

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 755 878**

51 Int. Cl.:

A61B 17/43 (2006.01)

A61D 7/00 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.02.2014 PCT/US2014/014449**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.08.2014 WO14121200**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.02.2014 E 14745876 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2019 EP 2950726**

54 Título: **Fenotipos anormales de singamia observados con obtención de imágenes a intervalos de tiempo preestablecidos para identificación precoz de embriones con potencial de desarrollo inferior**

30 Prioridad:

01.02.2013 US 201361759598 P

14.03.2013 US 201361783958 P

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

24.04.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**SHEN, SHEHUA;
CHEN KIM, ALICE, A.;
WIRKA, KELLY, ATHAYDE;
SURAJ, VAISHALI y
TAN, LEI**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 755 878 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

Fenotipos anormales de singamia observados con obtención de imágenes a intervalos de tiempo preestablecidos para identificación precoz de embriones con potencial de desarrollo inferior

Campo de la invención

- 5 Esta invención se refiere al campo de los ensayos biológicos y clínicos, y particularmente a la obtención de imágenes y evaluación de cigotos/embriones tanto de humanos como de animales.

Antecedentes de la invención

10 La infertilidad es un problema sanitario común que afecta al 10-15% de las parejas de edad reproductiva. Solamente en los Estados Unidos, en el año 2006, se realizaron aproximadamente 140.000 ciclos de fertilización *in vitro* (IVF) (cdc.gov/art). Esto dio como resultado el cultivo de más de un millón de embriones anualmente con potencial variable, y en muchos casos mal definido, para implantación y desarrollo a término. La tasa de partos vivos, por ciclo, siguiendo la IVF fue apenas 29%, si bien como promedio el 30% de los partos vivos dieron como resultado gestaciones múltiples (cdc.gov/art). Las gestaciones múltiples tienen resultados adversos bien documentados tanto para la madre como para los fetos, tales como aborto, nacimiento prematuro, y natalidad baja. Las causas potenciales para el fallo de la IVF son
15 diversas; sin embargo, desde la introducción de la IVF en 1978, uno de los retos mayores ha sido la identificación de los embriones que son más adecuados para transferencia y que tienen más probabilidad de dar resultado embarazo a término.

20 La comprensión del desarrollo básico del embrión en la técnica es limitada, dado que los estudios acerca de la biología del embrión humano siguen siendo retardados y en muchos casos carecen de fondos para investigación. Como consecuencia, la mayor parte del conocimiento actual del desarrollo del embrión se deriva de estudios de organismos modelo. Los embriones de diferentes especies pasan por etapas de desarrollo similares, si bien los tiempos varían por especies. Estas diferencias y muchas otras hacen inadecuada la extrapolación directa de una especie a otra. (Taft, R. E. (2008) *Theriogenology* 69(1):10-16). Los caminos generales del desarrollo humano, así como los determinantes moleculares fundamentales subyacentes, son exclusivos para el desarrollo del embrión humano. Por ejemplo, en los
25 ratones, la transcripción del embrión se activa aproximadamente 12 horas después de la fertilización, simultáneamente con la primera división de escisión, mientras que en los humanos la activación génica del embrión (EGA) ocurre el día 3, alrededor de la etapa 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). Adicionalmente, los genes que se modulan en el desarrollo humano temprano son exclusivos (Dobson, T. *et al.* (2004) *Human Molecular Genetics* 13(14):1461-1470). Además, en otras especies tales como el ratón, más del 85% de los embriones cultivados *in vitro* alcanzan la etapa del blastocisto, una de las principales marcas de referencia en el desarrollo de los mamíferos, mientras que los embriones humanos cultivados tienen una tasa media de formación del blastocisto de aproximadamente 30-50%, con una incidencia alta de mosaicismos y fenotipos aberrantes, tales como fragmentación y detención del desarrollo (Rienzi, L. *et al.* (2005) *Reprod. Biomed. Online* 10:669-681; Alikani, M., *et al.* (2005) *Mol. Hum. Reprod.* 11:335-344; Keltz, M. D., *et al.* (2006) *Fertil. Steril.* 86:321-324; French, D. B., *et al.* (2009) *Fertil. Steril.*). A pesar de tales diferencias, la mayoría de los estudios de desarrollo de la preimplantación de embriones se derivan de organismos modelo y son difíciles de relacionar con el desarrollo del embrión humano (Zernicka-Goetz, M. (2002) *Development* 129:815-829; Wang, Q., *et al.* (2004) *Dev Cell.* 6:133-144; Bell, C. E., *et al.* (2008) *Mol. Hum. Reprod.* 14:691-701; Zernicka-Goetz, M. (2006) *Curar. Opina. Genet. Dev.* 16:406-412; Mtango, N. R., *et al.* (2008) *Int. Rev. Cell. Mol. Biol.* 268:223-290).

45 Tradicionalmente, en las clínicas de IVF, la viabilidad de los embriones humanos se ha evaluado por observaciones morfológicas simples 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, se han utilizado también métodos adicionales tales como el cultivo extendido de embriones (hasta la etapa del blastocisto en el día 5) y el análisis del estado cromosómico por la vía de diagnóstico genética de preimplantación (PGD) para evaluar la calidad del embrión (Milki A, *et al.* (2000) *Fertil Steril* 73:126-9; Fragouli E, (2009) *Fertil Steril Jun 21* [EPub ya disponible]; El-Toukhy T, *et al.* (2009) *Hum Reprod* 6:20; Vanneste E, *et al.* (2009) *Nat Med* 15:577-83). Sin embargo, existen también riesgos potenciales de estos métodos en el sentido de que los mismos prolongan el periodo de cultivo e interrumpen la integridad del embrión (Manipalviratn S, *et al.* (2009) *Fertil Steril* 91:305-15; Mastenbroek S, *et al.* (2007) *N Engl J Med.* 357:9-17).

55 Las patentes estadounidenses n.ºs 7.963.906; 8.323.177 y 8.337.387 describen nuevos parámetros de tiempos que incluyen la duración de la primera citocinesis, el intervalo entre la citocinesis 1 y la citocinesis 2, el intervalo entre la mitosis 1 y la mitosis 2, el intervalo entre la citocinesis 2 y la citocinesis 3 y el intervalo entre la mitosis 2 y la mitosis 3, que son útiles en la selección de embriones con potencial de desarrollo satisfactorio que alcanzarán probablemente la etapa del blastocisto, se implantarán en el útero y/o nacerán vivos.

A pesar de los recientes desarrollos en la obtención de imágenes a intervalos de tiempo preestablecidos que permiten a los clínicos seleccionar embriones con mayor potencial de desarrollo basado en parámetros de tiempos del pequeño número de los primeros ciclos celulares, la selección actual de embriones se basa fundamentalmente en evaluaciones morfológicas que son muy subjetivas y ofrecen un valor predictivo limitado de la viabilidad del embrión. El fallo en la

identificación correcta de los embriones más viables puede conducir a tratamiento insatisfactorio de la IVF o embarazo con gestación múltiple. La tecnología de imágenes a intervalos de tiempo preestablecidos permite la monitorización de embriones en tiempo real y proporciona información adicional acerca de la biología del desarrollo del embrión humano. Esta tecnología ha permitido la identificación de nuevos fenotipos de embrión atípicos y nuevos parámetros de tiempos que pueden impactar en el desarrollo del embrión, con inclusión de los nuevos parámetros de singamia descritos en esta memoria.

Compendio de la invención

La invención proporciona métodos, composiciones y kits para determinación de la probabilidad de que uno o más embriones alcanzarán la etapa del blastocisto, llegarán a ser un blastocisto de buena calidad, o se implantarán en el útero o nacerán vivos o serán euploides. Estos métodos, composiciones y kits son útiles en métodos de tratamiento de la infertilidad en humanos y otros animales.

En algunos aspectos de la invención, se proporcionan métodos para la determinación de la probabilidad de que un embrión lleguen a alcanzar la etapa de blastocisto y/o llegue a ser un blastocisto de buena calidad y/o se implante en el útero y/o sea euploide. En algunos aspectos, la determinación de la probabilidad de alcanzar la etapa de blastocisto y/o llegar a ser un blastocisto de buena calidad y/o implantarse en el útero y/o ser euploide viene determinada por la desección con alta especificidad de uno o más embriones humanos que probablemente no alcanzará(n) la etapa de blastocisto, llegará a ser un blastocisto de calidad satisfactoria, o se implantará en el útero, en donde al menos aproximadamente 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o más o 100% de los embriones humanos deseccionados no alcanzará probablemente la etapa de blastocisto y/o se implanten en el útero. En tales aspectos, se miden parámetros celulares de un embrión hasta llegar a una medida de parámetros celulares que puede emplearse para proporcionar una determinación de la probabilidad del embrión para alcanzar la etapa de blastocisto y o el implante en un útero, determinación que puede utilizarse para guiar un curso de acción clínica. En algunas realizaciones, el parámetro celular es un evento morfológico que puede medirse u observarse por microscopía a intervalos de tiempo. En realizaciones particulares, el evento morfológico es singamia. En una realización adicional, se mide el periodo de tiempo entre la singamia y el comienzo de la primera citocinesis, definido como parámetro de tiempo de singamia (P_{sin}).

En una realización, se monitorizan embriones para determinar su fenotipo durante la singamia. En realizaciones adicionales, los embriones se deseccionan como menos probables de alcanzar la etapa de blastocisto o desarrollarse en blastocistos de buena calidad o implantarse en el útero cuando la singamia es anormal (AS). En una realización particular, se determina que un embrión presentará AS cuando existe un movimiento de pronúcleos (PN) desordenado, dispersión retardada de envolturas nucleares, movimiento activo del oolema antes de la dispersión de las envolturas nucleares y/o un periodo de tiempo corto (*p.ej.* menos de aproximadamente 2,5 horas, menos de aproximadamente 2 horas, menos de aproximadamente 1,5 horas, menos de aproximadamente 1 hora, menos de aproximadamente 30 minutos, o menos de aproximadamente 15 minutos) entre la singamia y el comienzo de la primera citocinesis (P_{sin}). Por tanto, en una realización, se mide el periodo de tiempo entre la singamia y el comienzo de la primera citocinesis (P_{sin}). En una realización particular, los embriones con un periodo de tiempo corto entre la singamia y la primera citocinesis (P_{sin}) tienen menos probabilidad de alcanzar la etapa de blastocisto o implantarse en el útero y por tanto se deseleccionan. En cierta realización, los embriones con un periodo de tiempo más corto entre la singamia y la primera citocinesis (P_{sin}) tienen menos probabilidad de alcanzar la etapa de blastocisto o desarrollarse en un blastocisto de buena calidad. Estos embriones exhiben menor potencial de desarrollo y pueden tener menor potencial de implantarse en el útero y se deseleccionan por esta razón. En algunas realizaciones, se deseleccionan embriones por tener menos probabilidad de alcanzar la etapa de blastocisto o implantarse en el útero cuando no puede medirse P_{sin} .

En algunas realizaciones, además de la medida de P_{sin} y la identificación de AS o singamia inconmensurable, se miden uno o más parámetros celulares adicionales, que incluyen: la duración de un evento de citocinesis, *p.ej.* la duración de la citocinesis 1, el intervalo de tiempo entre la citocinesis 1 y la citocinesis 2; o el intervalo de tiempo entre la citocinesis 2 y a citocinesis 3. En algunas realizaciones, los uno o más parámetros celulares son: la duración de un evento mitótico, *p.ej.* el intervalo de tiempo entre la mitosis 1 y la mitosis 2; y el intervalo de tiempo entre la mitosis 2 y la mitosis 3. En ciertas realizaciones, se utiliza también la duración del ciclo celular 1 como parámetro celular. En ciertas realizaciones, se utiliza también como parámetro celular el tiempo entre la fertilización y la etapa de 5 células. En algunas realizaciones, la medida del parámetro celular se emplea por comparación del mismo con una medida de parámetro celular comparable de un embrión de referencia, y la utilización del resultado de esta comparación para proporcionar una determinación de la probabilidad de que el embrión alcance la etapa de blastocisto y/o llegue a ser un blastocisto de buena calidad y/o se implante en el útero. En algunas realizaciones, el embrión es un embrión humano.

En algunos aspectos de la invención, se proporcionan métodos para seleccionar uno o más embriones humanos que es probable que alcancen la etapa de blastocisto o lleguen a ser un blastocisto de buena calidad o se implanten con éxito en el útero por cultivo de uno o más embriones humanos en condiciones suficientes para el desarrollo del embrión. En ciertas realizaciones, los embriones se congelan antes del cultivo. En otras realizaciones, los embriones no se congelan antes del cultivo. En ciertas realizaciones, los uno o más embriones humanos se producen por fertilización de oocitos *in vitro*. En otras realizaciones, los oocitos que se fertilizan *in vitro* se maduran también *in vitro* y pueden suplementarse con factores de crecimiento. En ciertas realizaciones, el uno o más embriones humanos que

se cultiva(n) en condiciones suficientes para el desarrollo del embrión se somete a tratamiento de imágenes por obtención de imágenes a intervalos de tiempo preestablecidos a lo largo de una duración suficiente para incluir al menos un evento de citocinesis o ciclo celular. En una realización particular, la obtención de imágenes a intervalos de tiempo preestablecidos adquiere imágenes que se almacenan digitalmente. En una realización, el tratamiento de imágenes a intervalos de tiempo preestablecidos emplea iluminación de campo oscuro. En otra realización, la obtención de imágenes a intervalos de tiempo preestablecidos emplea iluminación de campo brillante. En otra realización adicional, la obtención de imágenes a intervalos de tiempo preestablecidos emplea una combinación de iluminación de campo oscuro y campo brillante. En una realización, la obtención de imágenes a intervalos de tiempo preestablecidos emplea adquisición en un solo plano. En otra realización, la obtención de imágenes en intervalos de tiempo preestablecidos emplea adquisición en planos múltiples. En una realización, uno o más parámetros celulares se miden por microscopía a intervalos de tiempo preestablecidos. En una realización, el uno o más parámetros celulares es la duración de la primera citocinesis, el intervalo de tiempo entre la primera y la segunda mitosis, el intervalo de tiempo entre la segunda y la tercera mitosis, el intervalo de tiempo entre la citocinesis 1 la citocinesis 2, el intervalo de tiempo entre la citocinesis 2 y la citocinesis 3, la duración del primer ciclo celular y el tiempo entre la fertilización y la etapa de 5 células. En otra realización adicional, se selecciona un embrión cuando la duración de la primera citocinesis es aproximadamente 0 a aproximadamente 33 minutos o el intervalo de tiempo entre la mitosis 1 y la mitosis 2 es aproximadamente 7,8 a aproximadamente 14,3 horas, o el intervalo de tiempo entre la mitosis 2 y la mitosis 3 es aproximadamente 0 a aproximadamente 5,8 horas o el intervalo de tiempo entre la primera citocinesis y la segunda citocinesis es aproximadamente 7,8 a aproximadamente 14,3 horas, o el intervalo de tiempo entre la citocinesis 2 y la citocinesis 3 es aproximadamente 0 a aproximadamente 5,8 horas, o la duración del primer ciclo celular es aproximadamente 24 horas o el tiempo entre la fertilización y la etapa de 5 células es aproximadamente 47 a aproximadamente 57 horas. En todavía otra realización adicional, un embrión humano seleccionado por tener más probabilidad de alcanzar la etapa de blastocisto o implantarse en el útero se deselecciona cuando el embrión exhibe AS, por ejemplo, cuando el embrión exhibe movimiento PN desordenado, dispersión retardada de las envolturas nucleares, movimiento activo del oolema antes de la dispersión de las envolturas nucleares y/o un periodo de tiempo corto (*p. ej.* menos de aproximadamente 2,5 horas, menos de aproximadamente 2 horas, menos de aproximadamente 1,5 horas, menos de aproximadamente 1 hora, menos de aproximadamente 30 minutos, o menos de aproximadamente 15 minutos) entre la singamia y el comienzo de la primera citocinesis (P_{sin}), o cuando no puede medirse la singamia en el embrión.

