueden hacer la valoración de embriones el D3 más estandarizada, reproducible y exitosa.

Referencias

- Alpha E. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Hum Reprod* 2011;**26**:1270-1283.
- Assidi M, Montag M, Van der Ven K, Sirard MA. Biomarkers of human oocyte developmental competence expressed in cumulus cells before ICSI: a preliminary study. *J Assist Reprod Genet* 2011;**28**:173-188.
- Barlow P, Puissant F, Van der Zwalmen P, Vandromme J, Trigaux P, Leroy F. In vitro fertilization, development, and implantation after exposure of mature mouse oocytes to visible light. *Mol Reprod Dev* 1992;**33**:297-302.
- Baxter Bendus AE, Mayer JF, Shipley SK, Catherino WH. Interobserver and intraobserver variation in day 3 embryo grading. *Fertil Steril* 2006;**86**:1608-1615.
- Blake DA, Farquhar CM, Johnson N, Proctor M. Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted conception. *Cochrane Database Syst Rev* 2007;CD002118.
- Chen AA, Tan L, Suraj V, Reijo Pera R, Shen S. Biomarkers identified with time-lapse imaging: discovery, validation, and practical application, *Fertil. Steril* 2013; 99:1035-43.

- Coskun S, Hollanders J, Al-Hassan S, Al-Sufyan H, Al-Mayman H, Jaroudi K. Day 5 versus day 3 embryo transfer: a controlled randomized trial. *Hum Reprod* 2000;**15**:1947-1952.
- Cruz M, Gadea B, Garrido N, Pedersen KS, Martinez M, Perez-Cano I, Munoz M, Meseguer M. Embryo quality, blastocyst and ongoing pregnancy rates in oocyte donation patients whose embryos were monitored by time-lapse imaging. *J Assist Reprod Genet* 2011;
- Cruz, M, Garrido N, Herrero J, Perez-Cano, I, Munoz M, Meseguer M. Timing of cell division in human cleavage-stage embryos is linked with blastocyst formation and quality. *Reprod. Biomed. Online* 2012;25:371-81.
- De Placido G, Wilding M, Strina I, Alviggi E, Alviggi C, Mollo A, Varicchio MT, Tolino A, Schiattarella C, Dale B. High outcome predictability after IVF using a combined score for zygote and embryo morphology and growth rate. *Hum Reprod* 2002;**17**:2402-2409.
- Desai NN, Goldstein J, Rowland DY, Goldfarb JM (2000) Morphological evaluations of human embryos and derivation of an embryo quality scoring system specific for day 3 embryos: a preliminary study. *Human Reprod* 2000;**15**:2190-2196
- Diamond MP, Willman S, Chenette P, Cedars MI. The clinical need for a method of identification of embryos destined to become a blastocyst in assisted reproductive technology cycles. *J Assist Reprod Genet* 2012;**29**:391-396.
- Fenwick J, Platteau P, Murdoch AP, Herbert M. Time from insemination to first cleavage predicts developmental competence of human preimplantation embryos in vitro. *Hum Reprod* 2002;**17**:407-412.
- Filho ES, Noble JA, Poli M, Griffiths T, Emerson G, Wells D. A method for semi-automatic grading of human blastocyst microscope images. *Hum Reprod* 2012;
- Filho ES, Noble JA, Wells D. A review on automatic analysis of human embryo microscope images. *Open Biomed Eng J* 2010;**4**:170-177.
- Fragouli E, Wells D. Aneuploidy screening for embryo selection. *Semin Reprod Med* 2012;**30**:289-301.
- Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schlenker T, Schoolcraft WB. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. *Fertil Steril* 2000;**73**:1155-1158.

- Gelbaya TA, Tsoumpou I, Nardo LG. The likelihood of live birth and multiple birth after single versus double embryo transfer at the cleavage stage: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril* 2010;**94**:936-945.
- Gonzales DS, Pinheiro JC, Bavister BD. Prediction of the developmental potential of hamster embryos in vitro by precise timing of the third cell cycle. *J Reprod Fertil* 1995;**105**:1-8.
- Grisart B, Massip A, Dessy F. Cinematographic analysis of bovine embryo development in serum-free oviduct-conditioned medium. *J Reprod Fertil* 1994;**101**:257-264.
- Guerif F, Lemseffer M, Leger J, Bidault R, Cadoret V, Chavez C, Gasnier O, Saussereau MH, Royere D. Does early morphology provide additional selection power to blastocyst selection for transfer? *Reprod Biomed Online* 2010;**21**:510-519.
- Hardarson T, Hanson C, Sjogren A, Lundin K. Human embryos with unevenly sized blastomeres have lower pregnancy and implantation rates: indications for aneuploidy and multinucleation. *Hum Reprod* 2001;**16**:313-318.
- Hashimoto S, Kato N, Saeki K, Morimoto Y. Selection of high-potential embryos by culture in poly(dimethylsiloxane) microwells and time-lapse imaging. *Fertil Steril* 2012;**97**:332-337.
- Horsthemke B, Ludwig M. Assisted reproduction: the epigenetic perspective. *Hum Reprod Update* 2005;**11**:473-482.
- Kallen B, Finnstrom O, Lindam A, Nilsson E, Nygren KG, Otterblad Olausson P. Trends in delivery and neonatal outcome after in vitro fertilization in Sweden: data for 25 years. *Hum Reprod* 2010;**25**:1026-1034.
- Kalra SK, Ratcliffe SJ, Barnhart KT, Coutifaris C. Extended Embryo Culture and an Increased Risk of Preterm Delivery. *Obstetrics & Gynecology* 2012;**120**:69-75
10.1097/AOG.1090b1013e31825b31888fc.
- Kirkegaard K, Agerholm IE, Ingerslev HJ. Time-lapse monitoring as a tool for clinical embryo assessment. *Hum Reprod* 2012a;**27**:1277-1285.
- Kirkegaard K, Hindkjaer JJ, Grondahl ML, Kesmodel US, Ingerslev HJ. A randomized clinical trial comparing embryo culture in a conventional incubator with a time-lapse incubator. *J Assist Reprod Genet* 2012b;

- Lemmen JG, Agerholm I, Ziebe S. Kinetic markers of human embryo quality using time-lapse recordings of IVF/ICSI-fertilized oocytes. *Reprod Biomed Online* 2008;**17**:385-391.
- Lundin K, Bergh C, Hardarson T. Early embryo cleavage is a strong indicator of embryo quality in human IVF. *Hum Reprod* 2001;**16**:2652-2657.
- Machiter R and Racowsky C. Morphological systems of human embryo assesment and clinical evidence. *Reproductive BioMedicine Online* 2013;**26**:210-221
- Manipalviratn S, DeCherney A, Segars J. Imprinting disorders and assisted reproductive technology. *Fertil Steril* 2009;**91**:305-315.
- Meseguer M, Herrero J, Tejera A, Hilligsoe KM, Ramsing NB, Remohi J. The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Hum Reprod* 2011;**26**:2658-71
- Milki AA, Hinckley MD, Behr B. Comparison of blastocyst transfer to day 3 transfer with assisted hatching in the older patient. *Fertil Steril* 2002;**78**:1244-1247.
- Milki AA, Jun SH, Hinckley MD, Behr B, Giudice LC, Westphal LM. Incidence of monozygotic twinning with blastocyst transfer compared to cleavage-stage transfer. *Fertil Steril* 2003;**79**:503-506.
- Mio Y, Maeda K. Time-lapse cinematography of dynamic changes occurring during in vitro development of human embryos. *Am J Obstet Gynecol* 2008;**199**:660 e661-665.
- Montag M, Liebenthron J, Koster M. Which morphological scoring system is relevant in human embryo development? *Placenta* 2011;**32**:S252-S256.
- Nakahara T, Iwase A, Goto M, Harata T, Suzuki M, Ienaga M, Kobayashi H, Takikawa S, Manabe S, Kikkawa F, *et al.* Evaluation of the safety of time-lapse observations for human embryos. *J Assist Reprod Genet* 2010;**27**:93-96.
- Nel-Themaat L, Nagy ZP. A review of the promises and pitfalls of oocyte and embryo metabolomics. *Placenta* 2011;**32 Suppl 3**:S257-263.
- Niemitz EL, Feinberg AP. Epigenetics and assisted reproductive technology: a call for investigation. *Am J Hum Genet* 2004;**74**:599-609.
- Papanikolaou EG, Camus M, Kolibianakis EM, Van Landuyt L, Van Steirteghem A, Devroey P. In vitro fertilization with single blastocyst-stage versus single cleavage-stage embryos. *N Engl J Med* 2006;**354**:1139-1146.
- Papanikolaou EG, D'Haeseleer E, Verheyen G, Van de Velde H, Camus M, Van Steirteghem A, Devroey P, Tournaye H. Live birth rate is significantly higher after blastocyst

