(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 772 852**

(51) Int. CI.:

A61B 17/435 (2006.01)
G06T 7/00 (2007.01)
G06T 11/00 (2006.01)
G06T 19/00 (2011.01)
C12N 5/073 (2010.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.07.2015 PCT/IB2015/001346**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **07.01.2016 WO16001754**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.07.2015 E 15797384 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2020 EP 3164483**

(54) Título: **Métodos para la reconstrucción tridimensional y la determinación de la calidad de un embrión**

(30) Prioridad:

01.07.2014 US 201462019574 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.07.2020

(73) Titular/es:

INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE (INSERM) (33.3%)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris, FR;
UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER (33.3%) y
CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DE MONTPELLIER (33.3%)

(72) Inventor/es:

HAMAMAH, SAMIR y
SCALICI, ELODIE

(74) Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos para la reconstrucción tridimensional y la determinación de la calidad de un embrión

Sector de la técnica

La presente invención se refiere en general al campo de la medicina reproductiva. De manera más específica, la presente invención se refiere a métodos y dispositivos para determinar la calidad de un embrión.

Estado de la técnica

Actualmente, la selección de embriones para transferencia se basa en la evaluación de criterios morfológicos con microscopía óptica en Tecnología de Reproducción Asistida (TRA). Los parámetros implicados de forma clásica en la selección de embriones son: i) morfología y fertilización del ovocito que ha generado el embrión, ii) número y tamaño de los blastómeros, iii) apariencia citoplasmática de los blastómeros, iv) tasa de fragmentación y v) presencia de multinucleación. Este enfoque morfológico se basa exclusivamente en observaciones subjetivas de la morfología del embrión, operario dependiente y muestra limitaciones para predecir una gestación exitosa en la TRA (Guerif et al., 2007). De hecho, actualmente, el 85% de los embriones obtenidos *in vitro* y seleccionados para reemplazo según criterios morfológicos conducen a fracasos de implantación. Este resultado es completamente decepcionante y sugiere que la visualización limitada en 2D de ovocitos y embriones humanos con microscopía óptica carece de precisión. Por lo tanto, existe una necesidad probada en la TRA para mejorar la observación de ovocitos y embriones humanos durante su desarrollo preimplantatorio temprano y posteriormente aumentar el éxito de la TRA.

Recientemente, se ha desarrollado un nuevo método basado en imágenes a intervalos de tiempo para la adquisición de datos morfocinéticos de los embriones para ayudar a dicha selección (Meseguer et al., 2011; Herrero y Meseguer, 2013). No obstante, los sistemas de intervalos de tiempo no mejoran la evaluación de la morfología de los embriones en comparación con la microscopía óptica, ya que los embriones comprendidos en pocillos individuales se observan solo en 7 planos focales. De hecho, una limitación importante de estos sistemas es la incapacidad de rotar o rodar ovocitos y embriones esféricos, lo que dificulta la evaluación de la morfología, especialmente en el caso de una alta tasa de fragmentación o etapa de blastocisto. Así mismo, las imágenes de compra normales requieren un embrión ligero. Incluso si la luz es relativamente corta en estos sistemas, se debe preferir un tiempo de exposición lo más corto posible asociado con una longitud de onda los más larga posible.

El uso de tecnologías 3D representa una forma innovadora y atractiva en TRA para desarrollar nuevas herramientas valiosas para estudiar los ovocitos y los embriones tempranos humanos y, posteriormente, para comprender mejor los fracasos de TRA en la práctica diaria. De hecho, parece muy difícil analizar en detalle una estructura biológica esférica, tal como el ovocito y el embrión humano, solo en planos 2D. Las limitaciones de la microscopía óptica obligan a los presentes inventores a limitarse en la observación de ovocitos y embriones humanos y los métodos de imágenes 3D podrían permitir una evaluación morfológica sofisticada como en el modelo de ratones (Nieman et al., 2011). Se podrían estudiar otros numerosos parámetros morfológicos con tecnologías 3D como la posición de pronúcleos 3D en el ovocito, distribución de la fragmentación 3D, eje de escisión de blastómeros 3D o distribución de células 3D en el embrión. El objetivo principal de la mejora de la observación de ovocitos y embriones humanos mediante tecnologías 3D es mejorar el éxito de TRA.

En los últimos años, las reconstrucciones 3D de embriones de ratón requirieron disecciones para obtener una serie de secciones histológicas y fijas para estudiar la organización anatómica del embrión y caracterizar los fenotipos morfológicos del ratón (Kaufman et al., 1997; Wong et al., 2012; Wong et al., 2014). Hoy en día, uno de los desafíos de la obtención de imágenes ópticas es observar en 3D las estructuras biológicas y los organismos en condiciones compatibles para la búsqueda de su desarrollo. Por lo tanto, recientemente, Se han desarrollado nuevas tecnologías en el campo de la obtención de imágenes ópticas, para realizar secciones de embriones viables en algunas especies y para permitir una reconstrucción 3D no invasiva de estos embriones.

Entre estos nuevos sistemas de obtención de imágenes ópticas, la tomografía de coherencia óptica (TCO) es una técnica emergente no invasiva para medios biológicos con resolución a escala micrométrica utilizada principalmente en oftalmología. Recientemente, un equipo de investigación propuso un enfoque nuevo y original de TCO llamado TCO de campo completo y se basa en la microscopía de interferencia con luz blanca. La TCO de campo completo permite obtener imágenes tomográficas mediante la combinación de imágenes interferométricas grabadas por un conjunto de detectores, como una cámara CCD. En comparación con la TCO convencional, la TCO de campo completo adquiere imágenes tomográficas en orientación transversal con resolución ultra alta (~ 1 µm) utilizando una lámpara halógena simple. De manera interesante, la realización de esta tecnología se ha utilizado en embriología y biología del desarrollo para la obtención de imágenes 3D de muestras ex vivo. De hecho, las reconstrucciones 3D del embrión de ratones se realizan fácilmente con la misma resolución que en el método histológico convencional. Así mismo, las adquisiciones de imágenes son rápidas y no necesitan preparación de muestras y disección en secciones delgadas después de la fijación en comparación con las secciones histológicas.

La microscopía de lámina de luz que incluye Microscopía de Iluminación Selectiva de Planos (SPIM, por sus siglas en inglés), también es una nueva técnica en la que el plano iluminado de una muestra es el único del que se obtiene imagen, asociado con una eliminación virtual de la señal de fondo y una reducción drástica de la cantidad de luz necesaria para explorar la muestra. De hecho, esta técnica reduce los efectos fototóxicos en muestras vivas y permite ver estructuras biológicas en 3D, en vivo y en tiempo real, sin efectos nocivos y dañinos sobre ellas (Huisken et al., 2004, Huisken, 2012). Este concepto se basa en iluminar la muestra solo con finas láminas de luz en un plano focal, y la decoloración fotográfica se reduce al mínimo. Por lo tanto, la microscopía de lámina de luz constituye una herramienta ideal para la obtención de imágenes no destructivas de muestras frágiles o viables. Con respecto a las aplicaciones en embriología y biología del desarrollo, la microscopía de lámina de luz (incluida SPIM) parece ser una herramienta atractiva para obtener imágenes de embriones 3D a alta resolución con alta velocidad de adquisición, mientras que es mínimamente invasiva. El embrión 3D del pez cebra temprano y el desarrollo embrionario 3D de las reconstrucciones de *Drosophila melanogaster* ilustran el potencial de la técnica SPIM en biología del desarrollo (Huisken et al., 2004; Keller et al., 2008; Huisken y Stainier, 2009; Weber y Huisken, 2011; Kaufmann et al., 2012; Krzic et al., 2012, Huisken, 2012).