En una realización, se proporcionan métodos para determinar si un embrión tiene o no probabilidad de ser euploide o aneuploide. En una realización, se determina que un embrión es euploide cuando el mismo exhibe un tiempo entre la singamia y el comienzo de la primera citocinesis (P_{sin}) que es mayor que aproximadamente 2,4 horas, por ejemplo, mayor de aproximadamente 2,5 horas. En una realización afín, se determina que un embrión es aneuploide cuando el mismo exhibe un P_{sin} menor de aproximadamente 2,4 horas, por ejemplo, menor de aproximadamente 2 horas, o menor de aproximadamente 1,5 horas, o menor de aproximadamente 1 hora o menor de aproximadamente 30 min o menor de aproximadamente 15 min.

En algunos aspectos de la invención, se proporcionan métodos para seleccionar los embriones óptimos que tienen mayor probabilidad de alcanzar la etapa de blastocisto, y/o desarrollarse en blastocistos de buena calidad, y/o tienen mayor potencial de desarrollo y/o de implantarse en el útero, y/o nacer vivos y/o ser euploides, por cultivo de embriones humanos *in vitro*, obtención de imágenes de los embriones a intervalos de tiempo preestablecidos para medir parámetros celulares, empleo de los parámetros celulares para determinar la probabilidad de que el embrión alcance el blastocisto, llegue a ser un blastocisto de buena calidad, se implante en el útero y/o nazca vivo y/o sea euploide y adicionalmente por desección de embriones que caigan dentro de ciertos otros parámetros celulares que hacen que sea menos probable que el uno o más embriones humanos alcancen la etapa de blastocisto, se implanten en el útero y/o nazcan vivos y/o tengan mayor probabilidad de que el embrión sea aneuploide.

Breve descripción de los dibujos

La invención se comprenderá mejor a partir de la descripción detallada que sigue cuando se lee en conjunción con los dibujos adjuntos. Se subraya que, con arreglo a la práctica común, las diversas características de los dibujos no están trazadas a escala. Por el contrario, las dimensiones de las diversas características están expandidas o reducidas arbitrariamente en aras de la claridad. En los dibujos se incluyen las figuras siguientes.

La Figura 1 es un diagrama esquemático que representa las series de eventos desde la fertilización a la primera división celular. (a) La entrada del espermatozoide en el oocito desencadena la culminación de la meiosis. Las cromátidas hermanas se separan en la anafase II, creando un oocito haploide. (b) Se extruye un segundo cuerpo polar, y se forma una envoltura pronuclear alrededor de los cromosomas restantes del oocito para dar el pronúcleo hembra, mientras que los cromosomas del espermatozoide se descondensan, formando el pronúcleo varón. Un áster de espermatozoide se asienta en proximidad estrecha al pronúcleo varón, a partir del cual se extiende una configuración de microtúbulos hacia el pronúcleo hembra. (c) El pronúcleo hembra se estira hacia el pronúcleo varón hasta que los dos desembocan en el centro del oocito; los pronúcleos aumentan de tamaño significativamente. (d) Las envolturas pronucleares se desmontan. (e) Los centriolos se dividen en polos opuestos y los cromosomas se alinean en el primer huso mitótico en la metafase. (f) Comienza la primera citocinesis, los cromosomas se segregan en dos nuevas células hijas y se forma la envoltura nuclear para dar los primeros núcleos del embrión. (S) Tiempo desde la desaparición de los pronúcleos (singamia) (D) hasta la primera citocinesis (f).

La Fig. 2 (A) describe e ilustra la definición de AS y la prevalencia de AS y singamia inconmensurable. (B) representa una imagen todavía individual en reposo de un momento fundamental durante el evento de singamia dinámica.

La Fig. 3 es una estimación de densidad de grano (KDE) que muestra el tiempo de singamia hasta la primera citocinesis (P_{sin}) para embriones euploides (o) y aneuploides (+).

5 La Fig. 4 es un gráfico de histograma con estimación de grano que muestra el tiempo de singamia hasta la primera citocinesis (P_{sin}) para embriones euploides (arriba) y aneuploides (abajo).

Descripción detallada de la invención

10 Antes de describir los presentes métodos y composiciones, debe entenderse que esta invención no está limitada a cualquier método o composición particular descrito, dado que los mismos pueden variar, por supuesto. Debe entenderse también que la terminología utilizada en esta memoria tiene únicamente por objeto describir realizaciones particulares, y no debe interpretarse como limitante, dado que el alcance de la presente invención estará limitado únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

15 En los casos en que se proporciona un intervalo de valores, se entenderá que se describe también específicamente cada valor intermedio, hasta la décima parte de la unidad del límite inferior a no ser que el contexto dicte claramente otra cosa, entre los límites superior e inferior de dicho intervalo. Cada intervalo más pequeño entre cualquier valor indicado o valor intermedio en un intervalo indicado y cualquier otro valor indicado o intermedio en dicho intervalo indicado está abarcado dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos intervalos de tiempo más pequeños pueden estar incluidos o excluidos independientemente en el intervalo, y cada intervalo en el que están incluidos cualquiera, ninguno o ambos límites en los intervalos de tiempo más pequeños está abarcado también dentro de la invención, sujeto a cualquier límite excluido específicamente en el rango indicado. En los casos en que el intervalo indicado incluye uno o ambos de los límites, los intervalos de tiempo que excluyen cualquiera o ambos de dichos límites incluidos se incluyen también en la invención.

25 A no ser que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en esta memoria tienen el mismo significado que es entendido comúnmente por una persona con experiencia ordinaria en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque pueden utilizarse en la práctica o los tests de la presente invención cualesquiera métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en esta memoria, se describen a continuación algunos métodos y materiales posibles y preferidos.

30 Debe tenerse en cuenta que, como se utilizan en esta memoria y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno/una", y "el/la" incluyen los correspondientes plurales a no ser que el contexto dicte claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "una célula" incluye una pluralidad de tales células, y la referencia a "el péptido" incluye la referencia a uno o más péptidos y equivalentes de los mismos, p.ej. polipéptidos, conocidos por los expertos en la técnica, etc.

35 Las publicaciones descritas en esta memoria se proporcionan únicamente para su descripción antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada incluido aquí debe interpretarse como una admisión de que la presente invención no da derecho a antedatar a dicha publicación en virtud de invención anterior. Adicionalmente, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes de las fechas de publicación reales que pueden precisar ser confirmadas independientemente.

40 Métodos, composiciones y kits para determinación de la probabilidad de alcanzar la etapa de blastocisto y/o el implante en el útero. Estos métodos, composiciones y kits encuentran aplicación en la identificación de embriones *in vitro* que son muy útiles en el tratamiento de la infertilidad en humanos. Estos y otros objetos, ventajas, y características de la invención resultarán evidentes para dichas personas expertas en la técnica después de la lectura de los detalles de los métodos y composiciones presentes como se describe más completamente a continuación.

45 Las expresiones "potencial de desarrollo" y "competencia de desarrollo" se utilizan en esta memoria para hacer referencia a la aptitud o capacidad de un embrión sano o para crecer o desarrollarse. Los términos pueden hacer referencia a la aptitud o capacidad de un embrión sano para alcanzar la etapa de blastocisto, o para desarrollarse en un blastocisto de buena calidad o implantarse en el útero, o nacer vivo.

50 El término "especificidad" cuando se utiliza en esta memoria con respecto a métodos de predicción y/o evaluación se utiliza para hacer referencia a la capacidad de predecir o evaluar un embrión a fin de determinar la probabilidad de que el embrión no se desarrolle en un blastocisto por evaluación, determinación, identificación o selección de embriones que no alcanzarán probablemente la etapa de blastocisto y/o la implantación en el útero. Especificidad alta, como se utilizan en esta memoria, se refiere al caso en que al menos aproximadamente 70%, 72%, 75%, 77%, 80%, 82%, 85%, 88%, 90%, 92%, 95% o más, o 100% de los embriones humanos no seleccionados no es probable que alcancen la etapa de blastocisto y/o se implanten en el útero y/o sean euploides. En algunas realizaciones, se deseleccionan los embriones que no tienen probabilidad de alcanzar la etapa de blastocisto y/o implantarse en el útero o aquéllos que serán probablemente aneuploides.

55

- 5 El término "embrión" se utiliza en esta memoria para hacer referencia tanto al cigoto que se forma cuando dos células gaméticas haploides, p.ej. un oocito secundario no fertilizado y una célula espermática, se unen para formar una célula diploide totipotente, p.ej. un huevo fertilizado, como al embrión que resulta de las divisiones celulares inmediatamente subsiguientes, es decir escisión embrionaria, hasta la mórula, es decir la etapa de 16 células y la etapa de blastocisto (con masa celular trofodérmica e interior diferenciada).
- El término "blastocisto" se utiliza en esta memoria para describir todos los embriones que alcanzan la cavitación (es decir, la formación de cavidades).
- Las expresiones "nacido vivo" o "parto vivo" se utilizan en esta memoria para incluir, pero no se limitan a partos sanos y/o cromosómicamente normales (número normal de cromosomas, estructura cromosómica normal, orientación normal de los cromosomas, etc.).
- 10 El término "atrofiado" se utiliza en esta memoria para referirse a cualquier embrión que no satisface la definición de blastocisto.
- El término "oocito" se utiliza en esta memoria para referirse a una célula germinal, o gameto, hembra no fertilizada. Los oocitos de la presente solicitud pueden ser oocitos primarios, en cuyo caso los mismos están posicionados o para pasar o están pasando por la meiosis I, u oocitos secundarios, en cuyo caso los mismos están posicionados o para pasar o están pasando por la meiosis II.
- 15 Por "meiosis" se entienden los eventos 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 fraccionan en dos células hijas. Estas células hijas se dividen luego en un segundo ciclo celular meiótico, o meiosis II, que no va acompañado por síntesis de ADN, dando como resultado gametos con un número de cromosomas haploide.
- 20 Por un "ciclo celular mitótico", se entienden los eventos en una célula que dan como resultado la duplicación de los cromosomas de una célula y la división de dichos 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, fraccionando primeramente su material nuclear, y dividiendo después su material citoplásmico y su material nuclear fraccionado (citocinesis) en dos células separadas.
- 25 Por un "primer ciclo celular mitótico" o "ciclo celular 1" o "P1" se entiende el intervalo de tiempo desde la fertilización a la culminación del primer evento de citocinesis, es decir la división del oocito fertilizado en dos células hijas. En casos en los que los oocitos se fertilizan *in vitro*, el intervalo de tiempo desde la inyección de la gonadotropina coriónica humana (HCG) (administrada por lo general antes de la recuperación del oocito) hasta la culminación del primer evento de citocinesis puede utilizarse como intervalo de tiempo subrogado.
- 30 Por un "segundo ciclo celular mitótico" o "ciclo celular 2" o "P2" se entiende el segundo evento de ciclo celular observado en un embrión, el intervalo de tiempo entre la producción de las 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 dichas células hijas (la "célula hija principal", o célula hija A) por mitosis. P2 comprende también la duración de tiempo que el embrión es un embrión de 2 células, es decir la duración de la etapa de 2 células. El ciclo celular 2 puede medirse utilizando varios eventos morfológicos que incluyen el final de la citocinesis 1 y el comienzo de la citocinesis 2, o el final de la citocinesis 1 and el final de la citocinesis 2 o el comienzo de la citocinesis 1 y el comienzo de la citocinesis 2 o el comienzo de la citocinesis 1 y el final de la citocinesis 2 o el final de la mitosis 1 y el comienzo de la mitosis 2 o el final de la mitosis 1 y el final de la mitosis 2 o el comienzo de la mitosis 1 y el comienzo de la mitosis 1 o el comienzo de la mitosis 1 y el final de la mitosis 2. Después de la culminación del ciclo celular 2, el embrión consiste en 3 células. Dicho de otro modo, el ciclo celular 2 puede identificarse visualmente como el tiempo entre el embrión que contiene 2 células y el embrión que contiene 3 células.
- 35 Por un "tercer ciclo celular mitótico" o "ciclo celular 3" o "P3" se entiende el tercer evento de 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 y la producción de un segundo conjunto de células nietas a partir de la segunda célula hija (la "célula hija rezagada" o célula hija B) por mitosis. El ciclo celular 3 puede medirse utilizando varios eventos morfológicos que incluyen el final de la citocinesis 2 y el comienzo de la citocinesis 3, o el final de la citocinesis 2 y el final de la citocinesis 3 o el comienzo de la citocinesis 2 y el comienzo de la citocinesis 3 o el comienzo de la citocinesis 2 y el final de la citocinesis 3 o el final de la mitosis 3 y el comienzo de la mitosis 3 o el final de la mitosis 2 y el final de la mitosis 3 o el comienzo de la mitosis 2 y el comienzo de la mitosis 3 o el comienzo de la mitosis 2 y el final de la mitosis 3. Dicho de otro modo, el ciclo 3 puede identificarse visualmente como el tiempo entre el embrión que contiene 3 células y el embrión que contiene 4 células.
- 40 Por "primer evento de escisión" o "primera escisión", se entiende la primera división, es decir la división del oocito en dos células hijas, es decir el ciclo celular 1. Después de la culminación del primer evento de escisión, el embrión consiste en 2 células.
- 45 Por "segundo evento celular" o "segunda escisión", se entiende el segundo conjunto de divisiones, es decir la división de la célula hija principal en dos células nietas y la división de la célula hija perezosa en dos células nietas. Dicho de
- 50
- 55

otro modo, el segundo evento de escisión consiste en ambos, ciclo celular 2 y ciclo celular 3. Después de la culminación de la segunda escisión, el embrión consiste en 4 células.

Por "tercer evento de escisión", se entiende el tercer conjunto de divisiones, es decir las divisiones de la totalidad de las células nietas. Después la culminación del tercer evento de escisión, el embrión consiste típicamente en 8 células.

5 Por "citocinesis" o "división celular" se entiende aquella fase de la mitosis en la cual una célula sufre división celular. Dicho de otro modo, es la etapa de la mitosis en la cual el material nuclear fraccionado de una célula y su material citoplásmico se dividen para producir dos células hijas. El periodo de citocinesis es identificable como el periodo, o ventana, de tiempo entre el momento en que se observa por primera vez una constricción de la membrana celular (un "surco de escisión") y la resolución de dicho evento de constricción, es decir la generación de dos células hijas. La iniciación del surco de escisión puede identificarse visualmente 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). Esto se ilustra, por ejemplo, en la Fig. 4 del panel superior de la patente estadounidense n.º 7.963.906 por flechas blancas que apuntan a 2 surcos de escisión. El comienzo de la elongación celular puede utilizarse también para marcar el comienzo de la citocinesis, en cuyo caso el periodo de citocinesis se define como el período de tiempo entre el comienzo de la elongación celular y la resolución de la división celular.

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

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

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

25 La expresión "marcador fiduciario" o "marcador de confianza", es un objeto utilizado en el campo de visión de un sistema de obtención de imágenes que aparece en la imagen producida, para uso como punto de referencia o medida. La misma puede ser algo introducido en o sobre el objeto que constituye la imagen, o una marca o conjunto de marcas en el retículo de un instrumento óptico.