- transfer than after cleavage-stage embryo transfer when at least four embryos are available on day 3 of embryo culture. A randomized prospective study. *Hum Reprod* 2005;**20**:3198-3203.
- Paternot G, Deroe J, Debrock S, D'Hooghe TM, Spiessens C. Intra-and Inter-observer analysis in the morphological assessment of early-stage embryos. *Reproductive biology and endocrinology: RB&E* 2009;**7**:105.
- Payne D, Flaherty SP, Barry MF, Matthews CD. Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse video cinematography. *Hum Reprod* 1997;**12**:532-541.
- Pribenszky C, Losonczy E, Molnar M, Lang Z, Matyas S, Rajczy K, Molnar K, Kovacs P, Nagy P, Conceicao J, *et al.* Prediction of in-vitro developmental competence of early cleavage-stage mouse embryos with compact time-lapse equipment. *Reprod Biomed Online* 2010;**20**:371-379.
- Racowsky C, Vernon M, Mayer J, Ball GD, Behr B, Pomeroy KO, Wininger D, Gibbons W, Conaghan J, Stern JE. Standardization of grading embryo morphology. *Fertil Steril* 2010;**94**:1152-1153.
- Rijnders PM, Jansen CA. Influence of group culture and culture volume on the formation of human blastocysts: a prospective randomized study. *Hum Reprod* 1999;**14**:2333-2337.
- Scott R, Tao X, Taylor D, Ferry KM, Treff NR. A prospective randomized controlled trial demonstrating significantly increased clinical pregnancy rates following 24 chromosome aneuploidy screening: biopsy and analysis on day 5 with fresh transfer. *Fertil Steril* 2010;**94**:S2.
- Scott RT, Jr., Ferry K, Su J, Tao X, Scott K, Treff NR. Comprehensive chromosome screening is highly predictive of the reproductive potential of human embryos: a prospective, blinded, nonselection study. *Fertil Steril* 2012;**97**:870-875.
- Seli E, Robert C, Sirard MA. OMICS in assisted reproduction: possibilities and pitfalls. *Mol Hum Reprod* 2010a;**16**:513-530.
- Seli E, Vergouw CG, Morita H, Botros L, Roos P, Lambalk CB, Yamashita N, Kato O, Sakkas D. Noninvasive metabolomic profiling as an adjunct to morphology for noninvasive embryo assessment in women undergoing single embryo transfer. *Fertil Steril* 2010b;**94**:535-542.

- Sugimura S, Akai T, Somfai T, Hirayama M, Aikawa Y, Ohtake M, Hattori H, Kobayashi S, Hashiyada Y, Konishi K, *et al.* Time-lapse cinematography-compatible polystyrene-based microwell culture system: a novel tool for tracking the development of individual bovine embryos. *Biol Reprod* 2010;**83**:970-978.
- Swann K, Windsor S, Campbell K, Elgmati K, Nomikos M, Zernicka-Goetz M, Amso N, Lai FA, Thomas A, Graham C. Phospholipase C-zeta-induced Ca²⁺ oscillations cause coincident cytoplasmic movements in human oocytes that failed to fertilize after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2012;**97**:742-747.
- Vajta G, Peura TT, Holm P, Paldi A, Greve T, Trounson AO, Callesen H. New method for culture of zona-included or zona-free embryos: the Well of the Well (WOW) system. *Mol Reprod Dev* 2000;**55**:256-264.
- van Montfoort AP, Dumoulin JC, Land JA, Coonen E, Derhaag JG, Evers JL. Elective single embryo transfer (eSET) policy in the first three IVF/ICSI treatment cycles. *Hum Reprod* 2005;**20**:433-436.
- Vergouw CG, Kieslinger DC, Kostelijk EH, Botros LL, Schats R, Hompes PG, Sakkas D, Lambalk CB. Day 3 embryo selection by metabolomic profiling of culture medium with near-infrared spectroscopy as an adjunct to morphology: a randomized controlled trial. *Hum Reprod* 2012;
- Vernon M, Stern JE, Ball GD, Wininger D, Mayer J, Racowsky C. Utility of the national embryo morphology data collection by the Society for Assisted Reproductive Technologies (SART): correlation between day-3 morphology grade and live-birth outcome. *Fertil Steril* 2011;**95**:2761-2763.
- Wathlet S, Adriaenssens T, Segers I, Verheyen G, Janssens R, Coucke W, Devroey P, Smits J. New candidate genes to predict pregnancy outcome in single embryo transfer cycles when using cumulus cell gene expression. *Fertil Steril* 2012;
- Wathlet S, Adriaenssens T, Segers I, Verheyen G, Van de Velde H, Coucke W, Ron El R, Devroey P, Smits J. Cumulus cell gene expression predicts better cleavage-stage embryo or blastocyst development and pregnancy for ICSI patients. *Hum Reprod* 2011;**26**:1035-1051.
- Wong C, Loewke K, Bossert N, Behr B, De Jonge C, Baer T, Reijo Pera R. Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage. *Nat Biotechnol* 2010;**28**:1115-1121.

Yang Z, Liu J, Collins GS, Salem SA, Liu X, Lyle SS, Peck AC, Sills ES, Salem RD.

Selection of single blastocysts for fresh transfer via standard morphology assessment alone and with array CGH for good prognosis IVF patients: results from a randomized pilot study. *Molecular cytogenetics* 2012;5:24.

Lo que antecede simplemente ilustra los principios de la invención. Se apreciará que los expertos en la técnica podrán concebir diversas disposiciones que, aunque no se describan o muestren aquí explícitamente, encarnan los principios de la invención y se incluyen en su alcance. Además, todos los ejemplos y el lenguaje condicional aquí citados están principalmente destinados a ayudar al lector a comprender los principios de la invención y los conceptos aportados por los inventores para impulsar la técnica, y que se han de considerar como sin limitación a dichos ejemplos y condiciones específicamente citados.

Además, todas las declaraciones que aquí se hacen que citan principios, aspectos y realizaciones de la invención, así como sus ejemplos específicos, pretenden incluir sus equivalentes tanto estructurales como funcionales. Además, se pretende que dichos equivalentes incluyan tanto equivalentes actualmente conocidos como equivalentes desarrollados en el futuro, es decir, cualesquiera elementos desarrollados que realicen la misma función, independientemente de la estructura. No se pretende limitar, por lo tanto, el alcance de la presente invención a las realizaciones ejemplares aquí mostradas y descritas. En lugar de ello, el alcance de la presente invención está encarnado por las realizaciones adjuntas.

Declaraciones de la descripción

A. Un método de elevada especificidad para seleccionar uno o más embriones humanos que es probable que alcancen el estadio de blastocisto, que comprende: cultivar uno o más embriones humanos en condiciones suficientes para el desarrollo de los embriones; obtener la imagen de lapso temporal de dichos uno o más embriones durante la duración de al menos un ciclo celular mitótico; medir parámetros celulares, que comprenden: (a) el intervalo de tiempo entre mitosis 1 y mitosis 2, y (b) el intervalo de tiempo entre mitosis 2 y mitosis 3, y seleccionar un embrión que es probable que alcance el estadio de blastocisto cuando: (i) el intervalo de tiempo entre la resolución de la mitosis 1 y la aparición de la mitosis 2 es de aproximadamente 9,33-11,45 horas, y (ii) el intervalo de tiempo entre la aparición de la mitosis 2 y la aparición de la mitosis 3 es de aproximadamente 0-1,73 horas, seleccionando así con una elevada especificidad uno o más embriones humanos que es probable que alcancen el estadio de blastocisto.

B. El método de la declaración A, en donde se miden dichos parámetros celulares por microscopía de lapso temporal.

C. El método de la declaración A, en donde dichos parámetros celulares comprenden además la duración del ciclo celular 1.

D. El método de la declaración C, en donde un embrión es más probable que alcance el estadio de blastocisto cuando la duración del ciclo celular 1 es de aproximadamente 20 a aproximadamente 27 horas.

E. El método de la declaración A, en donde dicho embrión humano no tiene indicación de que sea probable que alcance el estadio de blastocisto cuando hay (a) un intervalo de tiempo mayor o menor entre la resolución de la mitosis 1 y la aparición de la mitosis 2 para dicho embrión humano que para dicho embrión humano de referencia; o (b) un intervalo de tiempo mayor entre el inicio de la mitosis 2 y la aparición de la mitosis 3 para dicho embrión humano que para dicho embrión humano de referencia.

F. El método de la declaración E, en donde dichos parámetros celulares comprenden además la duración del ciclo celular 1.

G. El método de la declaración F, en donde dicho embrión humano no tiene indicación de que sea más probable que alcance el estadio de blastocisto cuando la duración del ciclo celular 1 es mayor de aproximadamente 27 horas.