Por lo tanto, la microscopía óptica permite realizar reconstrucciones 3D e imprimir embriones de ratones o humanos desde varios planos focales. Así mismo, la TCO y la microscopía de lámina de luz (incluida SPIM) representan las mejores innovaciones atractivas para desarrollar adquisiciones de imágenes no invasivas de ovocitos y embriones humanos para reconstrucciones e impresiones 3D. Las aplicaciones de estos nuevos métodos de obtención de imágenes ópticas aún no se han probado en embriología humana para una observación sofisticada de ovocitos esféricos y embriones obtenidos *in vitro.*

Asimismo, varios equipos de investigación han propuesto un libro atlas que contiene reconstrucciones de embriones de ratón 3D utilizando obtención de imágenes por resonancia magnética, pero la mayoría de las veces, no estudiaron embriones en las primeras etapas. El uso de la obtención de imágenes por micro resonancia magnética (μMRI, por sus siglas en inglés) para la reconstrucción 3D de embriones y ovocitos humanos también podría ser una forma atractiva para la evaluación de la morfología de ovocitos y embriones, pero hoy en día, la resolución espacial de la imagen no es suficiente incluso en un campo alto (incluso a 9.4T).

Recientemente, la aparición de la impresión 3D y su aplicación se han expandido en la medicina humana (Rengier et al., 2010; Hespel et al., 2014). De hecho, estos avances tecnológicos recientes permiten crear estructuras complejas tales como tejido de cartílago humano, válvulas cardíacas, modelos óseos o implantes de craneoplastia utilizando una impresora 3D (Kim et al., 2012; Visser et al., 2013; Cui et al., 2014; Nakayama et al., 2014; Unger et al., 2014. Hochman et al., 2014; Tan et al., 2014). Al igual que en la cirugía, un estudio reciente indicó la reproducción de embriones de pez cebra y modelos de larvas utilizando una impresora 3D (Masselink et al., 2014). Por lo tanto, la impresión 3D de ovocitos y embriones humanos podría permitir la creación de varios modelos de una naturaleza más realista, que representan el desarrollo real de ovocitos y embriones. Así mismo, estos modelos de ovocitos y embriones humanos pueden representar herramientas informativas, de capacitación pedagógica y de actualización para el personal de embriólogos, pacientes y estudiantes.

Objeto de la invención

La invención se define mediante las reivindicaciones.

La presente invención se refiere en general al campo de la medicina reproductiva. De manera más específica, la presente invención se refiere a métodos y dispositivos para determinar la calidad de un embrión. De manera más específica, la presente invención se refiere al uso de reconstrucciones tridimensionales para determinar la calidad de un embrión.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a los métodos que permiten la reconstrucción 3D y la impresión 3D de ovocitos y embriones humanos a partir de secciones de imágenes en serie para mejorar la evaluación de la morfología en diferentes etapas de su desarrollo *in vitro*. Los presentes inventores demuestran que la reconstrucción 3D y la impresión 3D representan innovaciones no invasivas en TRA para ayudar a la mejor selección de embriones. Así mismo, los presentes inventores demuestran que las reconstrucciones e impresiones 3D de embriones humanos o de ratón pueden realizarse a partir de secciones microscópicas ópticas convencionales. Las nuevas tecnologías 3D tal como la TCO o la microscopía de lámina de luz (SPIM, por ejemplo) podrían permitir la adquisición de imágenes no invasivas con mejor calidad para reconstrucciones 3D de ovocitos y embriones humanos viables. Las obtención de Imágenes por Micro Resonancia Magnética de alta resolución espacial también representan una forma atractiva de examinar la morfología de los ovocitos y embriones humanos. El uso de tecnologías 3D para la selección de embriones conduce a un aumento del éxito de TRA y representa al mismo tiempo un enfoque pedagógico para la formación técnica y en medicina y una herramienta informativa para pacientes sometidos a un procedimiento de TRA.

En consecuencia, la presente invención se refiere a un método no invasivo *in vitro* para determinar la calidad de un

embrión que comprende las etapas de:

i) proporcionar secciones de imágenes en serie de dicho embrión, obteniéndose dichas secciones de imágenes en serie por Tomografía de Coherencia Óptica (TCO), por Obtención de Imágenes por Micro Resonancia Magnética (μMPvI) o por microscopía óptica convencional o por microscopía de lámina de luz tal como Microscopía de Iluminación Selectiva de Planos (SPIM);
ii) realizar la reconstrucción tridimensional de dicho embrión, y
iii) determinar la morfología del embrión, la distribución de la fragmentación, eje de escisión de los blastómeros y/o la distribución de células en dicha reconstrucción tridimensional.

La presente divulgación se refiere a un método no invasivo *in vitro* para determinar la calidad de un ovocito que comprende las etapas de:

i) proporcionar secciones de imágenes en serie de dicho ovocito,
ii) realizar una reconstrucción tridimensional de dicho ovocito, y
iii) determinar la posición del pronúcleo en el ovocito en dicha reconstrucción tridimensional.

En una realización, la presente invención se refiere al método no invasivo *in vitro* para determinar la calidad de un embrión o un ovocito de la invención en donde el paso iii) se realiza utilizando herramientas informáticas de segmentación automática.

Como se usa en el presente documento,el término "embrión" tiene su significado general en la técnica y se refiere a un ovocito fertilizado o cigoto. El término "embrión" también se refiere a las células en todas las etapas de desarrollo desde un ovocito fertilizado o cigoto hasta los 5 o 6 días (etapa de blastocisto). Dicha fertilización puede surgir en condiciones clásicas de fertilización *in vitro* (FIVc) o en un procedimiento de inyección intracitoplasmática de espermatozoides (IICE). Ejemplos de embriones que pueden evaluarse mediante los métodos de la invención incluyen embriones de 1 célula (también denominados cigotos), embriones de 2 células, embriones de 3 células, embriones de 4 células, embriones de 5 células, embriones de 6 células, embriones de 8 células, etc. generalmente hasta e incluyendo embriones de 16 células, cualquiera de los cuales puede derivar de cualquier manera conveniente, p.ej., de un ovocito que ha madurado *in vivo* o de un ovocito que ha madurado *in vitro.* Como se usa en el presente documento, el término "blastocisto" se refiere a la estructura formada en la embriogénesis temprana de los mamíferos, después de la formación de la mórula. Posee una masa celular interna (MCI), o embrioblasto, que posteriormente forma el embrión, y una capa externa de células, o trofoblasto, que después forma la placenta. El trofoblasto rodea la masa celular interna y una cavidad del blastocisto llena de líquido conocida como blastocele. El blastocisto humano comprende 70-100 células. La formación del blastocisto comienza el día 5/6 después de la fertilización en seres humanos.