30 El término "micropocillo" se refiere a un recipiente que está dimensionado en una escala celular, preferiblemente para proporcionar acomodación de células eucariotas o de un oocito o embrión simple.

35 El término "elección" o "selección" se refiere a cualquier método conocido en la técnica para mover uno o más embriones, blastocistos u otra célula o células como se describen en esta memoria de un punto a otro. Esto puede incluir, pero no se limita a, mover uno o más embriones, blastocistos u otra célula o células dentro de un pocillo, placa u otro compartimiento o dispositivo a fin de separar los uno o más embriones, blastocistos u otra célula o células de la invención del o de los uno o más embriones de la invención deseleccionados (tal como por ejemplo, mover desde un área de un pocillo, placa, compartimiento o dispositivo a otra área de un pocillo, placa, compartimiento o dispositivo). Esto puede incluir también mover uno o más embriones, blastocistos u otra célula o células desde un pocillo, placa, compartimiento o dispositivo a otro pocillo, placa, compartimiento o dispositivo. Cualquier medio conocido en la técnica para separar o diferenciar el uno o más embriones, blastocistos u otra célula o células seleccionados del uno o más embriones, blastocistos u otra célula o células no seleccionados o deseleccionados puede emplearse con los métodos de la presente invención. En una realización, los embriones seleccionados se seleccionan para transferencia a un receptor para la gestación. En otra realización, los embriones seleccionados se seleccionan para congelación para la posible implantación futura. En otra realización, los embriones se seleccionan para cultivo continuado. En otra realización, se seleccionan embriones para evaluación ulterior por otros métodos tales como tests genéticos de preimplantación, genómica, proteómica y/o secretómica.

El término "deseleccionado" o "deselección" como se utiliza en esta memoria se refiere a embriones con potencial de desarrollo pobre que no se seleccionan para implantación o se seleccionan para no-implantación. En algunas realizaciones, los embriones deseleccionados no se transfieren o implantan en el útero.

50 Después de la fertilización, ambos gametos aportan un conjunto de cromosomas (contenido haploide), cada uno de los cuales está contenido en una estructura a la que se hace referencia en esta memoria como "pronúcleo". Después de la fertilización normal, cada embrión exhibe dos pronúcleos (PN), representando uno el material genético paterno y representando el otro el material genético materno. "Singamia" como se utiliza en esta memoria, se refiere a la ruptura o desaparición de los pronúcleos (PN) cuando los dos conjuntos de cromosomas se unen, lo que ocurre dentro de un par de horas antes de la primera citocinesis.

55 El parámetro de tiempo " P_{sin} " o "S" o " P_{M1} ", como se utiliza intercambiabilmente en esta memoria, se refiere a un parámetro definido por el tiempo transcurrido desde la singamia al comienzo de la primera citocinesis (es decir, la aparición del primer surco de escisión citocinética). Algunas veces no es posible visualizar PN o medir la singamia, en

cuyo caso se dice que tales embriones tienen "singamia inconmensurable" o "US" o "singamia imposible de medir" (utilizándose todos los términos intercambiamente). Adicionalmente, es posible que un embrión exhiba patrones de singamia o protocolos de tiempo atípicos. Se dice que tales embriones tienen "singamia atípica" o "singamia anormal" o "AS" (utilizándose los tres términos intercambiamente). Los embriones AS exhiben movimiento PN desordenado dentro del citoplasma sin dispersión rápida de las envolturas nucleares, y tienen típicamente un P_{sin} más corta, cuando se comparan con embriones de singamia normal o "NS". Esto puede visualizarse por microscopía a intervalos de tiempo preestablecidos cuando la PN cambia irregularmente dentro del citoplasma, sea en su conjunto o por separado antes de su desaparición. Los embriones AS exhiben también frecuentemente movimiento activo del oolema antes de la dispersión de las envolturas nucleares. Por otra parte, los embriones NS exhiben desaparición oportuna de PN con una dispersión uniforme de las envolturas nucleares acompañada de movimiento pronuclear mínimo o nulo dentro del citoplasma y movimiento mínimo o nulo del oolema antes de la dispersión de las envolturas nucleares.

El término "euploide" se utiliza en esta memoria para hacer referencia a una célula que contiene un múltiplo entero del número haploide, o monoploide. Por ejemplo, una célula autosómica humana que tiene 46 cromosomas es euploide, y un gameto humano que tiene 23 cromosomas es euploide. Por "embrión euploide" se entiende que las células del embrión sean euploides.

El término "aneuploide" se utiliza en esta memoria para hacer referencia a una célula que contiene un número anormal de cromosomas. Por ejemplo, una célula que tiene un cromosoma adicional y una célula que carece de un cromosoma son ambas aneuploides. Por "embrión aneuploide" se entiende que una o más células de un embrión son aneuploides.

El foco de patentes y solicitudes anteriores que incluyen las patentes estadounidenses n.º: 7.963.906; 8.323.177; 8.337.387 y la solicitud PCT n.º WO 2012/163363 se centra fundamentalmente en cada caso en criterios de selección para embriones humanos en la fertilización *in vitro*. Si bien estas patentes/solicitudes discuten cada una la determinación de si los embriones son satisfactorios o pobres, los parámetros de tiempos descritos en ellas se utilizan típicamente en la clínica en gran parte para seleccionar embriones con potencial de desarrollo satisfactorio. En contraste, los métodos de la presente invención se centran alrededor de tres parámetros nuevos, US, AS y P_{sin} , que pueden utilizarse para deseleccionar embriones humanos y orientarlos para la no-transferencia en tratamientos de fertilización *in vitro*. Alternativamente, los nuevos parámetros NS y P_{sin} pueden utilizarse para seleccionar embriones humanos para transferencia al útero. Estos parámetros pueden utilizarse solos o en combinación con los parámetros de selección descritos en las patentes estadounidenses n.º: 7.963.906; 8.323.177; 8.337.387 y en la solicitud PCT n.º WO 2012/163363. Por ejemplo, una vez que se determina que un embrión exhibe potencial de desarrollo satisfactorio por los métodos de las patentes estadounidenses n.º: 7.963.906; 8.323.177; 8.337.387 y la solicitud PCT n.º WO 2012/163363, dicho embrión puede analizarse ulteriormente en cuanto a los parámetros de singamia descritos en esta memoria a fin de aumentar adicionalmente la sensibilidad y especificidad de los métodos reivindicados.

Los criterios de desección de la presente invención incluyen: AS, un fenotipo de embrión atípico que implica comportamiento pronuclear que puede medirse durante el proceso fisiológico denominado singamia, considerándose que los embriones que exhiben este tipo de fenotipo tienen singamia anormal; singamia inconmensurable, un fenotipo de embrión atípico identificado por la no-visualización de los pronúcleos; y P_{sin} , un parámetro de tiempo definido por el tiempo desde la singamia a la primera citocinesis.

La presente invención implica dos fenotipos atípicos específicos, singamia anormal (AS) y singamia inconmensurable; así como un nuevo parámetro de tiempo, el tiempo desde la singamia a la primera citocinesis (P_{sin}). Los embriones AS tienen un tiempo medio más corto desde la singamia a la primera citocinesis (P_{sin}) cuando se comparan con embriones con singamia normal (NS) (Figuras 1 y 2). Los embriones AS exhiben también movimiento PN desordenado dentro del citoplasma, sin dispersión rápida de las envolturas nucleares. (Figuras 1 y 2). Por tanto, AS puede medirse también por evaluación del movimiento de los pronúcleos y/o la actividad de los pronúcleos a lo largo del citoplasma. Por otra parte, la singamia normal se caracteriza por una desaparición oportuna de los pronúcleos con dispersión uniforme de las envolturas nucleares. Adicionalmente, en cuanto al uso de AS y singamia inconmensurable como criterios de desección, puede utilizarse NS independientemente como criterio de selección positiva. Además, los embriones que exhiben AS y singamia inconmensurable tienen menos probabilidad de exhibir morfología satisfactoria en la etapa de escisión (día 3), menos probabilidad de llegar a convertirse en blastocistos de buena calidad y menos probabilidad de implantarse en el útero, teniendo también menor probabilidad de ser euploides.

Adicionalmente, un P_{sin} más larga indica que las células hijas tienen mayor probabilidad de ser euploides. En contraste, un P_{sin} más corta indica que las células hijas tienen mayor probabilidad de ser aneuploides. Dado que los embriones con AS y singamia inconmensurable tienen menor potencial de desarrollo, es beneficioso utilizar AS y la singamia inconmensurable para deseleccionar antes de la transferencia de embriones o congelación. Es importante que cualquiera de estos tres parámetros, AS, singamia inconmensurable y P_{sin} puede utilizarse solo o en combinación con cada uno de otro u otros parámetros celulares que incluyen los parámetros incluidos en la Tabla 1.

ES 2 755 878 T3

Tabla 1: Lista de Parámetros

Parámetro	Descripción / Referencia que describe el Parámetro
P1	Duración de la 1ª citocinesis
P2	Intervalo entre las citocinesis 1ª y 2ª (tiempo desde el embrión de 2 células al embrión de 3 células (final de la 1ª citocinesis a final de la 2ª citocinesis) duración como embrión de 2 células) (t3-t2)
P3	Intervalo entre la 2ª y la 3ª citocinesis (tiempo desde el embrión de 3 células al embrión de 4 células) (final de la 2ª citocinesis a final de la 3ª citocinesis) (duración como embrión de 3 células) (t4-t3). (Sincronía entre 3 y 4 células)
P _{sin} o S o P _{M1}	Tiempo desde la singamia a la 1ª citocinesis
2ce-3C	Final de la 1ª escisión a comienzo de la segunda escisión
3C-4C	Comienzo de la 2ª escisión a final de la 3ª escisión
t5	Tiempo desde ICSI (fertilización) a embrión de 5 células
2Cb	Tiempo desde la fertilización a comienzo de la 1ª escisión
2Ce	Tiempo desde la fertilización hasta final de la 1ª escisión
3C	Tiempo desde la fertilización a comienzo de la 2ª escisión
4C	Tiempo desde la fertilización a final de la 3ª escisión
5C	Tiempo desde la fertilización a comienzo de la 4ª escisión
BL	Formación de blastocele
tM	Tiempo desde la fertilización a la mórula
S3	Tiempo desde el embrión de 5 células al embrión de 8 células
t2	Tiempo desde la fertilización al embrión de 2 células
t3	Tiempo desde la fertilización al embrión de 3 células
t4	Tiempo desde la fertilización al embrión de 4 células
cc3	T5-t3: Tercer ciclo celular, duración del periodo como embrión de 3 y 4 células
t5-t2	Tiempo hasta el embrión de 5 células menos tiempo hasta el embrión de 2 células
cc3/cc2	Ratio de duración del ciclo celular 3 a duración del ciclo celular 2
Tiempo hasta la primera escisión	Duración del primer ciclo celular
Extrusión 2PB	Tiempo desde la fertilización hasta la extrusión del segundo cuerpo polar
Desvanecimiento de los PN	Tiempo desde la fertilización hasta la desaparición de los pronúcleos, O tiempo entre la aparición de los pronúcleos y la desaparición de los pronúcleos
tSB	Tiempo desde la fertilización al comienzo de la blastulación
tSC	Tiempo desde la fertilización al comienzo de la compactación
Aparición de los PN	Tiempo desde la fertilización hasta que aparecen los pronúcleos
t6	Tiempo desde la fertilización al embrión de 6 células
t7	Tiempo desde la fertilización al embrión de 7 células
t8	Tiempo desde la fertilización al embrión de 8 células
cc2b	t4-t2; Segundo ciclo celular para ambos blastómeros, duración del periodo como embrión blastómero de 2 y 3 células
cc2_3	t5-t2; Segundo y tercer ciclo celular, duración del periodo como embrión de 2, 3, y 4 blastómeros
cc4	t9-t5; Cuarto ciclo celular; duración del periodo como embrión de 5, 6, 7 y 8 blastómeros
s3a	t6-t5; Duración de las divisiones celulares individuales implicadas en el desarrollo desde el embrión de 4 blastómeros al embrión de 8 blastómeros
s3b	t7-t6; Duración de las divisiones celulares individuales implicadas en el desarrollo desde el embrión de 4 blastómeros al embrión de 8 blastómeros
s3c	t8-t7; Duración de las divisiones celulares individuales implicadas en el desarrollo desde el embrión de 4 blastómeros al embrión de 8 blastómeros
cc2/cc3	WO 2012/163363

cc2/cc2_3	WO 2012/163363
cc3/t5	WO 2012/163363
s2/cc2	WO 2012/163363
s3/cc3	WO 2012/163363
AC1	Escisión directa desde el embrión de 1 célula al embrión de 3 o más células
AC2	Escisión de una célula hija en más de 2 blastómeros
AS	Singamia anormal Movimiento desordenado de PN dentro del citoplasma, sin dispersión precoz de las envolturas nucleares, periodo de tiempo corto entre la singamia y el comienzo de la primera citocinesis (P_{sin}), y/o movimiento activo del oolema antes de la dispersión de las envolturas nucleares. Puede medirse por evaluación del movimiento de los pronúcleos y/o actividad de los pronúcleos a lo largo del citoplasma.
MN2	Multinucleación observada en la etapa de 2 blastómeros
MN4	Multinucleación observada en la etapa de 4 blastómeros
EV2	Uniformidad de los blastómeros en el embrión de 2 blastómeros
Mul	Multinucleación
Irregular o UBS	Tamaños irregulares de los blastómeros en 2-4 células
Frg	Fragmentación
Nec	Necrosis de los blastómeros
Vac	Vacuolización

5 Informes anteriores han investigado el tiempo desde la inseminación a la desaparición de los pronúcleos, conocido también como rotura de los pronúcleos (PNB) o desvanecimiento pronuclear (PNF), (Basile, *et al.* (2013) "Type of Culture Media Does Not Affect Embryo Kinetics: A Time-Lapse Analysis of Sibling Oocytes," *Human Reprod.*, 28(3):634-41; Azzarello, *et al.* (2012) "The Impact of Pronuclei Morphology and Dynamicity on Live Birth Outcome After Time-Lapse Culture," *Human Reprod.*, 27(9):2649-57; Lemmen, *et al.* (2008) "Kinetic Markers of Human Embryo Quality Using Time-Lapse Recordings of IVF/ICSI-Fertilize Oocytes," *Reprod. Biomed. Online*, 17(3):385-91). En contraste, algunos métodos de la presente invención, están relacionados con los tiempos desde la desaparición de PN hasta la primera citocinesis, P_{sin} . Al contrario de los parámetros descritos anteriormente, P_{sin} es una medida más fiable, dado que no está basada en el momento de la inseminación. El momento de la inseminación puede ser impreciso, especialmente para los huevos inseminados en las técnicas clásicas de fertilización *in vitro*.

10 Por tanto, los métodos de la presente invención proporcionan nuevos parámetros celulares de selección o desección para embriones humanos que pueden medirse por microscopía a intervalos de tiempo.

15 En los métodos de la invención, se evalúan uno o más embriones en cuanto a su probabilidad de alcanzar la etapa de blastocisto y/o convertirse en un blastocisto de buena calidad y/o implantarse en el útero y/o ser euploides por medida de uno o más parámetros celulares del embrión o embriones y empleo de estas medidas para determinar la probabilidad de que el embrión o embriones alcancen la etapa de blastocisto o se implanten en el útero o sean euploides. Tales parámetros han sido descritos, por ejemplo, en las patentes estadounidenses n.ºs 7.963.906; 8.323.177, y 8.337.387.