H. El método de la declaración A, en donde se producen dichos embriones por fertilización de oocitos *in vitro*.

I. El método de la declaración A, en donde dichos oocitos maduran *in vitro*.

J. El método de la declaración I, en donde se suplementa a dichos oocitos madurados *in vitro* con factores de crecimiento.

K. El método de la declaración A, en donde no se han congelado los embriones antes de medir los parámetros.

L. El método de la declaración A, en donde se han congelado los embriones antes de medir los parámetros.

M. El método de la declaración A, que además comprende implantar el embrión humano seleccionado que es más

probable que alcance el estadio de blastocisto en un sujeto humano mujer.

N. El método de la declaración A, que además comprende congelar el embrión humano seleccionado que es más probable que alcance el estadio de blastocisto.

O. El método de la declaración A, en donde la medición de los parámetros celulares está automatizada.

5 P. El método de la declaración A, en donde la selección con elevada especificidad de uno o más embriones humanos que es más probable que alcancen el estadio de blastocisto está automatizada.

Q. El método de la declaración A, en donde dicha imagen de lapso temporal adquiere imágenes que se guardan digitalmente.

R. El método de la declaración A, en donde dicha imagen de lapso temporal emplea iluminación de campo oscuro.

10 S. El método de la declaración A, en donde se ponen dichos uno o más embriones humanos en una placa de cultivo antes de cultivar en condiciones suficientes para el desarrollo de embriones.

T. El método de la declaración S, en donde dicha placa de cultivo comprende una pluralidad de micropocillos.

U. El método de la declaración T, en donde dicha placa de cultivo comprende de 1 a aproximadamente 30 micropocillos.

15 V. El método de la declaración T, en donde se ponen uno o más embriones humanos dentro de un micropocillo antes de cultivar en condiciones suficientes para el desarrollo de embriones.

W. El método de la declaración A, en donde se realiza la medición en una estación de imagen.

X. El método de la declaración A, en donde el uno o más embriones humanos seleccionados que es más probable que alcancen el estadio de blastocisto tienen la capacidad de implantarse con éxito en un útero.

20 Y. El método de la declaración X, en donde el uno o más embriones humanos con la capacidad de implantarse con éxito en el útero tienen la capacidad de pasar por toda la gestación.

Z. El método de la declaración Y, en donde el uno o más embriones humanos con la capacidad de pasar por toda la gestación tienen la capacidad de nacer vivos.

25 AA. El método de la declaración A, en donde la selección con elevada especificidad comprende transferir dichos uno o más embriones humanos.

AB. El método de la declaración AA, en donde se realiza dicha transferencia hacia el estadio de 4 células.

30 AC. Un método de elevada especificidad para seleccionar uno o más embriones humanos que no es probable que alcancen el estadio de blastocisto, que comprende: cultivar uno o más embriones humanos en condiciones suficientes para el desarrollo de embriones; obtener imágenes de lapso temporal de dichos uno o más embriones durante la duración de al menos un ciclo celular mitótico; medir los parámetros celulares, que comprenden: (a) el intervalo de tiempo entre mitosis 1 y mitosis 2, y (b) el intervalo de tiempo entre mitosis 2 y mitosis 3, y seleccionar un embrión que no es probable que alcance el estadio de blastocisto cuando, (i) el intervalo de tiempo entre la resolución de la mitosis 1 y la aparición de la mitosis 2 es menor de aproximadamente 9,33 horas o más de aproximadamente 11,45 horas, o (ii) el intervalo de tiempo entre la aparición de la mitosis 2 y la aparición de la mitosis 3 es mayor de aproximadamente 1,73 horas, seleccionando así con elevada especificidad uno o más embriones humanos que no es probable que alcancen el estadio de blastocisto.

40 AD. Un método de elevada especificidad para seleccionar uno o más embriones humanos que es probable que alcancen el estadio de blastocisto utilizable, que comprende: cultivar uno o más embriones humanos en condiciones suficientes para el desarrollo de embriones; obtener imágenes de lapso temporal de dichos uno o más embriones durante la duración de al menos un ciclo celular mitótico; medir los parámetros celulares, que comprenden: (a) el intervalo de tiempo entre mitosis 1 y mitosis 2, y (b) el intervalo de tiempo entre mitosis 2 y mitosis 3, y seleccionar un embrión que es probable que alcance el estadio de blastocisto utilizable cuando (i) el intervalo de tiempo entre la resolución de la mitosis 1 y la aparición de la mitosis 2 es de aproximadamente 9,33-11,45 horas, y (ii) el intervalo de tiempo entre la aparición de la mitosis 2 y la aparición de la mitosis 3 es de aproximadamente 0-1,73 horas, seleccionando así con elevada especificidad uno o más embriones humanos que es probable que alcancen el estadio de blastocisto utilizable.

45 AE. Un método de elevada especificidad para seleccionar uno o más embriones humanos que no es probable que alcancen el estadio de blastocisto utilizable, que comprende: cultivar uno o más embriones humanos en condiciones suficientes para el desarrollo de embriones; obtener imágenes de lapso temporal de dichos uno o más embriones durante la duración de al menos un ciclo celular mitótico; medir los parámetros celulares, que comprenden: (a) el intervalo de tiempo entre mitosis 1 y mitosis 2, y (b) el intervalo de tiempo entre mitosis 2 y mitosis 3, y seleccionar un

- embrión que no es probable que alcance el estadio de blastocisto utilizable cuando (i) el intervalo de tiempo entre la resolución de la mitosis 1 y la aparición de la mitosis 2 es menor de aproximadamente 9,33 horas o más de aproximadamente 11,45 horas, o (ii) el intervalo de tiempo entre la aparición de la mitosis 2 y la aparición de la mitosis 3 es mayor de aproximadamente 1,73 horas; seleccionando así con elevada especificidad uno o más embriones humanos que no es probable que alcancen el estadio de blastocisto utilizable.
- 5
- AF. Un método de elevada especificidad para valorar si es probable que uno o más embriones humanos alcancen el estadio de blastocisto utilizable, que comprende: cultivar uno o más embriones humanos en condiciones suficientes para el desarrollo de embriones; obtener imágenes de lapso temporal de dichos uno o más embriones durante la duración de al menos un ciclo celular mitótico; medir los parámetros celulares, que comprenden: (a) el intervalo de tiempo entre mitosis 1 y mitosis 2, y (b) el intervalo de tiempo entre mitosis 2 y mitosis 3, y determinar que es probable que un embrión alcance el estadio de blastocisto utilizable cuando (i) el intervalo de tiempo entre la resolución de la mitosis 1 y la aparición de la mitosis 2 es de aproximadamente 9,33-11,45 horas, y (ii) el intervalo de tiempo entre la aparición de la mitosis 2 y la aparición de la mitosis 3 es de aproximadamente 0-1,73 horas, y seleccionar con elevada especificidad uno o más embriones humanos que es probable que alcancen el estadio de blastocisto utilizable.
- 10
- 15 AG. Un método para seleccionar uno o más embriones humanos fertilizados *in vitro* que es probable que alcancen el estadio de blastocisto, que comprende: cultivar uno o más embriones humanos *in vitro* en condiciones suficientes para el desarrollo de embriones; obtener imágenes de lapso temporal de dichos uno o más embriones humanos; determinar si un embrión es de buena o mala calidad por valoración morfológica; medir los parámetros celulares, que comprenden: (a) el intervalo de tiempo entre mitosis 1 y mitosis 2, y (b) el intervalo de tiempo entre mitosis 2 y mitosis 3, y seleccionar un embrión que es probable que alcance el estadio de blastocisto cuando: la valoración morfológica determina que el embrión es de buena calidad y el intervalo de tiempo entre mitosis 1 y mitosis 2 es de aproximadamente 9,33-11,45 horas y el intervalo de tiempo entre mitosis 2 y mitosis 3 es de aproximadamente 0-1,73 horas.
- 20
- AH. El método de la declaración AG, en donde se hace la valoración morfológica antes, al mismo tiempo o después de la medición de los parámetros celulares.
- 25 AI. El método de la declaración AG, en donde se hace la valoración morfológica el día 3 posinseminación.
- AJ. El método de la declaración AI, en donde la valoración morfológica incluye determinar el número de células, determinar el nivel de fragmentación y/o determinar la simetría de los blastómeros.
- AK. El método de la declaración AJ, en donde la valoración morfológica determina si un embrión es de buena calidad cuando el embrión tiene 6-10 células, tiene menos de un 10% de fragmentación y tiene blastómeros simétricos.
- 30 AL. El método de la declaración AG, que además comprende implantar el embrión humano seleccionado que es más probable que alcance el estadio de blastocisto en una mujer.
- AM. El método de la declaración AG, que además comprende congelar el embrión humano seleccionado que es más probable que alcance el estadio de blastocisto.
- AN. El método de la declaración AG, en donde la medición de los parámetros celulares está automatizada.
- 35 AO. El método de la declaración AG, en donde se ponen dichos uno o más embriones humanos en una placa de cultivo antes de cultivar en condiciones suficientes para el desarrollo de embriones.
- AP. El método de la declaración AG, en donde el uno o más embriones humanos seleccionados que es más probable que alcancen el estadio de blastocisto tienen la capacidad de implantarse con éxito en el útero.
- 40 AQ. El método de la declaración AP, en donde el uno o más embriones humanos con la capacidad de implantarse con éxito en el útero tienen la capacidad de pasar por toda la gestación.
- AR. El método de la declaración AQ, en donde el uno o más embriones humanos con la capacidad de pasar por toda la gestación tienen la capacidad de nacer vivos.
- 45 AS. Un método para seleccionar uno o más embriones humanos fertilizados *in vitro* que no es probable que alcancen el estadio de blastocisto utilizable, que comprende: cultivar uno o más embriones humanos *in vitro* en condiciones suficientes para el desarrollo de embriones; obtener imágenes de lapso temporal de dichos uno o más embriones humanos; determinar si un embrión es de buena o mala calidad por valoración morfológica; medir los parámetros celulares, que comprenden: (a) el intervalo de tiempo entre mitosis 1 y mitosis 2, y (b) el intervalo de tiempo entre mitosis 2 y mitosis 3, y seleccionar un embrión que no es probable que alcance el estadio de blastocisto utilizable cuando: 1. la valoración morfológica determina que el embrión es de mala calidad, o 2. la valoración morfológica determina que el embrión es de buena calidad, pero el intervalo de tiempo entre mitosis 1 y mitosis 2 es menor de aproximadamente 9,33 horas o más de aproximadamente 11,45 horas o el intervalo entre mitosis 2 y mitosis 3 es de más de aproximadamente 1,73 horas.
- 50
- AT. El método de la declaración AS, en donde se hace la valoración morfológica antes, al mismo tiempo o después de la medición de los parámetros celulares.