De acuerdo con la invención, el ovocito puede ser el resultado de un ciclo natural, un ciclo natural modificado o un ciclo estimulado para FIVc o IICE. La expresión "ciclo natural" se refiere al ciclo natural por el cual la hembra o mujer produce un ovocito. La expresión "ciclo natural modificado" se refiere al proceso por el cual, la hembra o mujer produce un ovocito o dos bajo una estimulación ovárica leve con antagonistas de GnRH asociados con FSH o hMG recombinantes. La expresión "ciclo estimulado" se refiere al proceso por el cual una hembra o una mujer produce uno o más ovocitos bajo estimulación con agonistas o antagonistas de GnRH asociados con FSH o hMG recombinante.

La expresión "fertilización *in vitro* clásica" o "FIVc" se refiere a un proceso mediante el cual los ovocitos son fertilizados por espermatozoides fuera del cuerpo, *in vitro*. La FIV es un tratamiento importante en la infertilidad cuando ha fallado la concepción *in vivo*. La expresión "inyección intracitoplasmática de espermatozoides" o "IICE" se refiere a un procedimiento de fertilización *in vitro* en el que se inyecta un único espermatozoide directamente en un ovocito. Este procedimiento se usa más comúnmente para superar los factores de infertilidad masculina, aunque también se puede usar cuando los ovocitos no pueden penetrarse fácilmente por los espermatozoides, y ocasionalmente como un método de fertilización *in vitro*, especialmente el asociado con la donación de esperma.

Por "determinar la calidad de un ovocito o un embrión" se entiende que el método de la invención tiene como objetivo determinar si un ovocito o un embrión es competente en el contexto de la fertilización *in vitro.* El método de la invención permite la evaluación de la capacidad de un ovocito o un embrión para desarrollarse con éxito en cualquiera de los dos o en términos de conferir una alta tasa de gestación y/o dar como resultado una persona sana. En consecuencia, el método de la invención permite la selección del embrión con baja tasa de fragmentación que puede dar lugar a la gestación.

La expresión "ovocito competente" se refiere a un gameto u óvulo femenino que cuando se fertiliza produce un embrión viable con una alta tasa de implantación que conduce a la gestación.

La expresión "embrión competente" se refiere a un embrión con una alta tasa de implantación que conduce a la gestación. La expresión "alta tasa de implantación" significa la posibilidad del embrión cuando se transfiere al útero, de implantarse en el entorno uterino y dar lugar a un feto viable, que a su vez se convierte en una descendencia

viable ausente de un procedimiento o evento que termine dicha gestación.

El método de la invención es aplicable preferentemente a mujeres pero puede ser aplicable a otros mamíferos (p. ej., primates, perros, gatos, cerdos, vacas, ratones...).

El término "reconstrucción tridimensional" tiene su significado general en la técnica y se refiere a la reconstitución del ovocito o el embrión en tres dimensiones.

Se pueden obtener secciones de imágenes en serie utilizando el método descrito en el ejemplo. El suministro de secciones de imágenes en serie se realiza por microscopía óptica convencional o por microscopía de lámina de luz (por ejemplo, Microscopía de Iluminación Selectiva de Planos (SPIM)) o por Tomografía de Coherencia Óptica (TCO) o por obtención de imágenes por Micro Resonancia Magnética (μMRI).

El experto en la materia puede usar cualquier método bien conocido en la técnica para realizar la reconstrucción 3D. Por ejemplo, se puede utilizar el método descrito en el ejemplo. La reconstrucción 3D a partir de secciones de imágenes se puede realizar utilizando un programa informático capaz de importar pilas de imágenes procedentes de las diferentes modalidades de obtención de imágenes (microscopía clásica, microscopía de lámina de luz (por ejemplo, SPIM), TCO, micro-MRI). Este programa informático puede realizar Reconstrucciones Multiplanares (RMP), Representación de Volumen (RV), segmentación de los objetos de interés (segmentación manual o segmentación informática semiautomática o automática), identificación automática de blastómeros y fragmentos con medidas volumétricas, extracción de superficies 3D y exportación para impresión 3D.

En una realización particular, el método de la invención comprende las siguientes etapas:

i) determinar la morfología del embrión, la distribución de la fragmentación, el eje de escisión de blastómeros y/o la distribución de células en dicha reconstrucción 3D,
ii) comparar la morfología del embrión, la distribución de la fragmentación, el eje de escisión de blastómeros y/o la distribución de células en dicha reconstrucción 3D determinados en la etapa i) con un control, y
iii) concluir que el embrión es competente cuando la morfología del embrión, la distribución de la fragmentación, el eje de escisión de los blastómeros y/o la distribución de células en dicha reconstrucción 3D determinados en la etapa i) son idénticos a los mismos criterios en el embrión competente, y concluir que el embrión es no competente cuando la morfología del embrión, la distribución de la fragmentación, el eje de escisión de blastómeros y/o la distribución de células en dicha reconstrucción 3D determinados en la etapa i) son idénticos al mismo criterio en el embrión no competente.

En una realización, el control es un embrión competente. En otra realización, el control es un embrión no competente.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método no invasivo *in vitro* para determinar la calidad de un embrión que comprende las etapas de:

i) proporcionar secciones de imágenes en serie de dicho embrión,
ii) realizar la reconstrucción tridimensional de dicho embrión, y
iii) determinar la morfología del embrión mediante la determinación del número de blastómeros, la regularidad de los blastómeros y la tasa de fragmentación,
iv) y concluir que el embrión es competente si tiene de 6 a 8 blastómeros, blastómeros de tamaño regular y baja tasa de fragmentación (igual o inferior al 25 %) y concluir que el embrión es no competente si tiene menos blastómeros (<6 células en el día 3), blastómeros de tamaño irregular y alta tasa de fragmentación (más del 25 %).

El método de la invención es particularmente adecuado para alcanzar una decisión clínica. Como se usa en el presente documento, la expresión "decisión clínica" se refiere a cualquier decisión a tomar o no una acción que tenga un resultado que afecte la salud o la supervivencia del embrión. En particular, en el contexto de la invención, una decisión clínica se refiere a una decisión de implantar o no el embrión en el útero de la paciente. En particular, el método descrito anteriormente ayudará a los embriólogos a evitar la transferencia en el útero de embriones con escasa posibilidad de dar el resultado de la gestación. El método descrito anteriormente también es particularmente adecuado para evitar gestaciones múltiples seleccionando el ovocito competente y el embrión competente capaces de conducir a una implantación y una gestación y, por lo tanto, se podrían transferir menos embriones en cada ciclo, lo que da como resultado una menor incidencia de gestaciones múltiples.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un método para seleccionar el embrión más competente para la implantación que comprende las etapas que consisten en i) proporcionar una pluralidad de embriones, ii) determinar la calidad del embrión mediante la realización del método de acuerdo con la invención, y iii) seleccionar la mayoría embrión competente.

La divulgación se refiere a un método de implantación de un embrión competente en una paciente sometida a

fertilización *in vitro,* que comprende las etapas de:

a) recoger ovocitos de dicha paciente;
b) generar embriones de dichos ovocitos mediante la fertilización de dichos ovocitos *in vitro*;
c) determinar la calidad del embrión mediante la realización del método de acuerdo con la invención; y
d) implantar dicho embrión con una mayor probabilidad de ser competente en dicha paciente.

La presente divulgación también se refiere a un dispositivo para implementar el método de la invención que comprende

- medios para proporcionar secciones de imágenes en serie de la etapa i),
- medios para realizar la construcción tridimensional de al etapa ii), y
- medios para determinar la posición del pronúcleo en el ovocito, la morfología del embrión, la distribución de la fragmentación, el eje de escisión de blastómeros y/o distribución de células en dicha reconstrucción tridimensional determinados en la etapa i).