20 La información así obtenida puede utilizarse para guiar decisiones clínicas, p.ej. si transferir o no un embrión fertilizado *in vitro*, si trasplantar o no una célula o células cultivadas, si congelar o no un embrión para implantación posterior, si continuar o no cultivando el embrión, o si evaluar o no el embrión por otros métodos tales como tests genéticos de preimplantación, genómica, proteómica, y/o secretómica.

25 Ejemplos de embriones que pueden evaluarse por los métodos de la invención incluyen embriones de 1 célula (a los que se hace referencia también 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 y con inclusión de embriones de 16 células, mórulas, y blastocistos, cualquiera de los cuales puede obtenerse de cualquier manera conveniente, p.ej. a partir de un oocito que ha madurado *in vivo* o a partir de un oocito que ha madurado *in vitro*.

30 Los embriones pueden derivarse de cualquier organismo, p.ej. cualquier especie de mamífero, p.ej. humano, primate, equino, bovino, porcino, canino, felino, etc. Preferiblemente, los mismos se derivan de un humano. Los embriones pueden congelarse previamente, p.ej. embriones criopreservados en la etapa de 1 célula, y descongelarse después. Alternativamente, aquéllos pueden ser preparados recientemente, p.ej., embriones que han sido preparados recientemente (sin ser congelados antes del cultivo) a partir de oocitos por técnicas de fertilización *in vitro* (oocitos frescos o congelados previamente); oocitos que han sido recogidos recientemente y/o madurados recientemente por técnicas de maduración *in vitro* (con inclusión, p.ej., de oocitos que se recogen a partir de tejido ovárico *in vitro*). Los

embriones pueden cultivarse en cualesquiera condiciones convenientes (con inclusión de diferentes tipos de medio de cultivo) conocidas en la técnica para promover la supervivencia, el crecimiento, y/o el desarrollo de la muestra a evaluar, p.ej. para embriones, en condiciones tales como las utilizadas en la técnica de fertilización *in vitro*; véase, p.ej., la patente estadounidense n.º 6.610.543, patente estadounidense n.º 6.130.086, patente estadounidense n.º 5.837.543, para oocitos, en condiciones tales como las utilizadas en la técnica para promover la maduración de oocitos; véase, p.ej., patente estadounidense n.º 5.882.928 y patente estadounidense n.º 6.281.013 para células madre en condiciones tales como las utilizadas en la técnica para promover mantenimiento, diferenciación y proliferación, véase, p.ej., patente estadounidense n.º 6.777.233, patente estadounidense n.º 7.037.892, patente estadounidense n.º 7.029.913, patente estadounidense n.º 5.843.780, y patente estadounidense n.º 6.200.806, solicitud estadounidense n.º 2009/0047263; solicitud estadounidense n.º 2009/0068742.

A menudo, los embriones se cultivan en un medio disponible comercialmente tal como KnockOut DMEM, DMEM-F12, o medio de Dulbecco Modificado por Iscoves que ha sido suplementado con suero o sustituto de suero, aminoácidos, factores de crecimiento y hormonas adaptadas a las necesidades del embrión particular que se esté evaluando.

En algunas realizaciones, los embriones se evalúan por medida de parámetros celulares por imágenes a intervalos de tiempo preestablecidos. Los embriones pueden cultivarse en placas de cultivo estándar. Alternativamente, los embriones pueden cultivarse en placas de cultivo personalizadas, placas de cultivo personalizadas con micropocillos de calidad óptica como se describen en esta memoria. En tales placas de cultivo personalizadas, cada micropocillo contiene un solo huevo o embrión fertilizado, y la superficie del fondo de cada micropocillo tiene un acabado de calidad óptica de tal modo que pueden obtenerse simultáneamente imágenes del grupo entero de embriones dentro de una sola placa por un solo microscopio miniatura con resolución suficiente para seguir los procesos de mitosis celular. El grupo entero de micropocillos comparte la misma gota de medio en la placa de cultivo, y puede incluir también una pared exterior posicionada alrededor de los micropocillos para estabilizar la gota de medio, así como marcadores de confianza dispuestos cerca de los micropocillos. Las gotas de medio pueden tener volúmenes diferentes. La hidrofobicidad de la superficie puede ajustarse con grabado de plasma u otro tratamiento para prevenir la formación de burbujas en los micropocillos cuando se llenan con medio. Con indiferencia de si se utiliza una placa de cultivo estándar o una placa de cultivo personalizada, durante el cultivo, pueden cultivarse uno o más embriones en desarrollo en el mismo medio de cultivo, p.ej. pueden cultivarse entre 1 y 30 embriones por placa.

Se adquieren imágenes a lo largo el tiempo, y se analizan luego para llegar a medidas de los uno o más parámetros celulares. La obtención de imágenes a intervalos de tiempo preestablecidos puede realizarse cualquier microscopio controlado por computadora que esté equipado para almacenamiento y análisis de imágenes digitales, por ejemplo, microscopios invertidos equipados con platinas calentadas y cámaras de incubación, o redes de microscopios miniatura de construcción personalizada que están dispuestos en el interior de una incubadora convencional. El sistema de microscopios miniatura permite el cultivo simultáneo de placas múltiples de muestras en la misma incubadora, y es escalable para acomodar canales múltiples sin limitación alguna en cuanto al intervalo de tiempo mínimo entre la captura de imágenes sucesivas. La utilización de microscopios múltiples elimina la necesidad de mover la muestra, lo cual mejora la exactitud del sistema y la fiabilidad global del mismo. Los microscopios individuales en la incubadora pueden estar parcial o totalmente aislados, proporcionando a cada placa de cultivo su propio ambiente controlado. Esto hace posible la transferencia de las placas a y desde las estaciones de obtención de imágenes sin perturbar el ambiente de las otras muestras.

El sistema de imágenes para la obtención de imágenes a intervalos de tiempo preestablecidos puede emplear iluminación de campo brillante, iluminación de campo oscuro, contraste de fases, contraste de modulación Hoffman, contraste de interferencia diferencial, luz polarizada, fluorescencia o sus combinaciones. En algunas realizaciones, puede utilizarse iluminación de campo oscuro para proporcionar contraste de imágenes mejorado para extracción de características y análisis de las imágenes subsiguiente. Adicionalmente, pueden utilizarse fuentes de luz roja o infrarroja cercana para reducir la fototoxicidad y mejorar la ratio de contraste entre las membranas celulares y la porción interior de las células.

Las imágenes que se adquieren pueden almacenarse sobre una base continua, como en video en vivo, o sobre una base intermitente, como en fotografía a intervalos de tiempo preestablecidos, donde se obtiene repetidas veces la imagen de un individuo en una foto fija. Preferiblemente, el intervalo de tiempo entre imágenes debería ser entre 1 y 30 minutos, o entre 1 y 20 minutos o entre 1 y 15 minutos, o entre 1 y 10 minutos o entre 1 y 5 minutos a fin de capturar eventos morfológicos significativos como se describe más adelante. En una realización alternativa, el intervalo de tiempo entre imágenes podría modificarse dependiendo del grado de actividad celular. Por ejemplo, durante periodos activos podrían tomarse imágenes tan frecuentemente como cada pocos segundos o cada minuto, mientras que durante periodos inactivos las imágenes podrían tomarse cada 10 ó 15 minutos o a intervalos más largos. Podría utilizarse análisis de imágenes en tiempo real sobre las imágenes capturadas a fin de detectar cuándo y cómo modificar los intervalos de tiempo. En los métodos de los autores de esta invención, se estima que la cantidad total de luz recibida por las muestras es equivalente a aproximadamente 52 segundos de exposición continua a luz de nivel bajo durante 5 días de obtención de las imágenes. La intensidad de luz para sistemas de obtención de imágenes a intervalos de tiempo preestablecidos es significativamente menor que la intensidad de luz utilizada típicamente en un microscopio de reproducción asistida debido a la baja potencia de los LED (por ejemplo, utilizando un LED de 1W comparado con una lámpara halógena típica de 100W) y la alta sensibilidad del sensor de la cámara. Así, la cantidad total de energía luminica recibida por un embrión utilizando el sistema de imágenes a intervalos de tiempo

preestablecidos es comparable a o menor que la cantidad de energía recibida durante la manipulación rutinaria en una clínica de IVF. Además, el tiempo de exposición puede acortarse significativamente para reducir la cantidad total de exposición a la luz del embrión. Durante 2 días de obtención de imágenes, con imágenes capturadas cada 5 minutos a 0,5 segundos de exposición a la luz por imagen, la cantidad total de exposición a luz de nivel bajo es menor que 21 segundos.

Después de la adquisición de las imágenes, las imágenes se extraen y se analizan respecto a diferentes parámetros celulares, por ejemplo, tamaño del cigoto, grosor de tamaño de los blastómeros de la zona pelúcida, grado de fragmentación, simetría de las células hijas resultantes de una división celular, intervalos de tiempo preestablecidos entre el pequeño número de mitosis iniciales, duración de la citocinesis y momentos y calidad de la singamia.

Los parámetros celulares que pueden medirse por obtención de imágenes a intervalos de tiempo preestablecidos son por lo general eventos morfológicos. Por ejemplo, en la evaluación de embriones, puede utilizarse la obtención de imágenes a intervalos de tiempo preestablecidos para visualizar la singamia, particularmente los momentos de singamia que incluyen el tiempo entre singamia y aparición o resolución de la citocinesis 1, citocinesis 2, citocinesis 3, citocinesis 4, o citocinesis 5 o el tiempo entre la singamia y la aparición o resolución de la mitosis 1, mitosis 2, mitosis 3, mitosis 4, o mitosis 5. Adicionalmente, la obtención de imágenes a intervalos de tiempo preestablecidos puede utilizarse para medir la duración de un evento de citocinesis, p.ej. citocinesis 1, citocinesis 2, citocinesis 3, citocinesis 4, citocinesis 5 o combinaciones y/o ratios de estos eventos donde la duración de un evento de citocinesis se define como el intervalo de tiempo entre la primera observación de un surco de escisión (la iniciación de una citocinesis) y la resolución del surco de escisión en dos células hijas (es decir la producción de dos células hijas). Otro parámetro de interés es la duración de un evento de ciclo celular, p.ej. ciclo celular 1, ciclo celular 2, ciclo celular 3, ciclo celular 4, ciclo celular 5 o combinaciones y/o ratios de estos eventos donde la duración de un evento de ciclo celular se define como el intervalo de tiempo entre la producción de una célula (para el ciclo celular 1, la fertilización de un huevo; para los ciclos celulares posteriores, la resolución de la citocinesis) y la producción de dos células hijas de dicha célula. Otros parámetros celulares de interés que pueden medirse por obtención de imágenes a intervalos de tiempo preestablecidos incluyen los intervalos de tiempo preestablecidos que se definen por estos eventos celulares, p.ej. (a) el intervalo de tiempo entre citocinesis 1 y citocinesis 2, que puede definirse como uno cualquiera de los intervalos de tiempo 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, que puede definirse como uno cualquiera de los intervalos de tiempo 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 resolución de la citocinesis 2 y la iniciación de la citocinesis 3; (c) el intervalo de tiempo entre la mitosis 1 y la mitosis 2, que puede definirse como uno cualquiera de los intervalos de tiempo entre la iniciación de la mitosis 1 y la iniciación de la mitosis 2, el intervalo entre la resolución de la mitosis 1 y la resolución de la mitosis 2, el intervalo entre la iniciación de la mitosis 1 y la resolución de la mitosis 2; o el intervalo entre la resolución de la mitosis 1 y la iniciación de la mitosis 2; o (b) el intervalo entre la mitosis 2 y la mitosis 3, que puede definirse como uno cualquiera de los intervalos de tiempo entre la iniciación de la mitosis 2 y la iniciación de la mitosis 3, o el intervalo entre la resolución de la mitosis 2 y la resolución de la mitosis 3, o el intervalo entre la iniciación de la mitosis 2 y la resolución de la mitosis 3, o el intervalo entre resolución de la mitosis 2 y la iniciación de la mitosis 3.

Para los propósitos de la fertilización *in vitro*, se considera ventajoso que el embrión se transfiera al útero al principio del desarrollo, p.ej. el día 2 o el día 3, es decir hasta la etapa de 8 células, a fin de reducir la pérdida de embriones debido a las desventajas de las condiciones de cultivo con relación al ambiente *in vitro*, y a fin de reducir los posibles resultados adversos asociados con errores epigenéticos que pueden ocurrir durante el cultivo (Katari *et al.* (2009) *Hum Mol Genet.* 18(20):3769-78; Sepúlveda *et al.* (2009) *Fertil Steril.* 91(5):1765-70). Conforme a ello, es preferible que la medida de los parámetros celulares tenga lugar dentro de los 2 días de la fertilización, aunque los presentes métodos contemplan también 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.

Los parámetros pueden medirse manualmente, o se pueden medir automáticamente, p.ej. por medio de software de análisis de imágenes. Cuando se emplea software de análisis de imágenes, pueden utilizarse algoritmos de análisis de imágenes que emplean una técnica de estimación de modelos probabilísticos basada en el método secuencial Monte Carlo, p.ej. generando distribuciones de modelos de embrión hipotéticos, que simulan imágenes basadas en un modelo óptico simple, y comparando estas simulaciones con los datos de imagen observados. Cuando se emplean tales estimaciones de modelos probabilísticos, las células pueden modelizarse como cualquier forma apropiada, p.ej. como colecciones de elipses en espacio 2D, colecciones de elipsoides en espacio 3D, y análogas. Para tratar con oclusiones y ambigüedades de profundidad, el método puede imponer limitaciones geométricas que corresponden al comportamiento físico esperado. Para mejorar la robustez, las imágenes pueden capturarse en uno o más planos focales.

Una vez que se han obtenido las medidas de los parámetros celulares, se emplean dichas medidas para determinar la probabilidad de que el embrión se desarrolle en un blastocisto y/o llegue a ser un blastocisto de buena calidad y/o se implante en el útero y/o sea euploide o aneuploide.

En algunas realizaciones, la medida de los parámetros celulares se utiliza directamente para determinar la probabilidad de que un embrión alcance la etapa de blastocisto o llegue a convertirse en un embrión de buena calidad y/o nazca vivo y/o sea aneuploide. Dicho de otro modo, el valor absoluto de la medida propiamente dicha es suficiente para determinar la probabilidad de que un embrión alcance la etapa de blastocisto y/o se implante en el útero y/o nazca vivo y/o sea euploide. Ejemplos de esto en realizaciones que utilizan obtención de imágenes a intervalos de tiempo preestablecidos para medir parámetros celulares incluyen, sin limitación, los siguientes que, en combinación, son indicativos de la probabilidad de que un embrión alcance la etapa de blastocisto y/o se implante en el útero y/o nazca vivo y/o sea euploide: (a) una duración de citocinesis que es al menos 0 a aproximadamente 33 horas; (b) un intervalo de tiempo entre la resolución de la citocinesis 1 y el comienzo de la citocinesis 2 que es 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 (c) un intervalo de tiempo, es decir sincronía, entre la iniciación de la citocinesis 2 y la iniciación de la citocinesis 3 que es 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 alcance la etapa de blastocisto y/o sucesivamente se implante con éxito en el útero y/o nazca vivo y/o sea euploide puede incluir adicionalmente la medición de parámetros celulares, que incluyen, pero no se limitan a: un ciclo celular 1 que dura aproximadamente 20-27 horas, p.ej. aproximadamente 25-27 horas, un tiempo desde la fertilización a la etapa de 5 células que es aproximadamente 47 horas a aproximadamente 57 horas, y una duración de P_{sin} que es mayor que aproximadamente 1 hora, por ejemplo, mayor que aproximadamente 90 minutos, o mayor que aproximadamente 2 horas, o mayor que aproximadamente 2,3 horas, o mayor que aproximadamente 2,4 horas o mayor que aproximadamente 2,5 horas.