- AU. El método de la declaración AS, en donde se hace la valoración morfológica el día 3 posinseminación.
- AV. El método de la declaración AU, en donde la valoración morfológica incluye determinar el número de células, determinar el nivel de fragmentación y/o determinar la simetría de los blastómeros.
- 5 AW. El método de la declaración AV, en donde la valoración morfológica determina que un embrión es de mala calidad cuando el embrión tiene menos de 6 o más de 10 células, tiene más de un 10% de fragmentación y tiene blastómeros asimétricos.
- AX. El método de la declaración AS, en donde la medición de los parámetros celulares está automatizada.
- AY. El método de la declaración AS, en donde se ponen dichos uno o más embriones humanos en una placa de cultivo antes de cultivar en condiciones suficientes para el desarrollo de embriones.
- 10 AZ. Un método para analizar secuencialmente un embrión humano fertilizado *in vitro* para seleccionar un embrión humano que es probable que alcance el estadio de blastocisto o deseleccionar un embrión que no es probable que alcance el estadio de blastocisto utilizable, que comprende: cultivar el embrión *in vitro* en condiciones suficientes para el desarrollo de embriones; determinar si el embrión es de buena o mala calidad por valoración morfológica; obtener imágenes de lapso temporal del embrión durante la duración de al menos un ciclo celular mitótico cuando la valoración morfológica determina que el embrión es de buena calidad, y seleccionar un embrión humano que es probable que alcance el estadio de blastocisto cuando la valoración morfológica determina que el embrión es de buena calidad y el intervalo de tiempo entre mitosis 1 y mitosis 2 es de aproximadamente 9,33-11,45 horas y el intervalo de tiempo entre mitosis 2 y mitosis 3 es de aproximadamente 0-1,73 horas, o deseleccionar un embrión humano que no es probable que alcance el estadio de blastocisto cuando la valoración morfológica determina que el embrión es de mala calidad o la valoración morfológica determina que el embrión es de buena calidad, pero el intervalo de tiempo entre mitosis 1 y mitosis 2 es menor de aproximadamente 9,33 horas y más de aproximadamente 11,45 horas o el intervalo de tiempo entre mitosis 2 y mitosis 3 es de más de aproximadamente 1,73 horas.
- 15
- 20 BA. El método de la declaración AZ, en donde se hace la valoración morfológica el día 3 posinseminación.
- BB. El método de la declaración BA, en donde la valoración morfológica incluye determinar el número de células, determinar el nivel de fragmentación y determinar la simetría de los blastómeros.
- 25
- BC. El método de la declaración BB, en donde la valoración morfológica determina que un embrión es de buena calidad cuando el embrión tiene 6-10 células, tiene menos de un 10% de fragmentación y/o tiene blastómeros simétricos.
- BD. El método de la declaración BC, en donde la valoración morfológica determina que un embrión es de mala calidad cuando el embrión tiene menos de 6 o más de 10 células, tiene más de un 10% de fragmentación y/o tiene blastómeros asimétricos.
- 30
- BE. El método de la declaración AZ, que además comprende implantar el embrión humano seleccionado que es más probable que alcance el estadio de blastocisto en una mujer.
- BF. El método de la declaración AZ, que además comprende congelar el embrión humano seleccionado que es más probable que alcance el estadio de blastocisto.
- BG. El método de la declaración AZ, en donde se pone dicho embrión humano en una placa de cultivo antes de cultivar en condiciones suficientes para el desarrollo de embriones.
- 35
- BH. El método de la declaración AZ, en donde el embrión humano seleccionado que es más probable que alcance el estadio de blastocisto tiene la capacidad de implantarse con éxito en el útero.
- BI. El método de la declaración BH, en donde el embrión humano con la capacidad de implantarse con éxito en el útero tiene la capacidad de pasar por toda la gestación.
- 40
- BJ. El método de la declaración BI, en donde el embrión humano con la capacidad de pasar por toda la gestación tiene la capacidad de nacer vivo.

REIVINDICACIONES

1. Un método para seleccionar uno o más embriones humanos fertilizados *in vitro* que es probable que alcancen el estadio de blastocisto, que comprende:
 - cultivar uno o más embriones humanos *in vitro* en condiciones suficientes para el desarrollo de embriones;
 - 5 obtener imágenes de lapso temporal de dichos uno o más embriones humanos;
 - determinar si un embrión es de buena o mala calidad mediante una valoración morfológica;
 - medir los parámetros celulares, que comprenden:
 - (a) el intervalo de tiempo entre mitosis 1 y mitosis 2, y
 - (b) el intervalo de tiempo entre mitosis 2 y mitosis 3, y
 - 10 seleccionar un embrión que es probable que alcance el estadio de blastocisto cuando:
 - la valoración morfológica determina que el embrión es de buena calidad y el intervalo de tiempo entre mitosis 1 y mitosis 2 está entre 9,33 y 11,45 horas, y
 - el intervalo de tiempo entre mitosis 2 y mitosis 3 está entre 0 y 1,73 horas,
 - 15 en donde se hace la valoración morfológica al mismo tiempo que la medición de los parámetros celulares, en donde la valoración morfológica incluye determinar el nivel de fragmentación y/o determinar la simetría de los blastómeros.
2. El método de la reivindicación 1, que además comprende congelar el embrión humano seleccionado que es más probable que alcance el estadio de blastocisto.
3. El método de la reivindicación 1, en donde la medición de los parámetros celulares está automatizada.
4. El método de la reivindicación 1, en donde se ponen dichos uno o más embriones humanos en una placa de cultivo
20 antes de cultivar en condiciones suficientes para el desarrollo de embriones.