La presente divulgación también se refiere a un método para producir o imprimir un ovocito o un embrión que comprende las etapas de:

i) proporcionar secciones de imágenes en serie de dicho ovocito o embrión,
ii) realizar una reconstrucción tridimensional de dicho ovocito o embrión,
iii) determinar la posición del pronúcleo en el ovocito, determinar la morfología del embrión, la distribución de la fragmentación, el eje de escisión de blastómeros y/o distribución de células en dicha reconstrucción tridimensional y
iv) impresión tridimensional de dicho ovocito o dicho embrión.

La presente divulgación también se refiere a un ovocito o embrión producido artificialmente o impreso en tres dimensiones realizado por el método de acuerdo con la invención.

El experto en la materia puede usar cualquier método bien conocido en la técnica para realizar la impresión tridimensional. Por ejemplo, se puede utilizar el método descrito en el ejemplo.

La invención se ilustrará adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos y figuras no deben interpretarse de ninguna manera como limitantes del alcance de la presente invención.

Descripción de las figuras

Figura 1: Reconstrucción y visualización 3D de embriones de ratón a partir de secciones de imágenes histológicas fijadas de microscopía óptica.

Figura 2: Reconstrucción y visualización 3D no invasiva de embriones humanos viables a partir de la sección de imágenes de microscopía óptica en laboratorio de FIV.

Figura 3: Una reconstrucción 3D no invasiva de embriones humanos viables en el día 3 realizada a partir de 20 planos de sección de microscopía óptica convencional en laboratorio de FIV.

Figura 4: Ejemplo de un microscopio usando una lámina similar basada en SPIM.

Figure 5: Reconstrucción e impresión 3D de embriones humanos.

Figura 6: A. Limitaciones de la observación convencional de embriones por microscopía óptica y la insuficiencia de la observación morfológica para predecir las tasas de implantación y gestación. **B.** Microscopía óptica y reconstrucción e impresión 3D. **C.** Dos métodos de microscopía óptica, tomografía de coherencia óptica (TCO) y microscopía de lámina de luz, incluida la Microscopía de Iluminación Selectiva de Planos (SPIM). **D.** Un sistema óptico adaptado en microscopía convencional para FIV. E. Los intereses biológicos de usar embryoscan.

Descripción detallada de la invención

Ejemplo 1:

EMBRYOSCAN.

La presente invención se refiere a los métodos para la reconstrucción tridimensional (3D) y la impresión 3D de ovocitos y embriones humanos. De manera más precisa, se refiere al uso de tecnologías 3D como herramientas nuevas e innovadoras para mejorar la evaluación de la morfología de los ovocitos y embriones durante su desarrollo preimplantatorio *in vitro*.

La presente invención se basa en la reconstrucción 3D y la impresión 3D de ovocitos y embriones humanos. Estas tecnologías 3D se pueden utilizar para evaluar la morfología del embrión y mejorar la selección de embriones para aumentar el éxito de TRA. Así mismo, las tecnologías 3D representan una herramienta informativa para la capacitación, actualización del personal de embriólogos y para pacientes sometidos a un procedimiento de TAR.

Esta invención comprende las etapas que consisten en:

i) Proporcionar secciones de imágenes en serie de ovocitos y embriones humanos por microscopía óptica convencional o por microscopía de lámina de luz (por ejemplo, SPIM) o por Tomografía de Coherencia Óptica (TCO) o por obtención de Imágenes por Micro Resonancia Magnética (μMRI).
ii) Realizar la reconstrucción 3D de ovocitos y embriones humanos a partir de secciones de imágenes utilizando un programa informático capaz de importar pilas de imágenes procedentes de las diferentes modalidades de obtención de imágenes (microscopía clásica, microscopía de lámina de luz (por ejemplo, SPIM), TCO, micro-MRI). Este programa informático puede realizar Reconstrucciones Multiplanares (RMP), Representación de Volumen (RV), segmentación de objetos de interés, (segmentación manual o segmentación informática semiautomática o automática), identificación automática de blastómeros y fragmentos con medidas volumétricas, extracción de superficies 3D y exportación para impresión 3D.
iii) Analizar la morfología de ovocitos y embriones en reconstrucciones 3D.
iiii) Realizar impresión 3D a partir de reconstrucciones 3D de embriones y ovocitos humanos.
iiiii) Usar los modelos impresos 3D para información, capacitación y formación en medicina.

Reconstrucción y visualización 3D de embriones de ratón a partir de secciones de imágenes histológicas fijadas de microscopía óptica. Usando una pila de 57 imágenes TIFF obtenidas en microscopía óptica clásica de un embrión de ratón (TS7), es posible realizar Reconstrucciones Multiplanares (RMP) y Representación de Volumen 3D. La representación de Volumen es una técnica de visualización 3D bien conocida en radiología para enfatizar los resultados de la TC y la IRM. La Representación de Volumen se puede aplicar en otras muestras de imágenes que no sean DICOM (incluidas imágenes TIFF o JPEG) para tener información 3D de la muestra (la transparencia se puede modificar para ver mejor los núcleos, por ejemplo) (Figura 1).

Reconstrucción y visualización 3D no invasiva de embriones humanos viables a partir de la sección de imágenes de microscopía óptica en laboratorio de FIV (Figura 2).

Se realizó una reconstrucción 3D no invasiva de embriones humanos viables en el día 3 a partir de 20 planos de sección de microscopía óptica convencional en laboratorio de FIV. Modificando el enfoque, es posible obtener una pila de imágenes que pueden importarse en un programa informático de visualización 3D para realizar Reconstrucciones Multiplanares y Representación de volumen (Figura 3).

Los presentes inventores también realizaron:

Modelo impreso 3D obtenido de la reconstrucción 3D de un embrión humano viable.
Reconstrucción e impresión 3D de ovocitos y embriones humanos: herramientas pedagógicas e informativas para la capacitación técnica y la formación en laboratorio.
Reconstrucción e impresión 3D de ovocitos y embriones humanos: herramientas informativas para pacientes sometidos a programa de FIV.
Modelos de impresión 3D de ovocitos y embriones humanos y mercado de derivados.
Creación de una base de datos web con reconstrucciones 3D de embriones y ovocitos humanos.

La reconstrucción e impresión 3D de embriones humanos se ilustra en la figura 5A-I.

Los presentes inventores muestran en la Figura 6A las limitaciones de la observación convencional de embriones por microscopía óptica y la insuficiencia de la observación morfológica para predecir las tasas de implantación y gestación. Los presentes inventores ilustran la microscopía óptica y la reconstrucción e impresión 3D en la Figura 6B, dos métodos microscópicos ópticos, tomografía de coherencia óptica (TCO) y microscopía de lámina de luz, incluida la Microscopía de Iluminación Selectiva de Plano (SPIM) en la Figura 6C, un sistema óptico adaptado en microscopía de FIV convencional, Figura 6D y los intereses biológicos de la invención (embryoscan) en la Figura 6E.

La invención presenta importantes impactos clínicos y económicos al mejorar:

La selección de embriones con una mejor evaluación morfológica
Las tasas de implantación y de gestación
La rentabilidad de la FIV

Conclusiones:

Las reconstrucciones 3D y la impresión 3D de ovocitos y embriones humanos representan nuevas tecnologías e

innovaciones para mejorar la evaluación de la morfología de ovocitos y embriones en TRA. Estas innovadoras tecnologías 3D podrían proporcionar una ayuda complementaria y valiosa para la selección de embriones viables con el fin de aumentar el éxito de TRA.