Ejemplos de medidas directas, cualquiera de las cuales por sí sola o en combinación es indicativa de la probabilidad de que un embrión no alcance la etapa de blastocisto y/o se implante en el útero, y/o sea aneuploide incluyen, sin limitación: (a) una duración de la citocinesis 1 que es mayor que aproximadamente 33 minutos, p.ej. mayor que aproximadamente 35, 40, 45, 50, o 60 minutos; (b) un intervalo de tiempo entre la resolución de la citocinesis 1 y el comienzo de la citocinesis 2 que dura más de 15 horas, p.ej. aproximadamente 16, 17, 18, 19, o 20 o más horas, o menos de 8 horas, p.ej. aproximadamente 7, 5, 4, o 3 o menos horas; o (c) un intervalo de tiempo entre el comienzo de la citocinesis 2 y el comienzo de la citocinesis 3, que es 6, 7, 8, 9, o 10 o más horas. En algunas realizaciones, la determinación de la probabilidad de que el embrión no alcance la etapa de blastocisto y/o se implante en el útero y/o sea aneuploide puede incluir adicionalmente la medición de parámetros celulares, que incluyen pero no se limitan a: un ciclo celular 1 que dura más de aproximadamente 27 horas, p.ej. 28, 29, o 30 o más horas, un intervalo de tiempo entre la fertilización y la etapa de 5 células que es menor que aproximadamente 47 horas o mayor que aproximadamente 57 horas o una duración de P_{sin} que es menor que aproximadamente 1 hora. Por ejemplo, menos de 50 minutos, o menos de aproximadamente 45 minutos, o menos de aproximadamente 40 minutos, o menos de aproximadamente 35 minutos, o menos de aproximadamente 30 minutos, o menos de aproximadamente 25 minutos, o menos de aproximadamente 20 minutos, o menos de aproximadamente 15 minutos, o menos de aproximadamente 10 minutos, o menos de aproximadamente 5 minutos.

En una realización preferida, los métodos proporcionan la determinación directa del fenotipo de singamia de un embrión (a saber, AS, NS, singamia inconmensurable) que sola o en combinación con los parámetros celulares identificados anteriormente es indicativa de la probabilidad de que un embrión no alcance la etapa de blastocisto, y/o llegue a ser un blastocisto de buena calidad y/o se implante en el útero y/o sea aneuploide. Por ejemplo, los embriones determinados como AS, por ejemplo, aquéllos que exhiben movimiento desordenado de PN en el citoplasma sin dispersión rápida de las envolturas nucleares, movimiento activo del oolema antes de la dispersión de las envolturas nucleares y/o un periodo de tiempo desde la singamia a la citocinesis 1 que es más corto que aproximadamente 120 minutos o 90 minutos, o más corto que aproximadamente 1 hora o más corto que aproximadamente 45 minutos o más corto que aproximadamente 30 minutos tienen menos probabilidad de alcanzar la etapa de blastocisto o implantarse en el útero. Análogamente, los embriones que exhiben singamia anormal (AS) o singamia inconmensurable tienen también menos probabilidad de alcanzar la etapa de blastocisto, y/o llegar a ser blastocistos de buena calidad y/o implantarse en el útero y/o es más probable que sean aneuploides.

Los embriones que son aneuploides tienen también menos probabilidad de alcanzar la etapa de blastocisto, y/o llegar a ser blastocistos de buena calidad, y/o implantarse en el útero, y/o dar como resultado un parto vivo. En una realización, los métodos proporcionan la medida directa del periodo de tiempo desde la singamia a la citocinesis 1 (P_{sin}) que aislada o en combinación con los parámetros celulares y/o fenotipos de singamia identificados anteriormente es indicativa de la probabilidad de que un embrión no sea euploide. Por ejemplo, los embriones que tienen un P_{sin} que es más corta que aproximadamente 2,4 horas, o más corta que aproximadamente 2,3 horas, o más corta que aproximadamente 2,2 horas, o más corta que aproximadamente 2,1 horas, o más corta que aproximadamente 2 horas, o más corta que aproximadamente 1,8 horas, o más corta que aproximadamente 1,6 horas, tienen menos probabilidad de ser euploides y más probabilidad de ser aneuploides. Por contrario, los embriones que tienen un P_{sin} que es 2,4 horas o más larga, más larga que aproximadamente 2,5 horas, o más larga que aproximadamente 3 horas, tienen menos probabilidad de ser aneuploides y más probabilidad de ser euploides.

En algunas realizaciones, la medida del parámetro celular se emplea por comparación del mismo con una medida de parámetros celulares de un embrión de referencia, o control, y utilización del resultado de esta comparación para proporcionar una determinación de la probabilidad de que el embrión alcance o no alcance la etapa de blastocisto, y/o

- llegue a ser un blastocisto de buena calidad y/o se implante en el útero y/o sea euploide o aneuploide. Los términos "referencia" y "control", como se utilizan en esta memoria, significan un embrión o célula estandarizado a utilizar para la interpretación de las medidas de parámetros celulares de un embrión dado y asignar una determinación de la probabilidad de que el embrión alcance o no alcance la etapa de blastocisto, y/o llegue a ser un blastocisto de buena calidad y/o se implante en el útero y/o sea euploide o aneuploide. La referencia o control puede ser un embrión que se sabe tiene un fenotipo deseado, p.ej., que es probable que alcance la etapa de blastocisto, y/o llegue a ser un blastocisto de buena calidad y/o se implante en el útero y/o sea euploide, y por tanto puede ser un embrión de referencia o control positivo. Alternativamente, el embrión de referencia/control puede ser un embrión que se sabe no tiene el fenotipo deseado, y por tanto puede ser un embrión de referencia/control negativo.
- En ciertas realizaciones, los parámetros celulares se emplean principalmente para determinar si un embrión alcanzará probablemente la etapa de blastocisto, y/o llegará a ser un blastocisto de buena calidad y/o se implantará en un útero y/o será euploide. En tales realizaciones, se seleccionan embriones que caen dentro de uno o más de los marcos de tiempo de los parámetros celulares de referencia anteriores (p.ej. un tiempo entre la citocinesis 1 y la citocinesis 2 de aproximadamente 7,8 a aproximadamente 14,3 horas y/o un tiempo entre la citocinesis 2 y la citocinesis 3 de aproximadamente 0 a aproximadamente 5,8 horas) que tienen buen potencial de desarrollo y/o son euploides. Estos embriones se analizan luego para determinar si los mismos tienen una singamia normal o una singamia anormal. Los embriones seleccionados previamente por tener buen potencial de desarrollo satisfactorio y/o ser euploides se deseleccionan cuando se determina que tienen AS o US, seleccionando por tanto para implantación o congelación para implantación potencial futura, únicamente aquellos embriones que caen dentro de los criterios de selección y fuera de los criterios de desección. Análogamente, aquellos embriones que se determina tienen buen potencial de desarrollo y/o son euploides se deseleccionan como probablemente aneuploides cuando se mide que P_{sin} es menor que aproximadamente 2,4 horas, o menor que aproximadamente 2,3 horas o menor que aproximadamente 2 horas o menor que aproximadamente 1,5 horas o menor que aproximadamente una hora.
- En ciertas realizaciones, la o las medidas de parámetros celulares obtenidas se comparan con una o más medidas de parámetros celulares comparables de un embrión individual de referencia/control para obtener información concerniente al fenotipo del embrión/célula que se ensaya. En otras realizaciones adicionales, la o las medidas de parámetros celulares obtenidas se compara(n) con la o las medidas de parámetros celulares comparables de dos o más embriones de referencia/control diferentes para obtener información en mayor profundidad con respecto al fenotipo del embrión/célula ensayado. Por ejemplo, las medidas de parámetros celulares obtenidas del embrión o embriones que se evalúan pueden compararse a la vez con un embrión positivo y un embrión negativo para obtener información confirmada con respecto a sí el embrión/célula tiene el fenotipo de interés.
- Como ejemplo, la resolución de la citocinesis 1 y el comienzo de la citocinesis 2 en embriones humanos normales es aproximadamente 8-15 horas, con más frecuencia aproximadamente 9-13 horas, con un valor medio de aproximadamente $11 \pm 2,1$ horas; es decir 6, 7, 8 horas, más generalmente aproximadamente 9, 10, 11, 12, 13, 14 o hasta aproximadamente 15 horas. Un ciclo celular 2 más largo o más corto en el embrión que se evalúa comparado con el observado para un embrión de referencia normal es indicativo de la probabilidad de que el embrión no alcance la etapa de blastocisto y/o se implante en el útero y/o será más probablemente aneuploide. Como un segundo ejemplo, el intervalo de tiempo entre la iniciación de la citocinesis 2 y la iniciación de la citocinesis 3, es decir la sincronía de las mitosis segunda y tercera, en embriones humanos normales es por lo general aproximadamente 0-5 horas, más usualmente aproximadamente 0, 1, 2 ó 3 horas, con un tiempo medio de aproximadamente $1 \pm 1,6$ horas; un intervalo más largo entre la culminación de la citocinesis 2 y la citocinesis 3 en el embrión que se evalúa comparado con el observado en un embrión de referencia normal es indicativo de la probabilidad de que el embrión no alcanzará la etapa de blastocisto y/o se implantará en el útero y/o tendrá más probabilidad de ser aneuploide. Como un tercer ejemplo, el ciclo celular 1 en un embrión normal, es decir desde el momento de la fertilización hasta la culminación de la citocinesis 1, se completa típicamente en aproximadamente 20-27 horas, más usualmente en aproximadamente 25-27 horas, es decir aproximadamente 15, 16, 17, 18, o 19 horas, más usualmente aproximadamente 20, 21, 22, 23, o 24 horas, y más usualmente aproximadamente 25, 26 o 27 horas. Un ciclo celular 1 que es más largo en el embrión que se evalúa comparado con el observado para un embrión de referencia normal es indicativo de la probabilidad de que el embrión no alcanzará la etapa de blastocisto y/o se implantará en el útero y/o será más probablemente aneuploide. Como un cuarto ejemplo, los embriones que exhiben NS con inclusión de aquéllos que, por ejemplo, exhiben movimiento pronuclear mínimo dentro del citoplasma y/o movimiento mínimo del oolema con anterioridad a la dispersión de las envolturas PN y/o comienzan una primera citocinesis 1 aproximadamente 2,5-4 horas (p.ej. 2,5, 3, o 4 horas) después de la singamia tienen mayor probabilidad de alcanzar la etapa de blastocisto, mientras que los embriones que exhiben AS, con inclusión de aquéllos que, por ejemplo, exhiben movimiento PN desordenado sin dispersión rápida de las envolturas nucleares y/o exhiben movimiento activo del oolema con anterioridad a la dispersión de las envolturas PN, con inclusión de aquéllos que comienzan una primera citocinesis aproximadamente 1 hora o menos después de la singamia tienen menor probabilidad de alcanzar la etapa de blastocisto y/o desarrollarse en blastocistos de buena calidad y/o tienen mayor probabilidad de ser aneuploides. Ejemplos pueden deducirse de datos empíricos, p.ej. por observación de uno o más embriones de referencia junto con el embrión a evaluar. Puede emplearse cualquier embrión de referencia, p.ej. una referencia normal que es probable que alcance la etapa de blastocisto, y/o se desarrolle en un blastocisto de buena calidad y/o se implante en el útero y/o sea euploide, o una muestra de referencia atípica que no es probable que alcance la etapa de blastocisto y/o será más probablemente

aneuploide. En algunos casos, puede emplearse más de una muestra de referencia, p.ej. puede utilizarse a la vez una muestra de referencia normal y una muestra de referencia atípica.

5 Como se ha expuesto anteriormente, pueden medirse uno o más parámetros y emplearse para determinar la probabilidad de alcanzar la etapa de blastocisto para un embrión. En algunas realizaciones, una medida de dos o más parámetros puede ser suficiente para llegar a una determinación de la probabilidad de alcanzar la etapa de blastocisto y/o llegar a convertirse en un blastocisto de buena calidad y/o implantarse en el útero y/o ser euploide. En algunas realizaciones, puede ser deseable emplear medidas de más de dos parámetros, por ejemplo, 3 parámetros celulares o 4 o más parámetros celulares. En algunas realizaciones, puede ser deseable medir uno o más parámetros para seleccionar un embrión con buen potencial de desarrollo y uno o más parámetros para deseleccionar embriones con potencial de desarrollo pobre. En ciertas realizaciones, se mide 1 parámetro de selección y 1 parámetro de desección. En otra realización, se mide 1 parámetro de selección y 2 parámetros de desección. En otra realización, se miden 1 parámetro de selección y 3 parámetros de desección. En otra realización, se miden 2 parámetros de selección y 1 parámetro de desección. En otra realización se miden más de 3 parámetros de selección y 1 parámetro de desección. En otra variación, se miden 2 parámetros de selección y 2 parámetros de desección. En otra realización, se miden 2 parámetros de selección y 3 parámetros de desección. En otra realización, se miden 3 parámetros de selección y 2 parámetros de desección. En otra realización, se miden más de 3 parámetros de selección y 3 parámetros de desección.

20 En ciertas realizaciones, puede ser deseable ensayar parámetros de selección múltiples, dado que el ensayo de parámetros múltiples puede proporcionar mayores sensibilidad y especificidad. Por sensibilidad se entiende la proporción de positivos reales que se identifican correctamente como tales. Esto puede representarse matemáticamente como:

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

25 Así, en un método en donde "positivos" son los embriones que tienen buen potencial de desarrollo, es decir que se desarrollarán en blastocistos, y/o se convertirán en un blastocisto de buena calidad y/o se implantarán en el útero y/o serán euploides, y "negativos" son los embriones que tienen potencial de desarrollo pobre, es decir que no se desarrollarán en blastocistos ni se desarrollarán en blastocistos en buena calidad o se implantarán en el útero y/o serán aneuploides, una sensibilidad de 100% significa que el test reconoce como tales todos los embriones que se desarrollarán en blastocistos, o llegaran a ser blastocistos de buena calidad o se implantarán en el útero y/o serán euploides. En algunas realizaciones, la sensibilidad del ensayo puede ser aproximadamente 70%, 80%, 90%, 95%, 98% o más, p.ej. 100%. Por especificidad se entiende la proporción de "negativos" que se identifican correctamente como tales. Como se ha expuesto anteriormente, el término "especificidad" cuando se utiliza en esta memoria con respecto a métodos de previsión y/o evaluación se emplea para hacer referencia a la capacidad de predecir o evaluar un embrión para determinación de la probabilidad de que el embrión no se desarrolle en un blastocisto, ni llegue a ser un blastocisto de buena calidad o se implante en el útero y/o sea euploide por evaluación, determinación, identificación o selección de embriones que probablemente no alcanzarán la etapa de blastocisto y/o se convertirán en un blastocisto de buena calidad y/o se implantarán en el útero o aquéllos que tienen mayor probabilidad de ser aneuploides. Esto puede representarse matemáticamente como:

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

40 Así, en un método en donde positivos son los embriones que alcanzarán probablemente la etapa de blastocisto y/o se convertirán en blastocistos de buena calidad y/o se implantarán en el útero (es decir, que se desarrollarán probablemente en blastocistos) y/o serán euploides y negativos son los embriones que no alcanzarán probablemente la etapa de blastocisto (es decir, que probablemente no se desarrollarán en blastocistos) o aquéllos que tienen más probabilidad de ser aneuploides, una especificidad de 100% significa que el test reconoce todos los embriones que no se desarrollarán en blastocistos, es decir que se detendrán antes de la etapa de blastocisto. En algunas realizaciones, la especificidad puede ser una "especificidad alta" de 70%, 72%, 75%, 77%, 80%, 82%, 85%, 88%, 90%, 92%, 95%, 98% o más, p.ej. 100%. Como se demuestra más adelante en las secciones de ejemplos, el uso de dos parámetros proporciona sensibilidad de 40%, 57%, 68%, 62%, 68% y especificidad de 86%, 88%, 83%, 83%, 77%, respectivamente. Dicho de otro modo, en una realización ilustrativa, los métodos de la invención son capaces de identificar correctamente el número de embriones que van a desarrollarse en blastocistos y/o serán euploides al menos aproximadamente 40%-68% del tiempo (sensibilidad), y el número de embriones que van a detenerse antes de la etapa de blastocisto y/o serán aneuploides al menos aproximadamente 77%-88% del tiempo (especificidad), con indiferencia del modelo de algoritmo empleado, y como tal, la presente invención proporciona un método de alta especificidad para identificación de los embriones que se detendrán antes de la etapa de blastocisto o no se desarrollarán en blastocistos de buena calidad y/o serán aneuploides. Adicionalmente, los valores medios y/o puntos de corte especificados pueden modificarse dependiendo del conjunto de datos utilizado para calcular estos valores, así como de la aplicación específica.