Figura 1

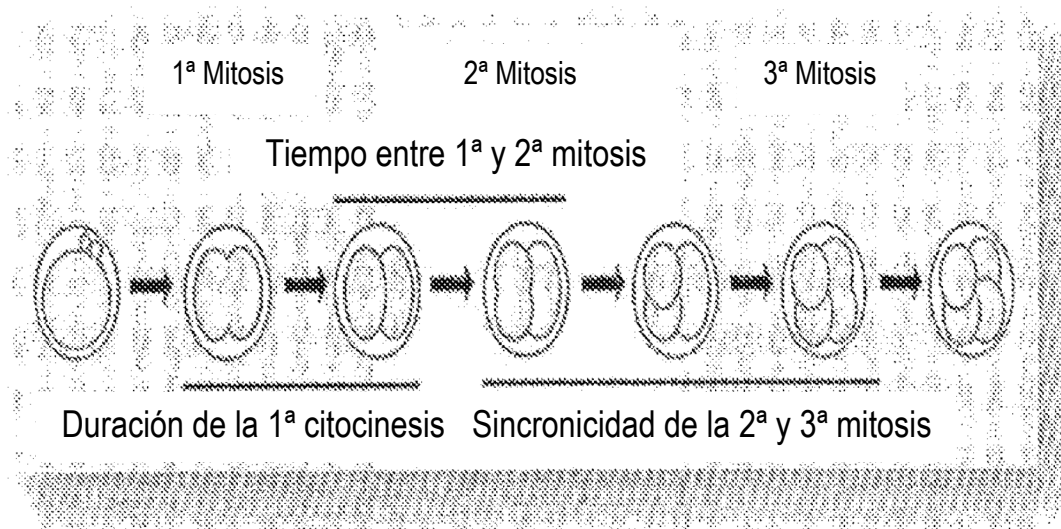
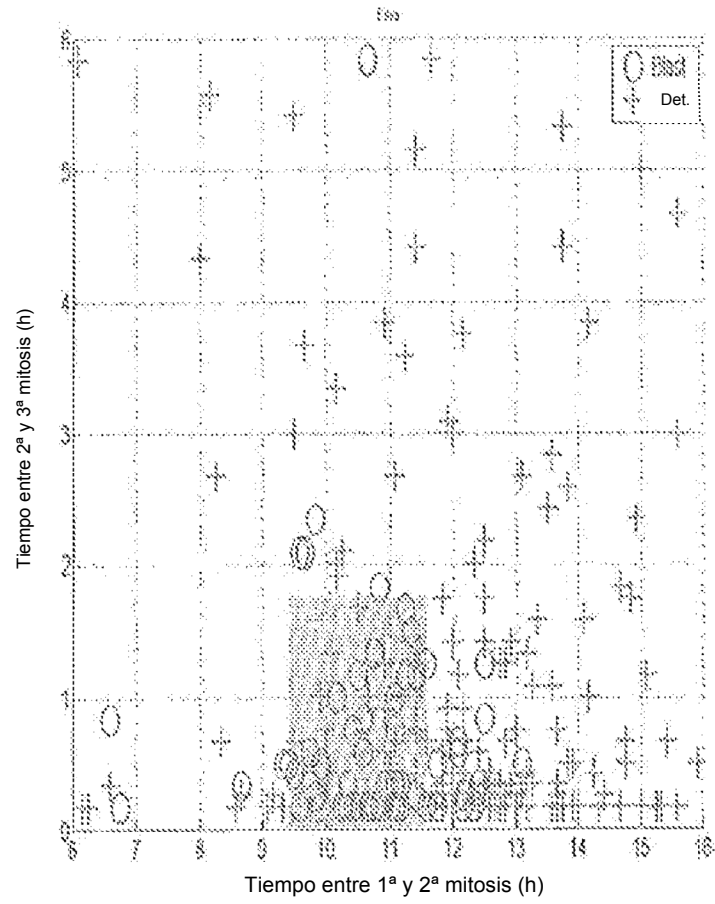
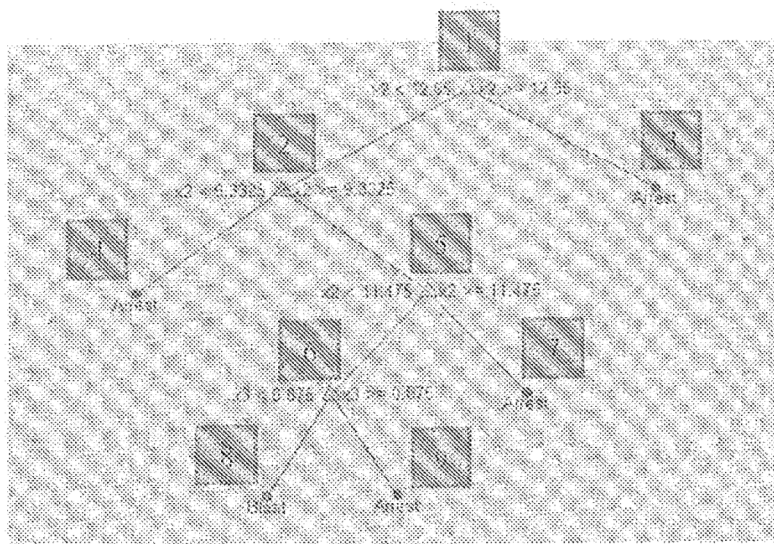


Figura 2



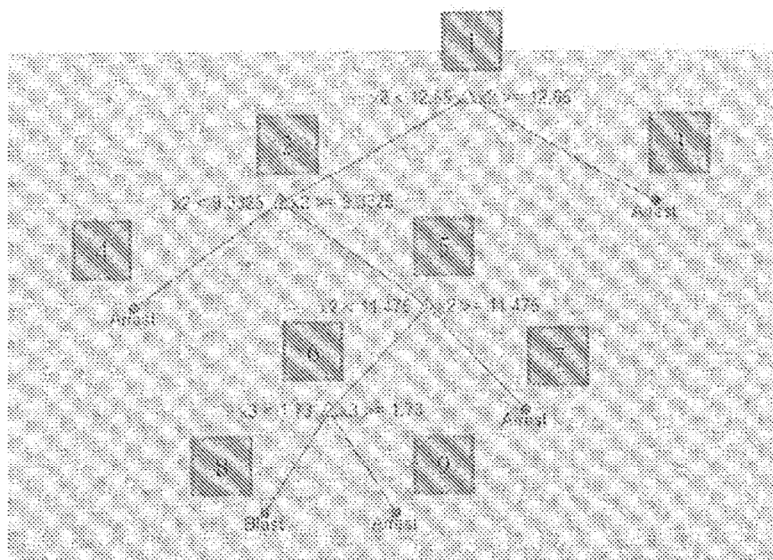
P2: 2ª Mitosis	P3: 3ª Mitosis
9,33 a 11,45 horas	0 - 1,73 horas

Figura 3



Nodo	Tamaño de nodo	Número de blastos	Número de detenidos
1	292	68	224
2	218	66	152
3	74	2	72
4	63	5	58
5	155	61	94
6	91	47	44
7	64	14	50
8	66	39	27
9	25	8	17

Figura 4



Nodo	Tamaño de nodo	Número de blastos	Número de detenidos
1	292	68	224
2	218	66	152
3	74	2	72
4	63	5	58
5	155	61	94
6	91	47	44
7	64	14	50
8	84	46	38
9	7	1	6

Figura 5

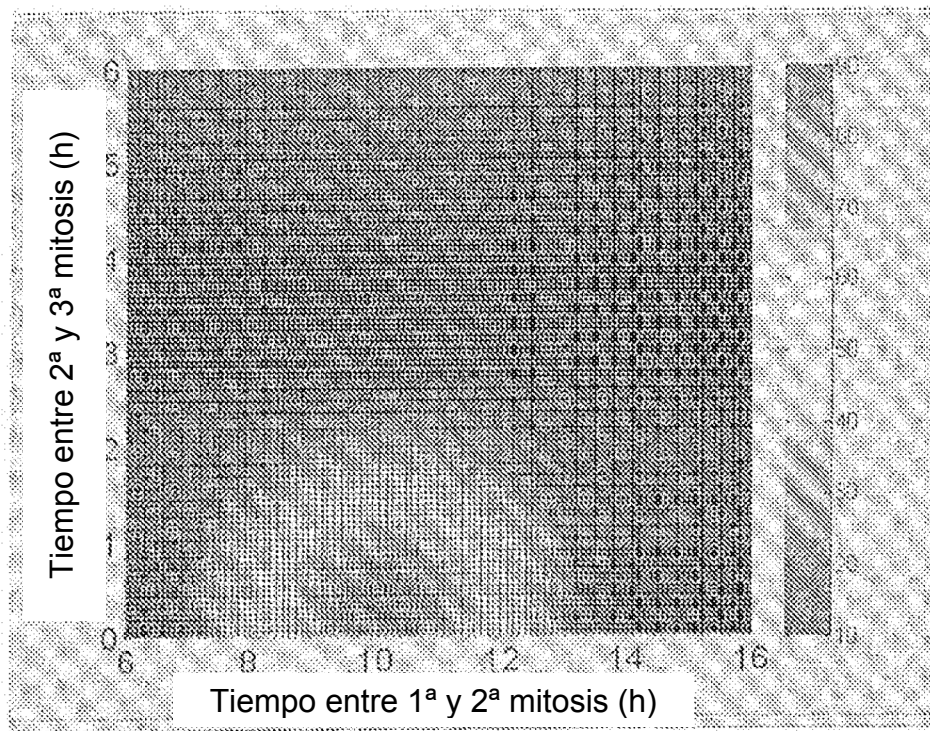
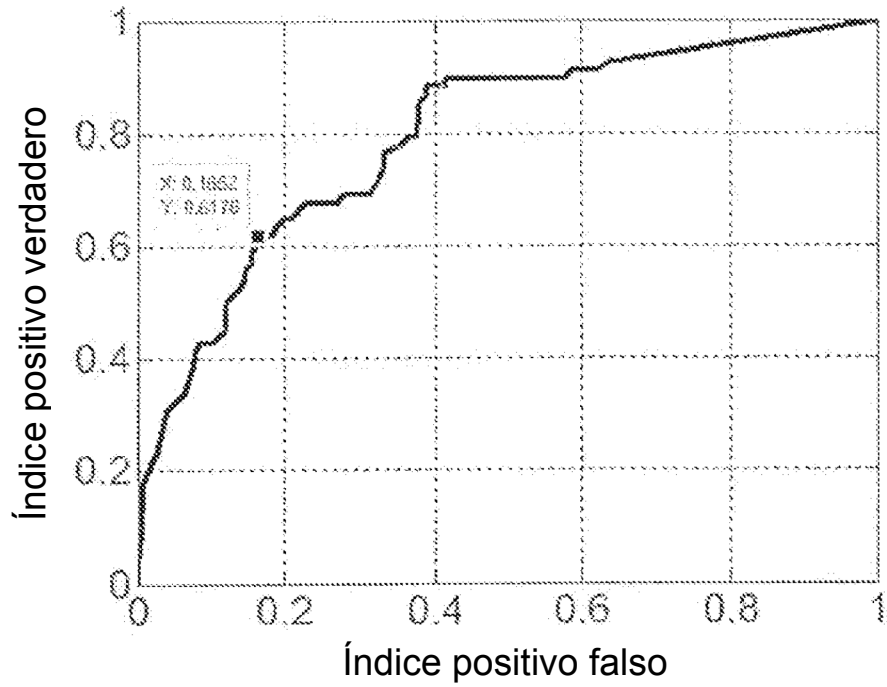