Ejemplo 2:

Ejemplo de un microscopio usando una lámina similar basada en SPIM. Un dispositivo óptico (1) produce una lámina de luz (2), iluminando un solo plano del objeto (4). Dos objetivos (3), colocados a 90 ° con relación al haz de la lámina de luz, están conectados a cámaras CCD. Un ordenador recibe las imágenes de las dos cámaras y dirige automáticamente los desplazamientos de la plataforma motorizada xyz (5) para hacer pilas de imágenes de los diferentes planos del embrión iluminados de manera alternativa por la SPIM. Las imágenes finalmente se envían a un programa informático de visualización: mezcla las imágenes de las dos cámaras y muestra el resultado en Reconstrucción Multiplanar (RMP) y 3D (VR) (Figura 4).

EJEMPLO DE REFERENCIA 3

Fertilización *in vitro*, clasificación de la calidad del embrión y resultados de FIV.

La ovulación se induce por una sola inyección de 250 µg de gonadotropina coriónica humana (Ovitrelle; Merck Serono). La recuperación de los ovocitos se realiza mediante aspiración transvaginal guiada por ultrasonido 36 horas después de la inyección y cada folículo preovulatorio se aspira individualmente sin enjuagar.

Los complejos de cúmulos-ovocitos se aíslan para procedimientos convencionales de FIV o IICE. Antes de la microinyección para IICE, la madurez de los ovocitos se evalúa después de la denudación. Los ovocitos se cultivan individualmente en un microgotas de 30 µl de medio de cultivo (Vitrolife) en aceite a 37 °C en CO_2 al 6 % y atmósfera húmeda. La fertilización normal se confirma por la presencia de dos pronúcleos y dos cuerpos polares de 18 a 20 horas después de la microinyección o inseminación. La escisión temprana se observa a las 25 o 27 horas después de la microinyección o inseminación, respectivamente.

Tres días después de la recuperación de los ovocitos, la calidad del embrión se clasifica de 1 a 4, de acuerdo con los siguientes criterios morfológicos: (a) número de blastómeros, b) regularidad de los blastómeros y (c) tasa de fragmentación (Tabla I). Se consideró un embrión de alta calidad (grado 1 y 2) si se observaban de 6 a 8 blastómeros de tamaño regular con menos del 25 % de fragmentación (embrión con baja tasa de fragmentación). Los embriones de alta calidad se transfirieron o congelaron en el día 3, mientras que los embriones de grado 3 y 4 se descartaron.

Cuatro semanas después de la transferencia, se confirma la gestación clínica por la presencia de al menos un saco gestacional y la visualización de la actividad del corazón embrionario en el examen de ultrasonido.

En consecuencia, el embrión de alta calidad o el embrión competente es un embrión de grado 1-2, con baja tasa de fragmentación (igual o inferior al 25 %) y que tiene de 6 a 8 blastómeros de tamaño regular.

En consecuencia, el embrión de baja calidad o el embrión competente es un embrión de grado 3-4, con alta tasa de fragmentación (más del 25 %) y con menos blastómeros (< 6 células en el día 3) de tamaño regular o irregular.

Tabla I: Clasificación de la calidad de los embriones en el día 3. La calidad del embrión se clasifica de 1 a 4 (1-2: embriones de alta calidad; 3-4: embriones de baja calidad) basándose en los siguientes criterios morfológicos (i) número de blastómeros, (ii) la regularidad de los blastómeros y (iii) la tasa de fragmentación.

Día 3	grado 1	grado 2	grado 3		grado 4
número de blastómeros regularidad de los blastómeros Tasa de fragmentación	6-8 células regular ≤ 10 %	6-8 células regular 10-25 %	6-8 células irregular 26-40 %	< 6 células o > 8 células regular o irregular < 40 %	- regular o irregular > 40 %

REFERENCIAS:

A lo largo de esta solicitud, diferentes referencias describen el estado de la técnica al que pertenece esta invención.

Cui X, Gao G, Yonezawa T, Dai G. Human Cartilage Tissue Fabrication Using Three-dimensional Inkjet Printing Technology. J Vis Exp. 2014.

Guerif F, Le Gouge A, Giraudeau B, Poindron J, Bidault R, Gasnier O, Royere D. Limited value of morphological assessment at days 1 and 2 to predict blastocyst development potential: a prospective study based on 4042 embryos. Hum Reprod. 2007 Jul;22:1973-81.

Herrero J, Meseguer M. Selection of high potential embryos using time-lapse imaging: the era of morphokinetics.

Fertil Steril. 2013 Mar 15;99:1030-4.
Hespel AM, Wilhite R, Hudson J. Invited review-applications for 3D printers in veterinary medicine. Vet Radiol Ultrasound. 2014.
Otolaryngol Head Neck Surg. 2014 Mar;150(3):448-54. doi: 10.1177/0194599813518008. Epub 2013 Dec 31.
Hochman JB, Kraut J, Kazmerik K, Unger BJ. Generation of a 3D printed temporal bone model with internal fidelity and validation of the mechanical construct. Otolaryngol Head Neck Surg. 2014;150:448-54.
Huisken J. Slicing embryos gently with laser light sheets. Bioessays. 2012;34:406-11.
Huisken J, Stainier DY. Selective plane illumination microscopy techniques in developmental biology. Development. 2009;136:1963-75.
Huisken J, Swoger J, Del Bene F, Wittbrodt J, Stelzer EH. Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy. Science. 2004;305:1007-9.
Kaufman MH, Brune RM, Baldock RA, Bard JBL, Davidson D. Computer-aided 3-D reconstruction of serially sectioned mouse embryos: its use in integrating anatomical organization. Int.J.Dev.Biol., 1997;41:223-233.
Kaufmann A, Mickoleit M, Weber M, Huisken J. Multilayer mounting enables longterm imaging of zebrafish development in a light sheet microscope. Development. 2012;139:3242-7.
Keller PJ, Schmidt AD, Wittbrodt J, Stelzer EH. Reconstruction of zebrafish early embryonic development by scanned light sheet microscopy. Science. 2008;322:1065-9.
Kim BJ, Hong KS, Park KJ, Park DH, Chung YG, Kang SH. Customized cranioplasty implants using three-dimensional printers and polymethyl-methacrylate casting. J Korean Neurosurg Soc. 2012;52:541-6.
Krzic U, Gunther S, Saunders TE, Streichan SJ, Hufhagel L. Multiview light-sheet microscope for rapid in toto imaging. Nat Methods. 2012;9:730-3.
Masselink W, Wong JC, Liu B, Fu J, Currie PD. Low-cost silicone imaging casts for zebrafish embryos and larvae. Zebrafish. 2014;11:26-31.
Meseguer M, Herrero J, Tejera A, Hilligsøe KM, Ramsing NB, Remohi J. The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. Hum Reprod. 2011;26:2658-71.
Nakayama Y, Takewa Y, Sumikura H, Yamanami M, Matsui Y, Oie T, Kishimoto Y, Arakawa M, Ohmuma K, Tajikawa T, Kanda K, Tatsumi E. In-body tissue-engineered aortic valve (Biovalve type VII) architecture based on 3D printer molding. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2014.
Nieman BJ, Wong MD, Henkelman RM. Genes into geometry: imaging for mouse development in 3D. Curr Opin Genet Dev. 2011;21:638-46.
Int J Comput Assist Radiol Surg. 2010 Jul;5(4):335-41. doi: 10.1007/s11548-010-0476-x. Epub 2010 May 15.
Rengier F, Mehndiratta A, von Tengg-Kobligk H, Zechmann CM, Unterhinninghofen R, Kauczor HU, Giesel FL. 3D printing based on imaging data: review of medical applications. Int J Comput Assist Radiol Surg. 2010;:335-41.
Tan Y, Richards DJ, Trusk TC, Visconti RP, Yost MJ, Kindy MS, Drake CJ, Argraves WS, Markwald RR, Mei Y. 3D printing facilitated scaffold-free tissue unit fabrication. Biofabrication. 2014;6:024111.
Unger BJ, Kraut J, Rhodes C, Hochman J. Design and Validation of 3D Printed Complex Bone Models with Internal Anatomic Fidelity for Surgical Training and Rehearsal. Stud Health Technol Inform. 2014.
Visser J, Melchels FP, Dhert WJ, Malda J. Tissue printing; the potential application of 3D printing in medicine. Ned Tijdschr Geneeskd. 2013;157:A7043.
Weber M, Huisken J. Light sheet microscopy for real-time developmental biology. Curr Opin Genet Dev. 2011;21:566-72.
Wong MD, Maezawa Y, Lerch JP, Henkelman RM. Automated pipeline for anatomical phenotyping of mouse embryos using micro-CT. Development. 2014;141:2533-41.
Wong MD, Dorr AE, Walls JR, Lerch JP, Henkelman RM. A novel 3D mouse embryo atlasbased on micro-CT. Development. 2012;139:3248-56.