En algunas realizaciones, la evaluación de un embrión o incluye la generación de un informe escrito que incluye la evaluación por el técnico del embrión de que se trate, p.ej. "evaluación/selección/determinación de embriones que probablemente y/o no probablemente alcancen la etapa de blastocisto y/o se desarrollan en blastocistos de buena calidad y/o se implanten en el útero", una "evaluación de anomalías cromosómicas", etc. Así, un método presente
5 puede incluir adicionalmente un paso de generación o emisión de un informe que proporcione los resultados de tal evaluación, informe que puede proporcionarse en forma de un medio electrónico (p.ej., una presentación electrónica en un monitor de computadora), o en la forma de un medio tangible (p.ej., un informe impreso en papel u otro medio tangible).

Un "informe", como se describe en esta memoria es un documento electrónico o tangible que incluye elementos de
10 informe que proporcionan información de interés concerniente a una evaluación a la que se llega por los métodos de la invención. Un informe de este tipo puede generarse totalmente o en parte electrónicamente. Un informe de este tipo incluye al menos una evaluación de la probabilidad de que el presente embrión alcance la etapa de blastocisto y/o se implante en el útero, una evaluación de la probabilidad de la existencia de anomalías cromosómicas, etc. Un informe de este tipo puede incluir adicionalmente uno o más de: 1) información acerca de la instalación de ensayos;
15 2) información del suministrador del servicio; 3) datos del individuo; 4) datos de la muestra; 5) una sección del informe de evaluación detallado, que proporcione información relativa al modo en que se llegó a la evaluación, p.ej. a) medidas tomadas de los parámetros celulares, b) valores de referencia empleados, en su caso; y 6) otras características.

El informe puede incluir información acerca de la instalación de ensayos, información que es relevante para el hospital, clínica, o laboratorio en el que se realizaron la recogida de la muestra y/o la generación de los datos. La recogida de
20 las muestras puede incluir el modo en que se generó la muestra, p.ej. el modo en que se recogió de un individuo, y/o el modo en que se cultivó la misma, etc. La generación de los datos puede incluir el modo en que se adquirieron las imágenes o el modo en que se analizaron los perfiles de expresión génica. Esta información puede incluir uno o más detalles relativos a, por ejemplo, el nombre y/o la localización de la instalación de ensayos, la identidad del técnico de laboratorio que realizó el ensayo y/o que introdujo los datos de entrada, la fecha y la hora en que se realizó y/o se
25 analizó el ensayo, el lugar en el que se guarda la muestra y/o los datos de resultado, el número de lote de los reactivos o medios de cultivo (p.ej., kit, etc.) utilizados en el ensayo, etcétera. Los campos del informe con esta información pueden ser cumplimentados generalmente utilizando información proporcionada por el usuario.

El informe puede incluir información acerca del suministrador del servicio, que puede estar localizado fuera de la instalación de atención sanitaria en la cual está localizado usuario, o dentro de la instalación sanitaria. Ejemplos de tal
30 información pueden incluir el nombre y/o localización del suministrador del servicio, el nombre del examinador, y en caso necesario o deseado el nombre del individuo que condujo la preparación de la muestra y/o la generación de los datos. Los campos del informe con esta información pueden cumplimentarse generalmente utilizando datos suministrados por el usuario, que pueden seleccionarse de entre selecciones prescritas (p.ej., utilizando un menú "drop-down"). Otra información del suministrador del servicio en el informe puede incluir información de contacto para
35 información técnica acerca del resultado y/o acerca del informe interpretativo.

El informe puede incluir una sección de datos del individuo, con inclusión del historial médico de los individuos de los cuales se recogieron los oocitos, edad del individuo, características del ciclo de fertilización *in vitro* (p.ej. régimen de fertilización, nivel de hormona estimulante del folículo (FSH) el día 3), y, cuando se recogieron los oocitos, los
40 parámetros del grupo cigoto/embrión (p.ej. número total de embriones). Estos datos del individuo pueden integrarse para mejorar la evaluación del embrión y/o ayudar a determinar el número óptimo de embriones a transferir. El informe puede incluir también datos administrativos del individuo (es decir, datos que no son esenciales para la evaluación de la probabilidad de alcanzar la etapa de blastocisto) tales como información para identificar el individuo (p.ej., nombre, fecha de nacimiento del individuo (DOB), sexo, dirección postal y/o de residencia, número de registro médico (MRN), habitación y/o número de cama en una instalación sanitaria), información de seguro, y análogos), el nombre del médico u otro profesional sanitario del individuo que ordenó la evaluación del potencial de desarrollo y, en caso de ser diferente del médico que lo ordenó, el nombre de un médico del equipo que es responsable del cuidado del individuo (p.ej.,
45 médico de atención primaria).

El informe puede incluir una sección de datos de la muestra, que puede proporcionar información acerca de la muestra biológica analizada en la evaluación, tal como el modo en que se manipuló la muestra (p.ej. temperatura de
50 almacenamiento, protocolos de preparación) y la fecha y hora de recogida. Los campos del informe con esta información pueden rellenarse generalmente utilizando los datos suministrados por el usuario, algunos de los cuales pueden ser proporcionados como selecciones prescritas (p.ej., utilizando un menú "drop-down").

El informe puede incluir una sección de informe de evaluación, que puede incluir información relativa al modo en que se ha llegado a las evaluaciones/determinaciones que se describen en esta memoria. El informe interpretativo puede
55 incluir, por ejemplo, imágenes a intervalos de tiempo preestablecidos del embrión objeto de evaluación, y/o resultados de la expresión génica. La porción de evaluación del informe puede incluir también opcionalmente una sección de recomendación/recomendaciones. Por ejemplo, en el caso de que los resultados indiquen que es probable que el embrión alcance la etapa de blastocisto y/o se implante en el útero, la recomendación puede incluir una recomendación de que se trasplante al útero un número limitado de embriones durante el tratamiento de fertilidad como se recomienda en la técnica.
60

Se apreciará también fácilmente que los informes pueden incluir elementos adicionales o elementos modificados. Por ejemplo, en caso de ser electrónico, el informe puede contener hipervínculos que dirijan a bases de datos internas o externas que proporcionen información más detallada acerca de elementos seleccionados del informe. Por ejemplo, el elemento del informe de datos del individuo puede incluir un hipervínculo a un registro electrónico de individuos, o un sitio para acceder a dicho registro de individuos, registro de individuos que se mantiene en una base de datos confidencial. Esta última realización puede ser de interés en un sistema hospitalario o en un escenario de clínica. Cuando se presenta en formato electrónico, el informe se registra en un medio físico adecuado, tal como un medio legible por computadora, p.ej., en una memoria de computadora, unidad zip, CD, DVD, etc.

Se apreciará fácilmente que el informe puede incluir todos o algunos de los elementos anteriores, con la salvedad de que el informe incluye generalmente al menos los elementos suficientes para proporcionar el análisis requerido por el usuario (p.ej., una evaluación de la probabilidad de alcanzar la etapa de blastocisto).

Como se ha expuesto anteriormente, los métodos de la invención pueden utilizarse para evaluar embriones o células a fin de determinar la probabilidad de que los embriones alcancen la etapa de blastocisto, y/o se desarrollen en blastocistos de buena calidad y/o se implanten en el útero y/o sean euploides. Esta determinación de la probabilidad de que los embriones alcanzan la etapa de blastocisto y/o se implanten en el útero puede utilizarse para guiar decisiones y/o acciones clínicas. Por ejemplo, con objeto de aumentar las tasas de embarazo, los clínicos transfieren a menudo embriones múltiples a los individuos, dando potencialmente como resultado embarazos múltiples que plantean riesgos de salud tanto para la madre como para los fetos. Utilizando los resultados obtenidos por los métodos de la invención, la probabilidad de alcanzar la etapa de blastocisto, y/o desarrollarse en blastocistos de buena calidad y/o implantarse en el útero y/o ser euploides puede estar determinada por los embriones que se transfieren. Dado que los embriones que alcanzarán probablemente la etapa de blastocisto, y/o que se desarrollarán en blastocistos de buena calidad y/o se implantarán en el útero y/o serán euploides es más probable que se desarrollen en fetos, la determinación de la probabilidad de que el embrión alcance la etapa de blastocisto, y/o se desarrolle en blastocistos de buena calidad y/o se implante en el útero y/o sea euploide antes del trasplante permite al especialista decidir el número de embriones a transferir a fin de maximizar la probabilidad de éxito de un embarazo completo a término minimizando al mismo tiempo el riesgo.

Las evaluaciones realizadas siguiendo los métodos de la invención pueden encontrar también aplicación en la clasificación de embriones o en un grupo de embriones o por su probabilidad de que los embriones alcancen la etapa de blastocisto, así como por la calidad del blastocisto y el estado de ploidía (euploide o aneuploide) que se alcanzará (p.ej., en algunas realizaciones esto podría incluir la probabilidad de implantación en el útero). Por ejemplo, en algunos casos, embriones múltiples pueden ser capaces de desarrollarse en blastocistos, es decir embriones múltiples alcanzarán probablemente la etapa de blastocisto. Sin embargo, algunos embriones tendrán más probabilidad de alcanzar la etapa de blastocisto, es decir, tendrán mejor probabilidad de alcanzar la etapa de blastocisto, o tendrán mejor probabilidad de desarrollarse en blastocistos de buena calidad, o mejor probabilidad de implantarse en el útero que otros embriones o pueden ser más probablemente euploides. En tales casos, los métodos de la invención pueden utilizarse para clasificar los embriones comprendidos en el grupo. En tales métodos, se miden uno o más parámetros celulares para cada embrión a fin de llegar a una medida de parámetros celulares para cada embrión. Las una o más medidas de parámetros celulares de cada uno de los embriones se emplean luego para determinar la probabilidad de uno de los embriones unos con relación a otros para alcanzar la etapa de blastocisto y/o implantarse en el útero y/o ser euploide. En algunas realizaciones, las medidas de parámetros celulares de cada uno de los embriones se emplean por comparación de las mismas directamente unas respecto a otras para determinar la probabilidad de alcanzar la etapa de blastocisto y/o implantarse en el útero y/o ser euploide. En algunas realizaciones, las medidas de los parámetros celulares de cada uno de los embriones se emplean comparando las medidas de los parámetros celulares con la medida de un parámetro celular de un embrión de referencia para determinar la probabilidad de alcanzar la etapa de blastocisto y/o implantarse en el útero para cada embrión, y comparando luego la determinación de la probabilidad de alcanzar la etapa de blastocisto y/o implantarse en el útero y/o ser euploide para cada embrión a fin de determinar la probabilidad de alcanzar la etapa de blastocisto y/o implantarse en el útero y/o ser euploide de los embriones unos con relación a otros.

De este modo, un profesional que evalúe, por ejemplo, cigotos/embriones múltiples, puede seleccionar solamente los embriones de calidad óptima, es decir aquéllos que tienen la probabilidad óptima de alcanzar la etapa de blastocisto y/o implantarse en el útero y/o ser euploides, para transferencia a fin de maximizar la probabilidad de éxito de un embarazo completo a término minimizando al mismo tiempo el riesgo.

Se proporcionan también reactivos, dispositivos y kits de los mismos para la práctica de uno o más de los métodos arriba descritos. Los presentes reactivos, dispositivos y sus kits pueden variar notablemente. Reactivos y dispositivos de interés incluyen los mencionados anteriormente con respecto a los métodos de medida de cualesquiera de los parámetros celulares mencionados con anterioridad, donde tales reactivos pueden incluir placas de cultivo, medios de cultivo, microscopios, software de obtención de imágenes, software de análisis de imágenes, iniciadores de ácidos nucleicos, redes de sondas de ácidos nucleicos, anticuerpos, reactivos de sistemas de producción de señales, etc., dependiendo del protocolo de medida particular a realizar.

Además de los componentes anteriores, los presentes kits incluyen adicionalmente instrucciones para la práctica de los métodos en cuestión. Dichas instrucciones pueden estar presentes en los kits de que se trata en una diversidad

de formas, una o más de las cuales pueden estar presentes en el kit. Una forma en la cual pueden estar presentes estas instrucciones es como información impresa en un medio o sustrato adecuado, p.ej., una hoja u hojas de papel en las cuales está impresa la información, en el envase del kit, en una inserción del envase, etc. Otro método adicional podría ser un medio legible por computadora, p.ej., disquete, CD, etc., en donde se ha registrado la información. Otro método adicional que puede estar presente es una dirección de la web que puede utilizarse por Internet para acceder a la información en un sitio apartado. Cualquier medio conveniente puede estar presente en los kits.

Algunos de los métodos arriba descritos requieren la capacidad para observar el desarrollo del embrión por obtención de imágenes en tiempos preestablecidos. Esto puede conseguirse utilizando un sistema que comprende una red de microscopios miniatura multicanal, que pueden alojarse en el interior de una incubadora estándar. Esto permite la obtención rápida y simultánea de imágenes de muestras múltiples sin tener que mover físicamente las placas. Un prototipo ilustrativo, representado en Fig. 22 de la patente estadounidense n.º 7.963.906 (véase también el documento PCT/US2011/053537), consiste en una red de microscopios de 3 canales con iluminación de campo oscuro, aunque podrían utilizarse otros tipos de iluminación. Por "tres canales", se entiende que existen tres microscopios independientes que obtienen imágenes de tres placas de cultivo distintas simultáneamente. Se utiliza un motor de velocidad gradual para ajustar la posición focal para el enfoque o la adquisición de paquetes de imágenes 3D. Se utilizan LED de luz blanca para iluminación, aunque los autores de esta invención han observado que, para embriones humanos, la utilización de LED rojos o infrarrojos (IR) puede mejorar la ratio de contraste entre las membranas celulares y las porciones internas de las células. Esta ratio de contraste mejorada puede favorecer tanto el análisis manual de las imágenes como el automatizado. Adicionalmente, el desplazamiento a la región infrarroja puede reducir la fototoxicidad para las muestras. Las imágenes se capturan por medio de cámaras web de alta resolución y bajo coste, pero pueden utilizarse otros tipos de cámaras.