Figura 6

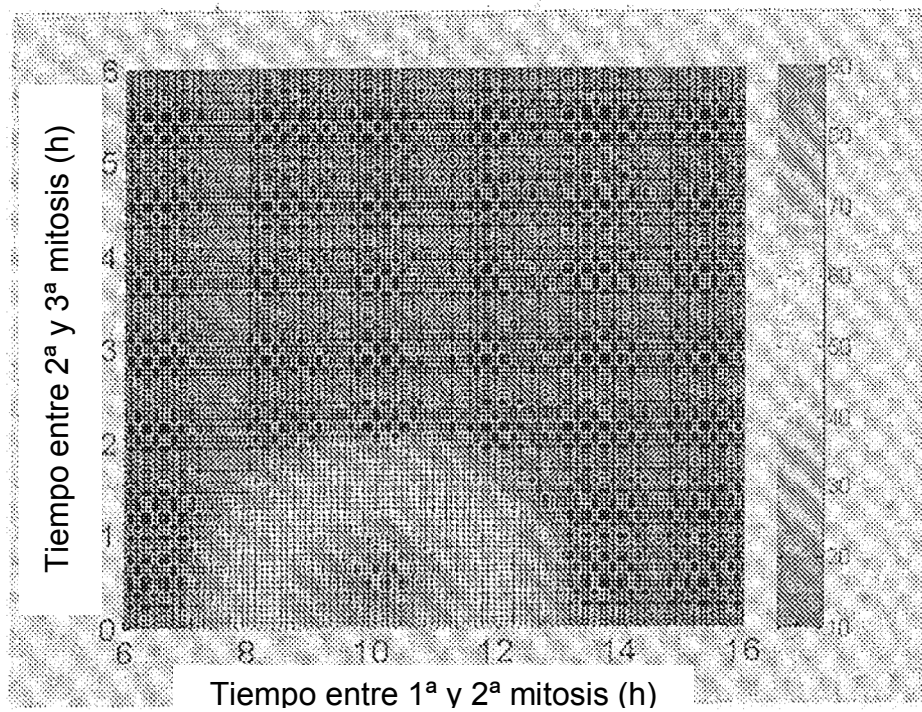
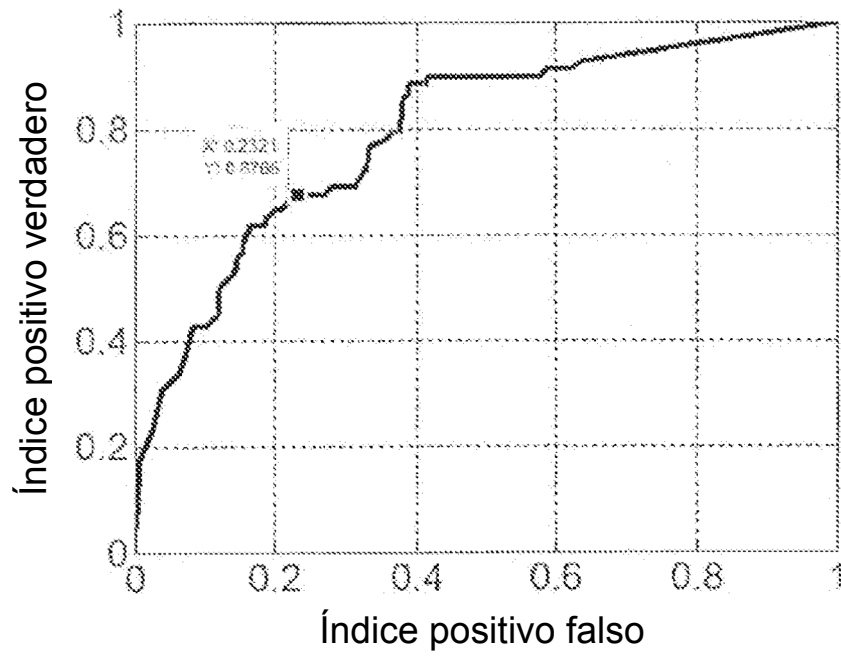