REIVINDICACIONES

1. Un método no invasivo *in vitro* para determinar la calidad de un embrión que comprende las etapas de:

i) proporcionar secciones de imágenes en serie del embrión humano, obteniéndose dichas secciones de imágenes en serie por Tomografía de Coherencia Óptica (TCO), por Obtención de Imágenes por Micro Resonancia Magnética (μMPvI) o por microscopía óptica convencional o por microscopía de lámina de luz tal como Microscopía de Iluminación Selectiva de Planos (SPIM);
ii) realizar la reconstrucción tridimensional del embrión humano; y
iii) determinar la morfología del embrión, la distribución de la fragmentación, el eje de escisión de los blastómeros y/o la distribución de células en dicha reconstrucción tridimensional.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende las etapas de:

i) determinar la morfología del embrión, la distribución de la fragmentación, el eje de escisión de los blastómeros y/o la distribución de células en dicha reconstrucción tridimensional;
ii) comparar la morfología del embrión, la distribución de la fragmentación, el eje de escisión de los blastómeros y/o la distribución de células en dicha reconstrucción tridimensional determinados en la etapa i) con un control; y
iii) concluir que el embrión es competente cuando la morfología del embrión, la distribución de la fragmentación, el eje de escisión de los blastómeros y/o la distribución celular en dicha reconstrucción tridimensional determinados en la etapa i) son idénticos a los mismos criterios en el embrión competente, y concluir que el embrión es no competente cuando la morfología del embrión, la distribución de la fragmentación, el eje de escisión de blastómeros y/o la distribución celular en dicha reconstrucción tridimensional determinados en la etapa i) son idénticos a los mismos criterios en el embrión no competente de control.

3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 para determinar la calidad de un embrión que comprende las etapas de:

i) proporcionar secciones de imágenes en serie de dicho embrión, obteniéndose dichas secciones de imágenes en serie por Tomografía de Coherencia Óptica (TCO), por Obtención de Imágenes por Micro Resonancia Magnética (μMPvI) o por microscopía óptica convencional o por microscopía de lámina de luz tal como Microscopía de Iluminación Selectiva de Planos (SPIM);
ii) realizar la reconstrucción tridimensional de dicho embrión;
iii) determinar la morfología del embrión mediante la determinación del número de blastómeros, la regularidad de los blastómeros y la tasa de fragmentación; y
iv) y concluir que el embrión es competente si tiene de 6 a 8 blastómeros, blastómeros de tamaño regular y baja tasa de fragmentación (igual o inferior al 25 %) y concluir que el embrión es no competente si tiene menos blastómeros (<6 células en el día 3), blastómeros de tamaño irregular y alta tasa de fragmentación (más del 25 %).

4. Un método para seleccionar el embrión más competente para la implantación que comprende las etapas de i) determinar la calidad de una pluralidad de embriones proporcionados mediante la realización del método de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3, y ii) seleccionar el embrión más competente.