Como se muestra en la Fig. 22 de la patente estadounidense n.º 7.963.906 (véase también el documento PCT/US2011/053537), cada microscopio del sistema prototipo descrito anteriormente se utiliza para obtener imágenes de una placa de cultivo que puede contener cualquier número de 1-30 embriones. El microscopio recoge la luz de un LED de luz blanca conectado 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 un parche convencional de campo oscuro para detener la luz directa, a través de una lente condensadora y sobre un espécimen etiquetado "placa Petri", que es una placa de cultivo que contiene los embriones que se cultivan y estudian. La placa de cultivo puede tener pocillos que ayudan a mantener el orden de los embriones e impedir el movimiento de los mismos mientras se transporta la placa a y desde la incubadora. Los pocillos pueden estar suficientemente próximos unos a otros a fin de que los embriones puedan compartir la misma gota de medio. La luz dispersada pasa a continuación por un objetivo de microscopio, luego a través de un doblete acromático, y a un sensor CMOS. El sensor CMOS actúa como una cámara digital y está conectado a una computadora para el análisis y rastreo de las imágenes como se ha descrito anteriormente.

Este diseño es fácilmente escalable para proporcionar un número significativamente mayor de canales y técnicas de iluminación diferentes, y puede modificarse para acomodar dispositivos fluidos para alimentación de las muestras. Además, el diseño puede estar integrado con un sistema de control de realimentación, en el que las condiciones de cultivo tales como temperatura, CO₂ (para control del pH), y medios están optimizadas en tiempo real basado en la realimentación y por los datos de obtención de las imágenes. Este sistema fue utilizado para adquirir vídeos en tiempos preestablecidos de desarrollo de embriones humanos, lo cual tiene utilidad en la determinación de la viabilidad del embrión para los procedimientos de fertilización *in vitro* (IVF). Otras aplicaciones incluyen terapia con células madre, selección de fármacos, e ingeniería tisular.

En una realización del dispositivo, la iluminación es proporcionada por un diodo emisor de luz blanca (LED) Luxeon montado en un disipador de calor de aluminio y alimentado por una unidad de corriente regulada Buck Puck. La luz procedente del LED se hace pasar a través de una lente colimadora. La luz colimada pasa luego a través de un stop de parche personalizado controlado por láser, como se muestra en Fig. 22 de la patente estadounidense n.º 7.963.906 (véase también el documento PCT/US2011/053537), y se enfoca en un cono de luz hueco utilizando una lente condensadora esférica. La luz que se transmite directamente a través de la muestra es rechazada por el objetivo, mientras que la luz que es difundida por la muestra se recoge. En una realización, se utilizan objetivos Olympus con 20X aumentos, aunque pueden utilizarse aumentos más pequeños para aumentar el campo de visión, o se pueden utilizar aumentos mayores para aumentar la resolución. La luz recogida se hace pasar luego a través de una lente de doblete acromático (es decir una lente tubular) para reducir los efectos de la aberración cromática y esférica. Alternativamente, la luz recogida por el objetivo de la imagen puede hacerse pasar a través de otro objetivo, apuntado en la dirección opuesta, que actúa como reemplazamiento de la lente tubular. En una configuración, el objetivo de obtención de la imagen puede ser un objetivo 10X, mientras que el objetivo de la lente tubular puede ser un objetivo 4X. La imagen resultante es capturada por un sensor CMOS con resolución de 2 megapixels (1600 x 1200 pixels). También pueden utilizarse tipos de sensores y resoluciones diferentes.

Por ejemplo, la Fig. 23A de la patente estadounidense n.º 7.963.906 (véase también el documento PCT/US2011/053537) muestra un esquema del sistema de microscopio multicanal que tiene 3 microscopios idénticos. Todos los componentes ópticos están montados en lentes tubulares. En la operación del sistema de red, se cargan placas Petri en plataformas acrílicas que están montadas en platinas manuales inclinadas de 2 ejes, que permiten el ajuste del plano de imagen con relación al eje óptico. Estas platinas están fijadas a la base del microscopio y no se

5 mueven después de la alineación inicial. Los módulos de iluminación, que consisten en los LED, lentes colimadoras, stops de parche, y lentes condensadoras, están montados en platinas xyz manuales para posicionamiento y enfoque de la luz de iluminación. Los módulos de imagen, que consisten en los objetivos, lentes acromáticas y sensores CMOS, están montados también en platinas manuales xyz para posicionamiento del campo de visión y enfoque de los
 5 objetivos. La totalidad de los 3 módulos de imagen están fijados a diapositivas lineales y soportados por un brazo de palanca simple, que se acciona utilizando un motor de velocidad gradual. Esto hace posible el enfoque controlado por la computadora y la captura automática de paquetes de imágenes. Pueden utilizarse otros métodos de enfoque y accionamiento automáticos.

10 La red de microscopios estaba dispuesta en el interior de una incubadora estándar, como se muestra, por ejemplo, en Fig. 23B de la patente estadounidense n.º 7.963.906 (véase también el documento PCT/US2011/053537). Los sensores de imagen CMOS están conectados por conexión USB a un eje simple localizado en el interior de la incubadora, que está encaminado a un PC externo junto con otras líneas de comunicación y energía. Todos los cables eléctricos salen de la incubadora por el centro de un tapón de caucho sellado con cola de silicona.

15 La red de microscopios arriba descrita, o una similar, puede utilizarse para registrar imágenes a intervalos de tiempo preestablecidos del desarrollo y crecimiento precoz documentado de embriones humanos desde la etapa de cigoto a la de blastocisto. En algunas realizaciones, las imágenes pueden capturarse cada 5 minutos con aproximadamente 1 segundo de exposición a luz baja por imagen. La cantidad total de luz recibida por las muestras puede ser equivalente a 52 segundos de exposición continua, similar al nivel total experimentado en una clínica de IVF durante la manipulación. La duración de 1 segundo de exposición a la luz por imagen puede reducirse en algunas realizaciones.
 20 Antes de trabajar con los embriones humanos, los autores de la presente invención realizaron experimentos de control extensos con embriones de ratón preimplantación con objeto de asegurar que tanto la tasa de formación de blastocistos como los patrones de expresión génica no se veían afectados por el proceso de obtención de las imágenes.

25 Los embriones individuales pueden seguirse a lo largo del tiempo, aun cuando sus posiciones en el campo fotográfico se desplazan cuando los embriones sufren un cambio de medio, cambiándose en algunos casos el medio el día 3. El uso de medios secuenciales puede ser necesario para satisfacer los requisitos específicos de la etapa del embrión en desarrollo. Durante el cambio de medio, los embriones se retiraban de la estación de obtención de las imágenes durante unos cuantos minutos y se transferían a placas Petri nuevas. El problema de rastreo de la identidad del embrión puede mitigarse utilizando pocillos que faciliten la disposición de los embriones en un orden particular.

30 Cuando se transfieren las placas Petri entre estaciones diferentes, los embriones pueden moverse a veces, lo que hace difícil rastrear la identidad del embrión. Esto plantea un reto cuando la obtención de imágenes en tiempos preestablecidos se realiza en una sola estación, y los embriones pueden moverse subsiguientemente a una segunda estación para selección y transferencia de los embriones. Un método consiste en cultivar los embriones en placas Petri individuales. Sin embargo, esto requiere que cada embrión tenga su propia gota de medio. En un procedimiento
 35 IVF típico, usualmente es deseable cultivar la totalidad de los embriones de una paciente en la misma placa Petri y en la misma gota de medio. Para abordar este problema, los autores de la invención han diseñado una placa Petri personalizada con micropocillos. Esto protege los embriones contra el movimiento y mantiene su disposición ordenada en la placa Petri cuando se transfiere a y desde la incubadora o las estaciones de obtención de imagen. Adicionalmente, los pocillos son suficientemente pequeños y están distanciados muy próximos unos a otros, de tal manera que los mismos pueden compartir la misma gota de medio y pueden ser visualizados todos ellos simultáneamente por el mismo microscopio. La superficie del fondo de cada micropocillo tiene un acabado de calidad óptica. Por ejemplo, la Fig. 27A en la patente estadounidense n.º 7.963.906 muestra un dibujo con dimensiones para una realización particular. En esta versión, existen 25 micropocillos distanciados muy próximos unos a otros dentro de un campo de visión de 1,7 x 1,7 mm. La Fig. 27B de la patente estadounidense n.º 7.963.906 muestra una vista 3D
 40 de los micropocillos, que están rebajados aproximadamente 100 micrómetros en la superficie de la placa. Marcadores de confianza, que incluyen letras, números, y otras marcas, se incluyen en la placa para ayudar a la identificación.
 45

Ejemplos

Los ejemplos siguientes se presentan para proporcionar a quienes poseen experiencia ordinaria en la técnica una exposición y descripción del modo de realización y utilización de la presente invención, y no tienen por objeto limitar el alcance de lo que los inventores consideran como su invención ni pretenden representar que los experimentos
 50 siguientes son todos o los únicos experimentos realizados. Se han hecho esfuerzos para asegurar la exactitud con respecto los números utilizados (p. ej., cantidades, temperatura, etc.) pero deben admitirse algunos errores y desviaciones experimentales. A no ser que se indique otra cosa, las partes son partes en peso, el peso molecular es peso molecular medio ponderado, la temperatura se expresa en grados centígrados, y la presión es o está próxima a la presión atmosférica.
 55

Ejemplo 1

Se realizó un estudio retrospectivo de grupo utilizando datos de imágenes recogidos de 651 embriones de 67 pacientes procedentes de cinco clínicas en un periodo de 16 meses. Las imágenes de los embriones de las pacientes se

obtuvieron utilizando el Test Eeva™, una tecnología de intervalos de tiempo preestablecidos desarrollada para la predicción de blastocistos.

Todas las imágenes de los embriones se identificaron por tener 2 pronúcleos (PN) antes de ser dispuestas en una placa Eeva multipocillo que permite que los embriones se rastreen individualmente mientras comparten una sola gota de medio de cultivo. Se realizó una comprobación de la fertilización conforme al protocolo estándar de cada clínica. Todos los embriones 2PN se transfirieron a la placa Eeva inmediatamente después de la comprobación del estatus de fertilización, y la placa se puso en el campo de la Eeva en la incubadora. Para mantener un proceso de obtención de imágenes continuo e ininterrumpido desde el Día 1 al Día 3, no se permitió cambio alguno de medio o retirada de la placa de la incubadora. El Día 3, se paró la obtención de imágenes inmediatamente antes de la realización de la gradación de embriones rutinaria. Todos los embriones se rastrearon individualmente para mantener sus identidades. La gradación, selección y transferencia de los embriones (en los Días 3 ó 5), se realizaron conforme a los procedimientos operativos estándar de cada clínica individual.

El resultado del desarrollo de los embriones se midió por grado de morfología y tasa de formación de blastocistos global. El grado global de los embriones se determinó utilizando la gradación morfológica de la etapa de escisión y la etapa de blastocisto como se definen por la Society for Assisted Reproductive Technology (SART) (Racowsky, C., *et al.*, Fertil Steril, 2010. 94(3): p. 1152-3; Vernon, M., *et al.*, Fertil Steril, 2011. 95(8): p. 2761-3). La discriminación ulterior entre los embriones del Día 3 con 6-10 células se incluyó en el análisis para poner el foco en los embriones de calidad superior con $\leq 10\%$ de fragmentación. La implantación se confirmó por ultrasonidos que mostraban la evidencia de movimiento intrauterino del corazón del feto a la edad de gestación de aproximadamente 6-8 semanas. La implantación conocida incluía datos en los cuales se confirmó el estatus de implantación del embrión, p.ej., el número de bolsas gestacionales coincidía con el número de embriones transferidos.

Los valores medios se compararon utilizando un test *t* con utilización de SAS. Las asociaciones entre presencia o ausencia de fenotipos atípicos y la calidad y el potencial de desarrollo de los embriones se examinaron utilizando un test chi cuadrado o el test Fisher's Exact para evaluar la significación estadística, donde se consideró que $p < 0,05$ era estadísticamente significativo.

Los videos de los embriones se revisaron y evaluaron respecto a AS y P_{sin} .

Los embriones con desaparición oportuna de los pronúcleos (PN) y dispersión uniforme de las envolturas nucleares se clasificaron como singamia normal (NS), o control. Los embriones con movimiento desordenado de PN dentro del citoplasma sin dispersión rápida de las envolturas nucleares se clasificaron como AS. Se midió también P_{sin} , el tiempo desde la singamia a la primera citocinesis, en los embriones en que pudo medirse la singamia. Se clasificaron como inconmensurables los embriones en los que no pudo medirse la singamia.

La prevalencia global de AS era 25,1% (163/649) entre todos los embriones revisados, y prevalente en el 73,0% (49/67) de los pacientes. El tiempo medio para P_{sin} era significativamente más corto para los embriones que exhibían AS frente a NS ($1,8 \pm 1,4$ horas frente a $2,4 \pm 1,8$ horas, $p < 0,0001$). Comparados con los embriones NS, los embriones AS tendían a presentar una gradación de morfología más pobre el día 3 (6-10 células y $\leq 10\%$ de fragmentación, 41,6% frente a 61,7%, $p = 0,002$), embriones de menor escisión con gradación global buena o aceptable (78,6% frente a 90,7%, $p < 0,001$), y una tasa mayor de fragmentación alta ($> 25\%$ fragmentación, 12,4% (11/89) frente a 8,4% (29/345), $p < 0,0001$) (Tabla 2). Aunque tanto los embriones NS como los AS tenían un porcentaje similar de embriones cultivados hasta el día 5 (65,6% (107/163) frente a 66,0% (292/443), $p = 0,5$), notablemente, la tasa de formación de blastocistos era significativamente menor para los embriones AS (21,5% frente a 44,9%, $p < 0,0001$) y la mayor parte de los embriones AS que formaban blastocistos eran de calidad pobre. Únicamente 26,4% de los embriones AS se transfirieron o congelaron, mientras que se seleccionaron 50,1% de los embriones NS. El análisis de los datos de implantación conocidos reveló tasas de implantación de 0,0% para los embriones AS y 17,9% para los embriones NS ($p = 0,08$).

Tabla 2. Singamia Anormal (AS): Calidad del Embrión y Potencial de Desarrollo para los Embriones el Día 3 y el Día 5

Singamia anormal (AS)	Día 3, 6-10 Células $\leq 10\%$ Fragmentación	Día 3, Grado Global Bueno/ Aceptable	Tasa de Formación de Blastocistos	Grado Global de Blastocistos Bueno/ Aceptable	Embriones Transferidos o Congelados	Datos de Implantación Conocidos
Control: Sin AS (n=443)	61,73% (213/345)	90,7% (313/345)	44,9% (131/292)	60,0% (79/131)	50,1% (222/443)	17,9% (19/106)
Con AS (n=163)	41,6% (37/89)	78,6% (70/89)	21,5% (23/107)	30,0% (7/23)	26,4% (43/163)	0,0% (0/14)
Valor p	$< 0,001$	0,002	$< 0,0001$	0,008	$< 0,0001$	0,08

Tomados en su conjunto, estos datos muestran claramente que los embriones AS alcanzan la etapa de blastocisto con una tasa mucho menor que los embriones NS, y aquéllos que alcanzan el blastocisto son de calidad mucho más

pobre, demostrando que estos nuevos parámetros de singamia proporcionan un indicador precoz de embriones con bajo potencial de desarrollo. Por tanto, estos parámetros pueden utilizarse solos, o en combinación con parámetros descritos previamente, tales como los descritos en las patentes estadounidenses n.ºs 7.963.906; 8.323.177, y 8.337.387 y la solicitud PCT n.º: WO 2012/163363 para seleccionar embriones que tienen la máxima probabilidad de alcanzar el blastocisto y/o implantarse en el útero y deseleccionar embriones que probablemente no alcancen el blastocisto y/o se implanten en el útero.