Figura 7

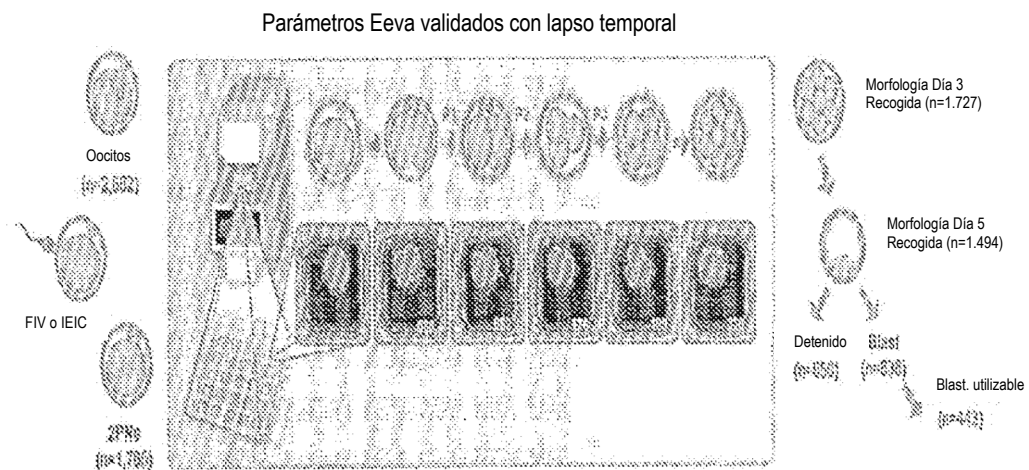


Figura 8

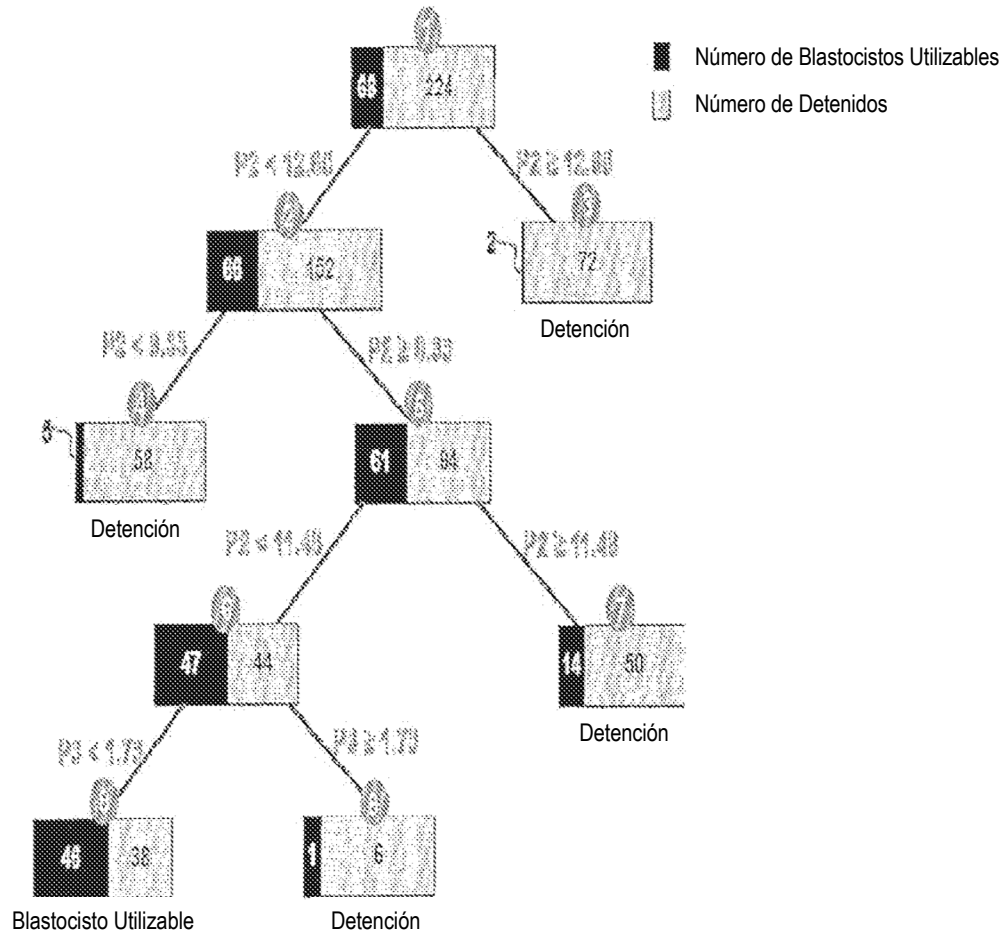


Figura 9

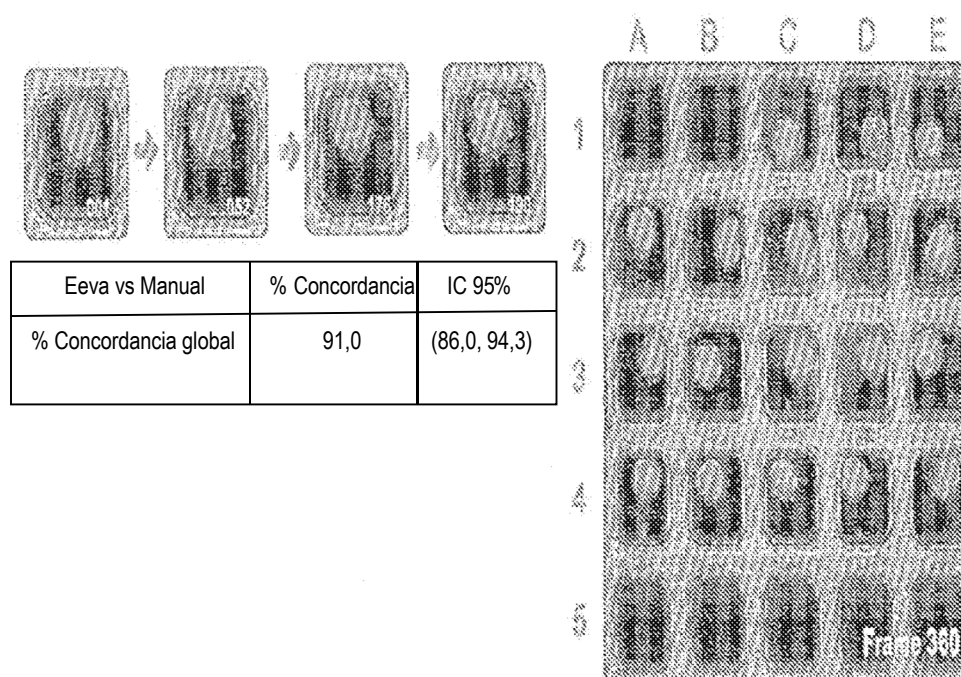


Figura 10

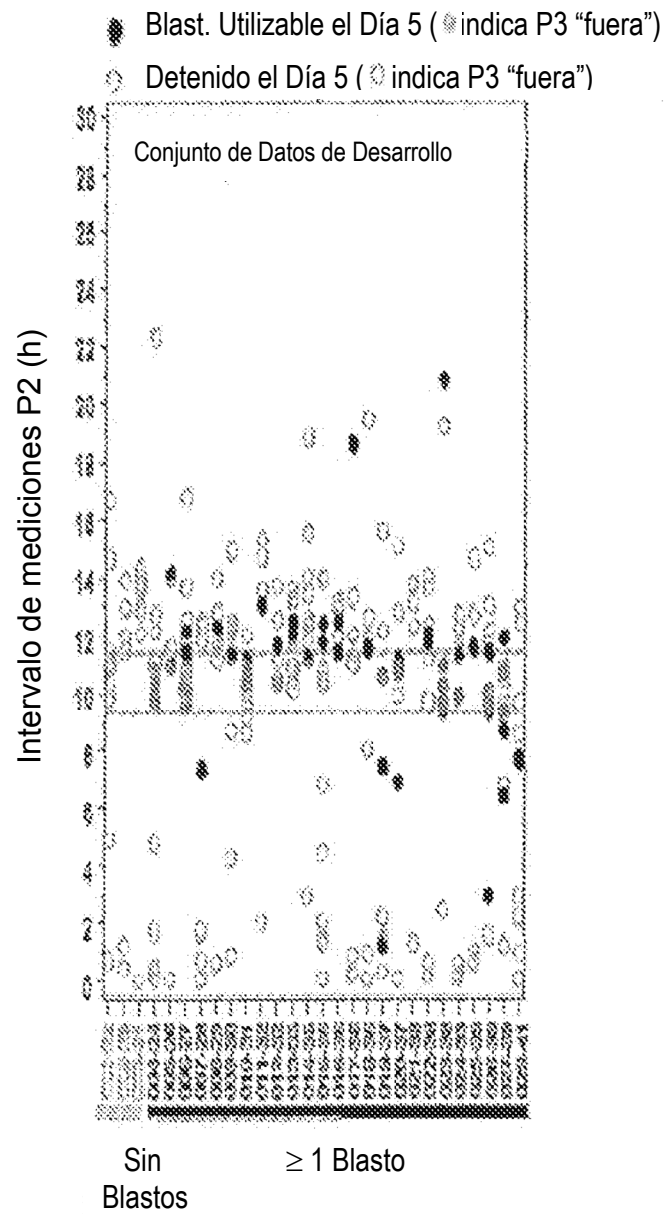