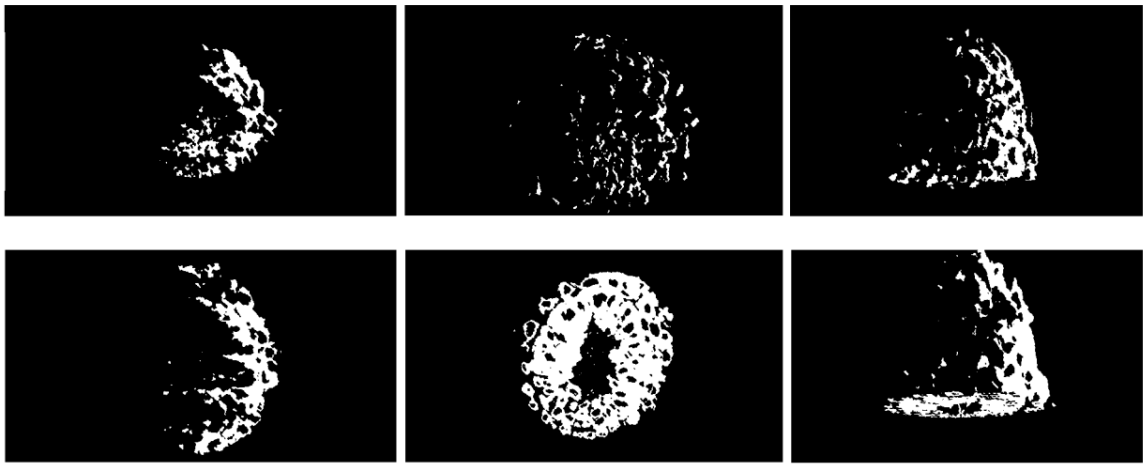


Figura 1

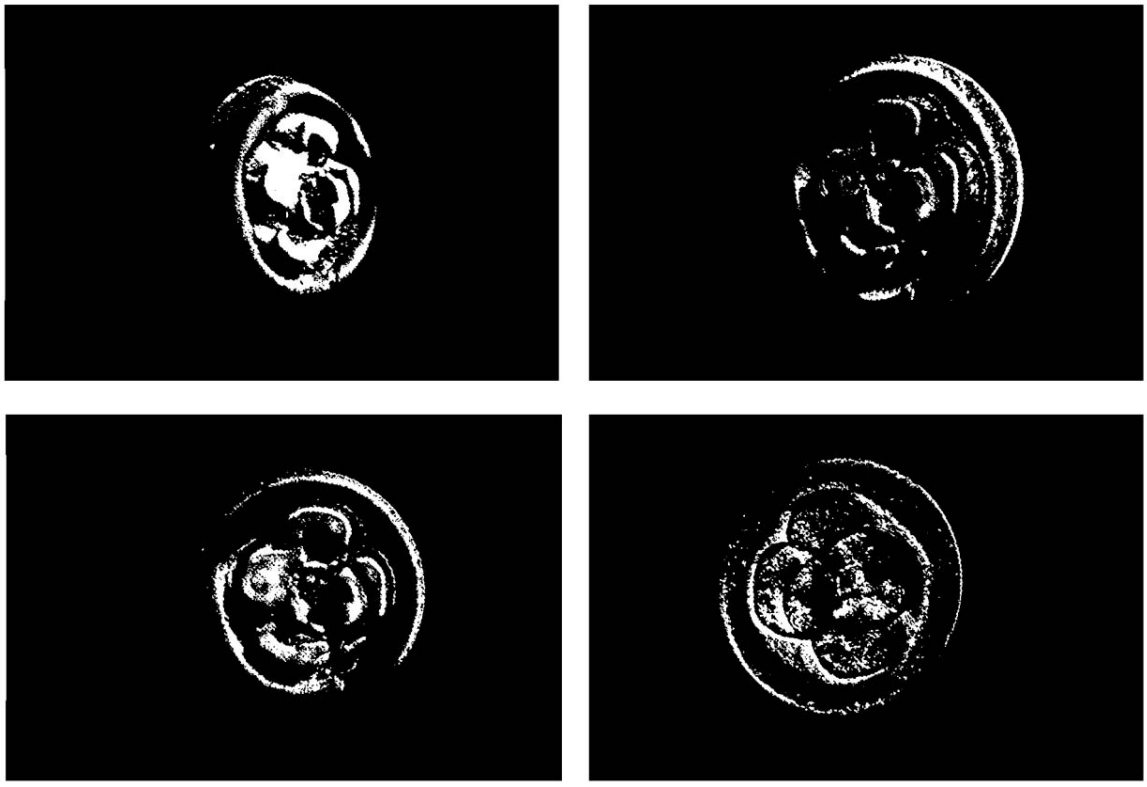


Figura 2

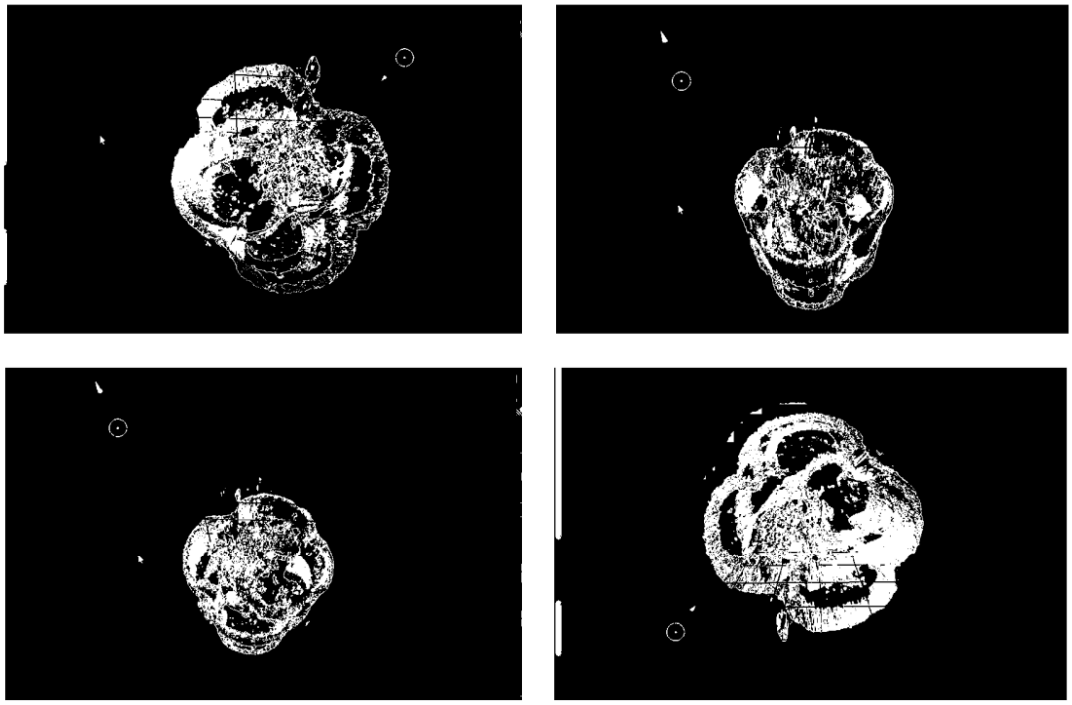


Figura 3

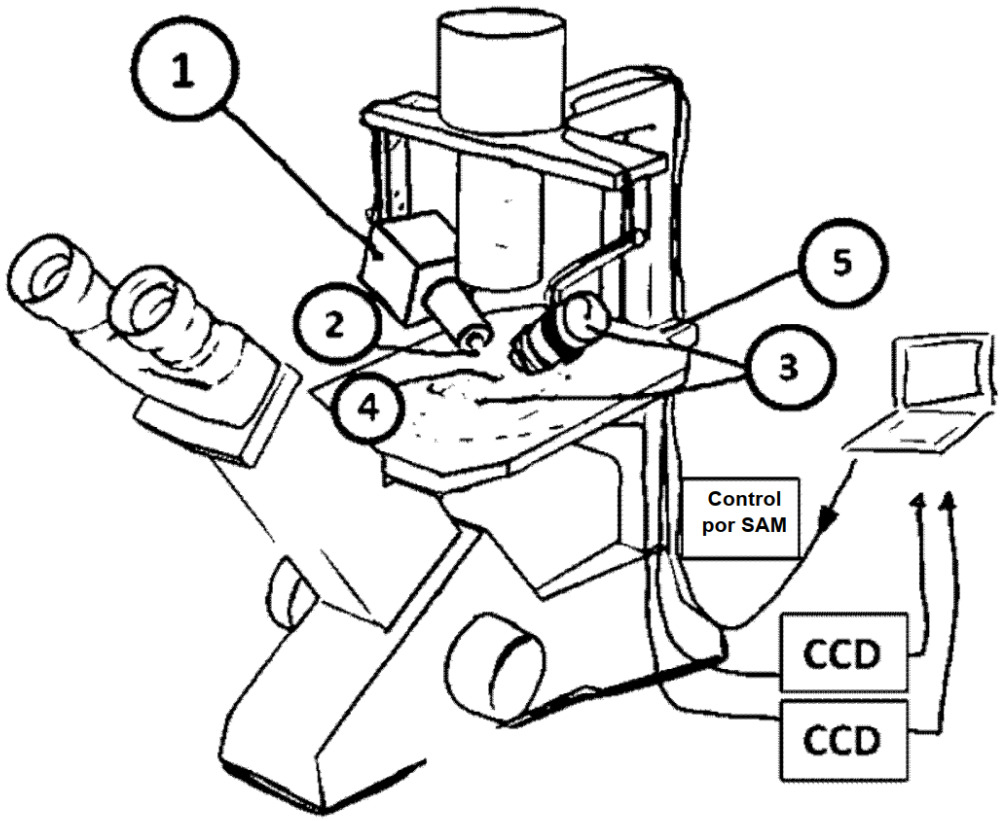
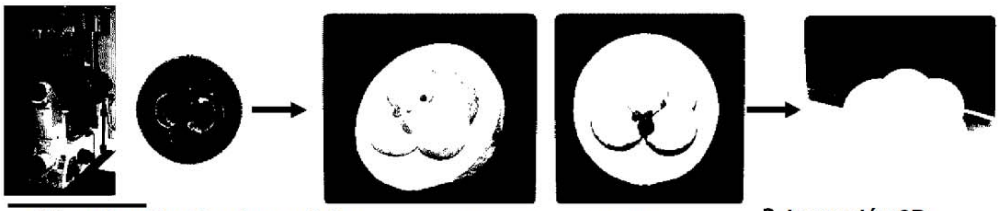