Ejemplo 2

Se ha informado que más del 50% de los embriones humanos cultivados en clínicas de IVF son embriones aneuploides que tienen un número anormal de cromosomas. Estos embriones aneuploides tienen tasas de implantación más bajas y no es probable que den como resultado parto vivo de bebés sanos. Actualmente, la selección genética preimplantación (PGS) es la estrategia más eficaz para seleccionar contra los embriones con aneuploidía. Sin embargo, debido a su alto coste, requerimientos intensivos de mano de obra y naturaleza invasiva, menos del 10% de las pacientes que se tratan para reproducción asistida se someten a PGS antes de la transferencia de los embriones.

Con objeto de desarrollar un ensayo no invasivo capacitado para intervalos de tiempo preestablecidos a fin de evaluar el riesgo de que los embriones sean aneuploides, se descubrió que por evaluación del parámetro P_{sin} , solo o en combinación con otro parámetro celular, la morfología del embrión y la información de la paciente, puede determinarse la probabilidad de que un embrión sea aneuploide.

Por evaluación de los valores P_{sin} a partir de datos de 402 embriones a intervalos de tiempo preestablecidos, se descubrió que los embriones euploides tienen P_{sin} más larga que los embriones aneuploides. Como se muestra en las Figuras 3 y 4, el parámetro P_{sin} tiene una distribución diferente estadísticamente significativa ($p=0,001$, test Wilcoxon-Mann-Whitney) entre embriones aneuploides ($2,34\pm 0,44$ horas, $n=128$) y embriones euploides ($2,50\pm 0,51$ horas, $n=274$).

Estos datos muestran que P_{sin} puede utilizarse para proporcionar una estimación de la probabilidad de aneuploidía del embrión. Un P_{sin} más largo puede utilizarse para seleccionar embriones que tienen más probabilidad de ser euploides, mientras que un P_{sin} más corto se puede utilizar para deseleccionar embriones que tienen más probabilidad de ser aneuploides. Por tanto, puede utilizarse P_{sin} sola, o en combinación con parámetros descritos anteriormente, tales como los descritos en las patentes estadounidenses n.º 7.963.906; 8.323.177, y 8.337.387 y la solicitud PCT n.º: WO 2012/163363 para seleccionar embriones que alcanzarán muy probablemente el blastocisto y/o se implantarán en el útero, y deseleccionar embriones que probablemente no alcanzarán el blastocisto y/o se implantarán en el útero.

Ejemplo 3

Se realizó un análisis ulterior del estudio retrospectivo de grupo descrito en los ejemplos anteriores para evaluar los parámetros AS en combinación con otros parámetros de fenotipo atípico. Utilizando los datos de las 67 pacientes y videos de 639 embriones, se analizaron embriones con uno o más fenotipos atípicos.

Los fenotipos atípicos examinados eran escisión anormal (AC), singamia anormal (AS), primera citocinesis anormal ($A1^{cit}$) y escisión caótica. El fenotipo AS se definió como se describe en el Ejemplo 1. El fenotipo AC se definió como aquellos embriones que exhibían la producción de más de 2 células durante un solo evento de división celular, con inclusión de fenotipos AC1 que exhibían una primera escisión que producía más de dos blastómeros y fenotipos AC2 que exhibían una escisión de células hijas que producía más de dos blastómeros. El fenotipo $A1^{cit}$ se definió como aquellos embriones que exhibían arrugamiento del oolema con o sin la formación de pseudo-surcos antes de la culminación de la primera citocinesis. El fenotipo de escisión caótica se definió como aquellos embriones que exhibían comportamiento de escisión desordenado, con o sin la presencia de muchos fragmentos en la etapa de 4 células.

La prevalencia global de embriones que exhibían uno o más fenotipo(s) atípico(s) era 54,2% entre todos los embriones revisados y prevalente en el 98,5% (66/67) entre todos los casos de las pacientes. Comparados con el grupo de control (sin fenotipo atípico alguno), los embriones con al menos un fenotipo atípico tendían a presentar menos embriones de calidad pobre el día 3 (6-10 células y fragmentación $\leq 10\%$, 45,4% frente a 67,8%, $p<0,0001$), mayor tasa de embriones altamente fragmentados ($>25\%$ fragmentación, 28,4% (100/352) frente a 5,74% (17/297) $p<0,0001$) y menos embriones con menor escisión con grado global bueno o aceptable (80,3% frente a 94,7% $p<0,0001$) (Tabla 3). Ambos grupos presentaban una tasa similar de formación de blastocistos (52,1% frente a 56,9%, $p=0,6$) y porcentajes similares de blastocistos de calidad buena o aceptable (52,1% frente a 56,9%, $p=0,6$), pero que tenían diferencias estadísticamente significativas en el número de embriones transferidos o congelados (34,7% frente a 53,9%, $p<0,0001$). Los embriones con al menos un fenotipo tenían también una tasa de implantación menor estadísticamente significativa (8,6% frente a 21,9%, $p=0,02$).

Tabla 3. Embriones que presentaban uno o más fenotipo(s) atípico(s): Calidad del Embrión y Potencial de Desarrollo para los Embriones del Día 3 y el Día 5.

Uno o más fenotipos atípicos	Día 3, 6-10 células ≤ 10% fragmentación	Día 3, Grado Global Bueno/Aceptable	Tasa de Formación del Blastocisto	Grado Global de Blastocistos Bueno/Aceptable	Embriones Transferidos o Congelados	Datos de Implantación Conocidos
Control: Sin ningún fenotipo atípico (n=297)	67,8% (166/245)	94,7% (232/245)	53,7% (109/203)	56,9% (62/109)	53,9% (160/297)	21,9% (16/64)
Con uno o más fenotipos atípicos (n=352)	45,4% (99/218)	80,3% (175/218)	22,4% (48/214)	52,1% (25/48)	34,7% (122/352)	8,6% (5/58)
Valor p	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,6	<0,0001	0,02

El grupo de embriones que exhibían uno o más fenotipos atípicos era diferente en grado estadísticamente significativo del grupo de control para la mayoría de los resultados. Notablemente, 5 de cada 10 embriones exhibían al menos un fenotipo atípico: 18,8% de los embriones exhibían al menos 2 fenotipos (122/649), 6,5% exhibían 3 fenotipos (42/649) y 1,1% exhibían 4 fenotipos (7/649). Esta prevalencia extraordinariamente alta dentro de los grupos de embriones sugiere que se necesitan urgentemente herramientas para deseleccionar estos fenómenos dinámicos a fin de aumentar las probabilidades de seleccionar un embrión competente, dado que particularmente este estudio ha demostrado que muchos embriones que exhiben fenotipos normales tienen morfología convencional buena el día 3 y el día 5.

5

10

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para deseleccionar uno o más embriones humanos con potencial de desarrollo pobre que comprende:
 - (A) cultivar in-vitro uno o más embriones en condiciones suficientes para desarrollo del embrión;
- 5 (B) obtener imágenes de dichos uno o más embriones durante un periodo de tiempo desde al menos la singamia hasta al menos la primera citocinesis; y
- (C) deseleccionar un embrión de dichos uno o más embriones humanos cuando el embrión exhibe singamia anormal o singamia inconmensurable como se determina por:
 - (i) falta de visualización de los pronúcleos; o
 - 10 (ii) movimiento desordenado de los pronúcleos; o
 - (iii) cuando el periodo de tiempo entre la singamia y la primera citocinesis es menor de aproximadamente 1 hora; en donde no es probable que el embrión alcance la etapa de blastocisto o se implante con éxito en un útero.
2. El método de la reivindicación 1, en donde la selección comprende elegir no implantar en un útero el embrión determinado que tiene potencial de desarrollo pobre.
- 15 3. El método de la reivindicación 1 que comprende adicionalmente medir uno o más parámetros celulares seleccionados del grupo que consiste en:
 - (a) la duración de la primera citocinesis;
 - (b) el tiempo entre la primera y la segunda mitosis;
 - (c) el tiempo entre la segunda y la tercera mitosis;
 - 20 (d) el intervalo de tiempo entre la citocinesis 1 y la citocinesis 2;
 - (e) el intervalo de tiempo entre la citocinesis 2 y la citocinesis 3;
 - (f) el intervalo de tiempo entre la fertilización y la etapa de 5 células; y
 - (g) la duración del primer ciclo celular.
- 25 4. El método de la reivindicación 1 en donde dichos uno o más embriones se producen por fertilización de oocitos *in vitro* y opcionalmente en donde dichos oocitos se maduran *in vitro* y opcionalmente en donde dichos oocitos madurados *in vitro* se suplementan con factores de crecimiento.
5. El método de la reivindicación 1 en donde dichos uno o más embriones no se han congelado antes del cultivo.
6. El método de la reivindicación 1 en donde dichos uno o más embriones se han congelado antes del cultivo.
7. El método de la reivindicación 1 en donde la selección de un embrión está automatizada.
- 30 8. El método de la reivindicación 1 en donde dicha obtención de imágenes adquiere imágenes a intervalos de tiempo preestablecidos que se almacenan digitalmente.
9. El método de la reivindicación 1 en donde dicha obtención de imágenes emplea iluminación de campo oscuro, iluminación de campo brillante o una combinación de las mismas.
- 35 10. El método de la reivindicación 1 en donde dichos uno o más embriones humanos se colocan en una placa de cultivo antes de cultivarlos en condiciones suficientes para el desarrollo del embrión.
11. El método de la reivindicación 10, en donde dicha placa de cultivo comprende una pluralidad de micropocillos y opcionalmente en donde dicha placa de cultivo comprende de desde 1 hasta aproximadamente 30 micropocillos.
12. El método de la reivindicación 1, en donde dichos uno o más embriones humanos se colocan en un micropocillo antes de cultivarlos en condiciones suficientes para el desarrollo del embrión.
- 40 13. El método de la reivindicación 1 en donde la obtención de imágenes se lleva a cabo en una estación de obtención de imágenes.
14. El método de la reivindicación 1 en donde en (iii) el período de tiempo entre la singamia y la primera citocinesis es menor de aproximadamente 55 minutos, opcionalmente es menor de aproximadamente 50 minutos, opcionalmente

ES 2 755 878 T3

es menor de aproximadamente 45 minutos, opcionalmente es menor de aproximadamente 40 minutos, opcionalmente es menor de aproximadamente 35 minutos, opcionalmente es menor de aproximadamente 30 minutos, opcionalmente es menor de aproximadamente 25 minutos, opcionalmente es menor de aproximadamente 20 minutos, opcionalmente es menor de aproximadamente 15 minutos, opcionalmente es menor de aproximadamente 10 minutos, opcionalmente es menor de aproximadamente 5 minutos.

5

Figura 1.

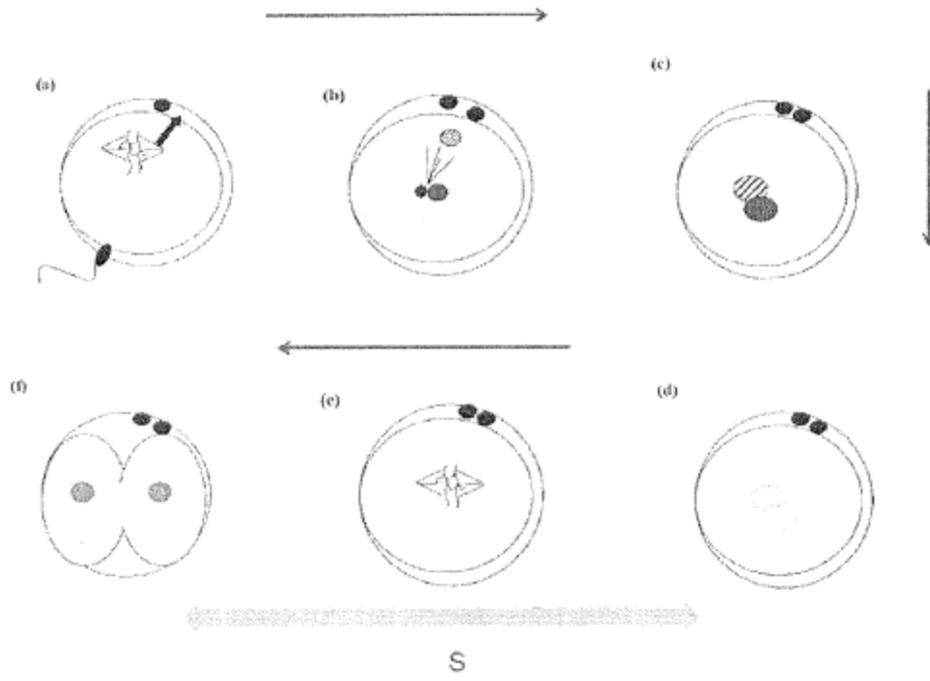


Figura 2.

A.

FENOTIPO DEL EMBRIÓN	DEFINICIÓN	ESQUEMÁTICO	PREVALENCIA			
Singamia Anormal (AS)	Embriones con movimiento desordenado de PN dentro del citoplasma, acompañado con dispersión retardada de las envolturas nucleares		<div style="text-align: center;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">Singamia Anormal (AS) (ilegible)</div> </div> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="text-align: center; width: 33%;">Sin AS N=443 68,3%</td> <td style="text-align: center; width: 33%;">Con AS N=163 25,1%</td> <td style="text-align: center; width: 33%;">Incomensurable N=43 6,6%</td> </tr> </table>	Sin AS N=443 68,3%	Con AS N=163 25,1%	Incomensurable N=43 6,6%
Sin AS N=443 68,3%	Con AS N=163 25,1%	Incomensurable N=43 6,6%				

B.

Singamia Anormal (AS)

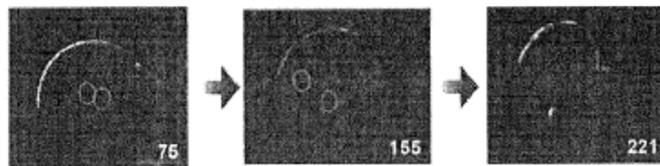


Figura 3

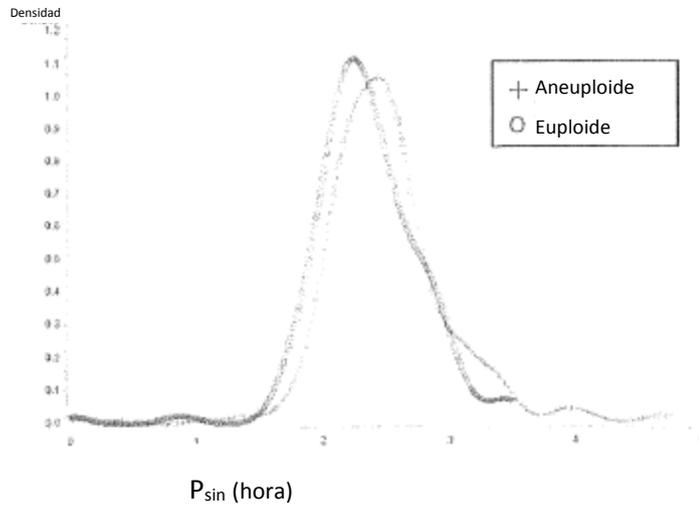


Figura 4