Figura 11

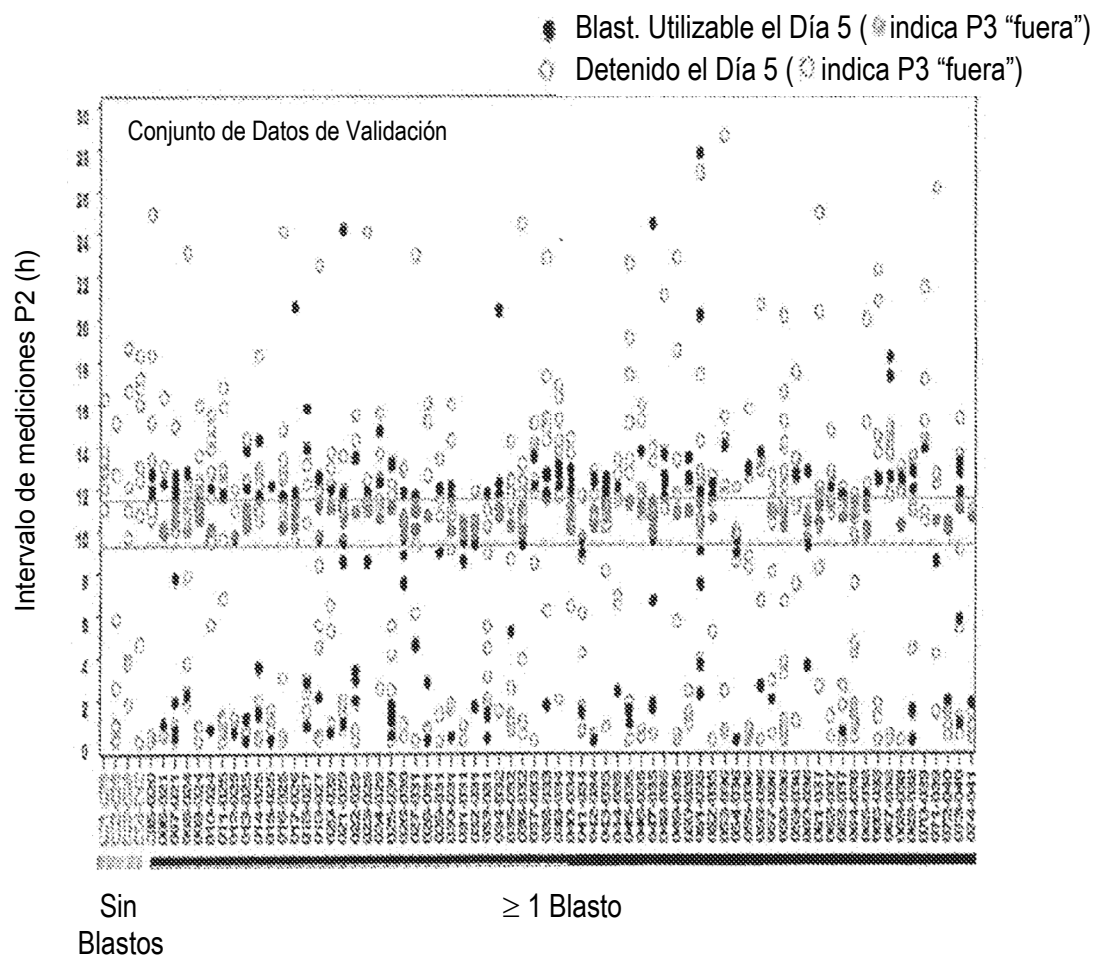


Figura 12

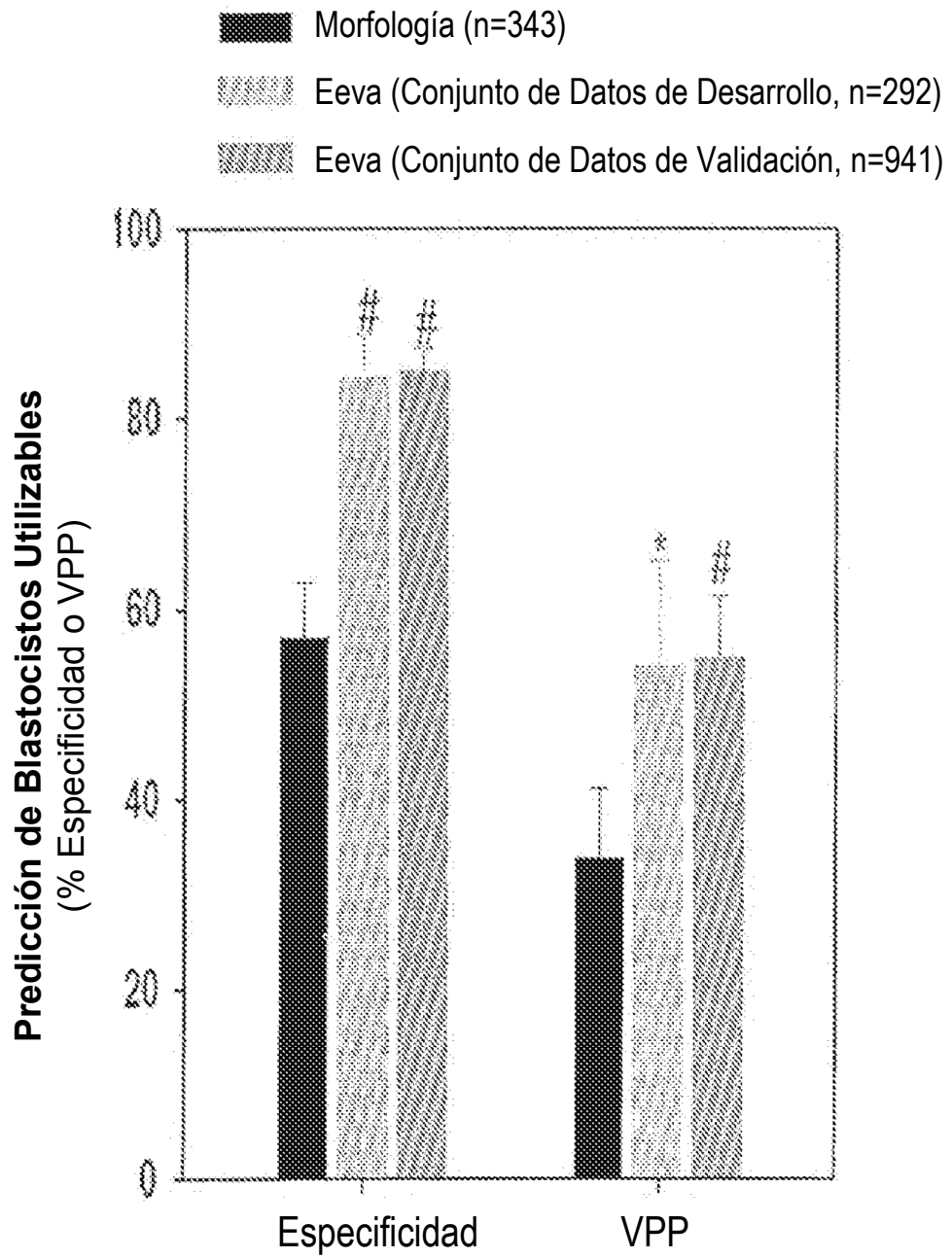


Figura 13

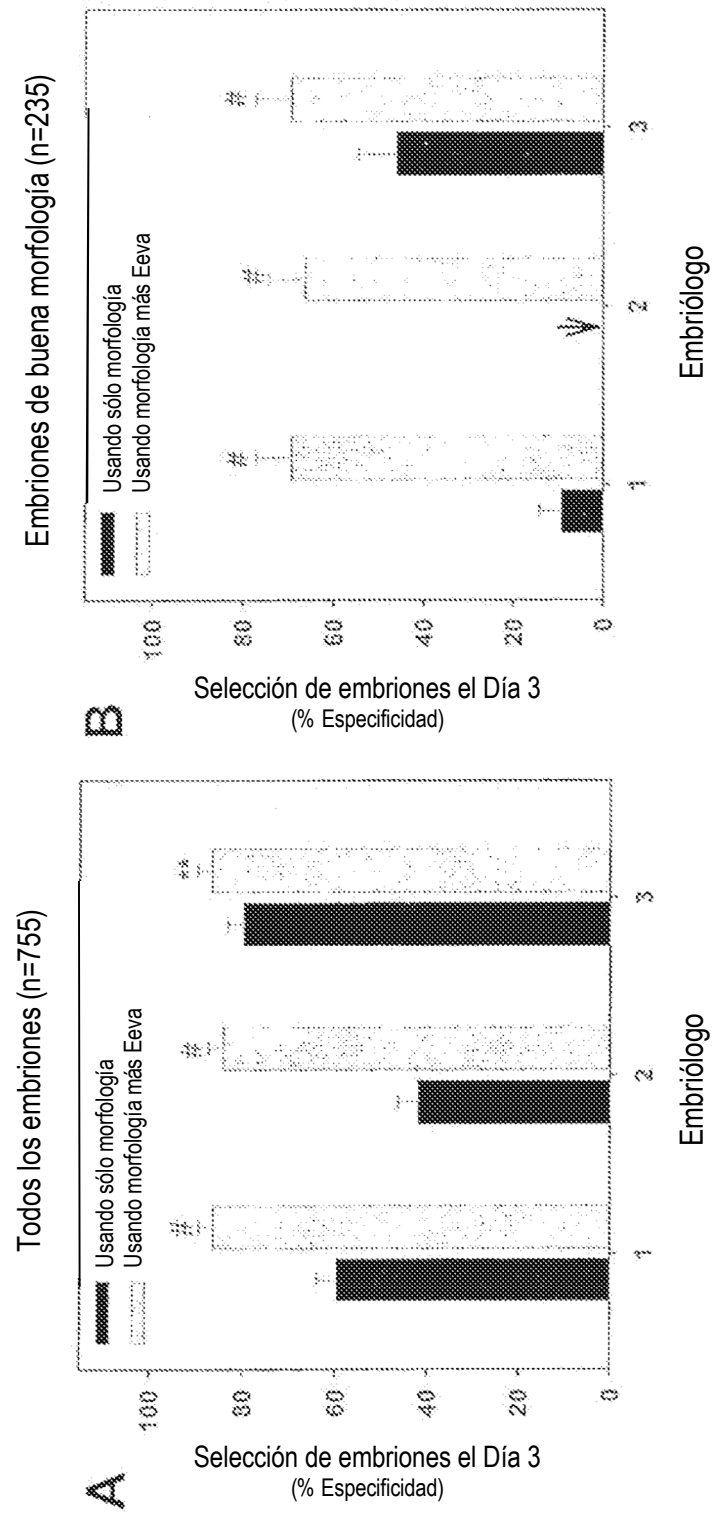


Figura 14