Figura 4



1. Visualización 2D microscópica: secciones de imagen de microscopía óptica

2. Reconstrucción 3D
Programa informático
para realizar reconstrucciones multiplanares y
representación 3D de volumen

3. Impresión 3D

Primer embrión humano « *ex vitro* »

- **Para mejorar la observación y la selección para la transferencia**
- **Fragmentación (%, topografía, medida volumétrica...)**
- **Eje de escisión**
- **Distribución 3D de las células...**

Figura 5A

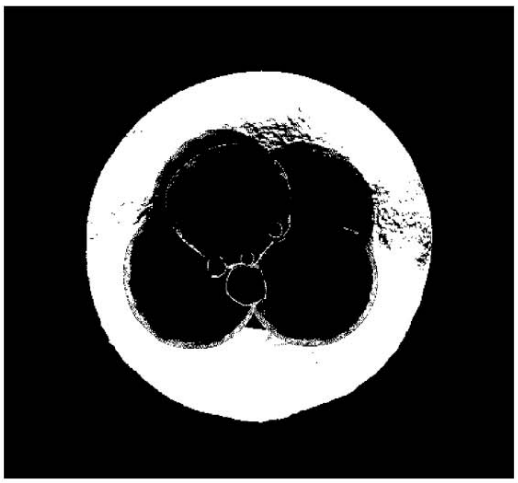


Figura 5B

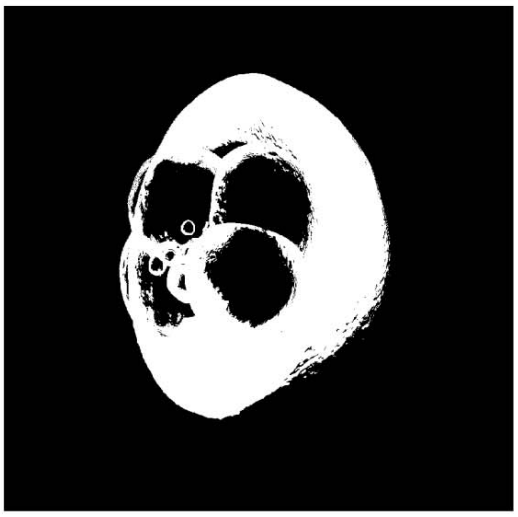


Figura 5C

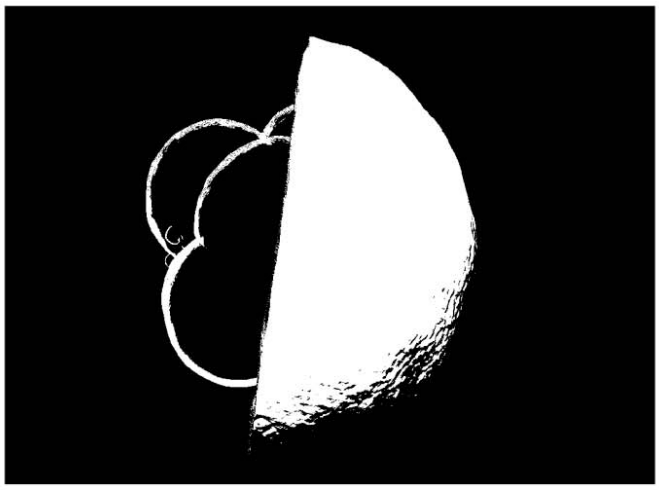


Figura 5D

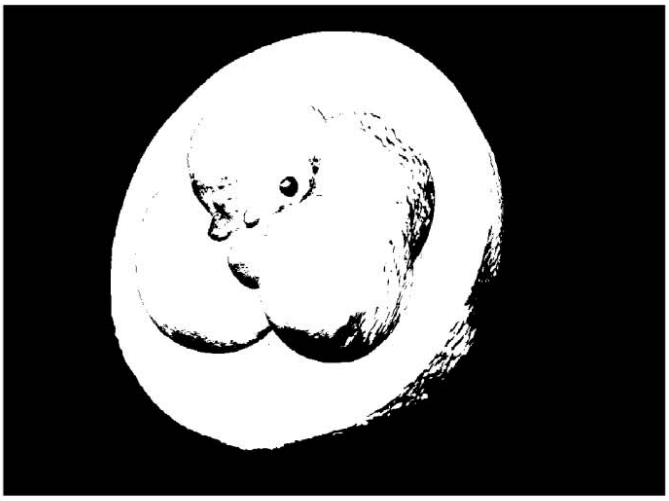


Figura 5E

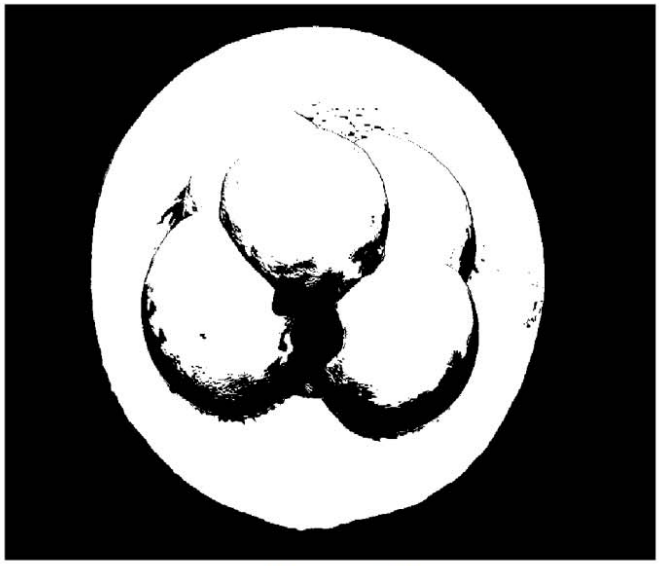


Figura 5F

Figura 5G

Figura 5H

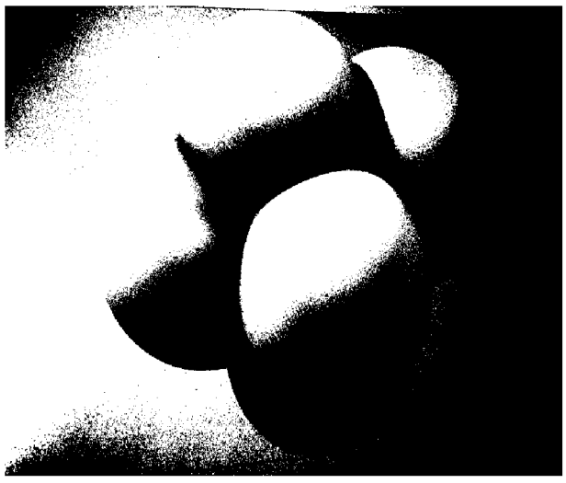


Figura 5I

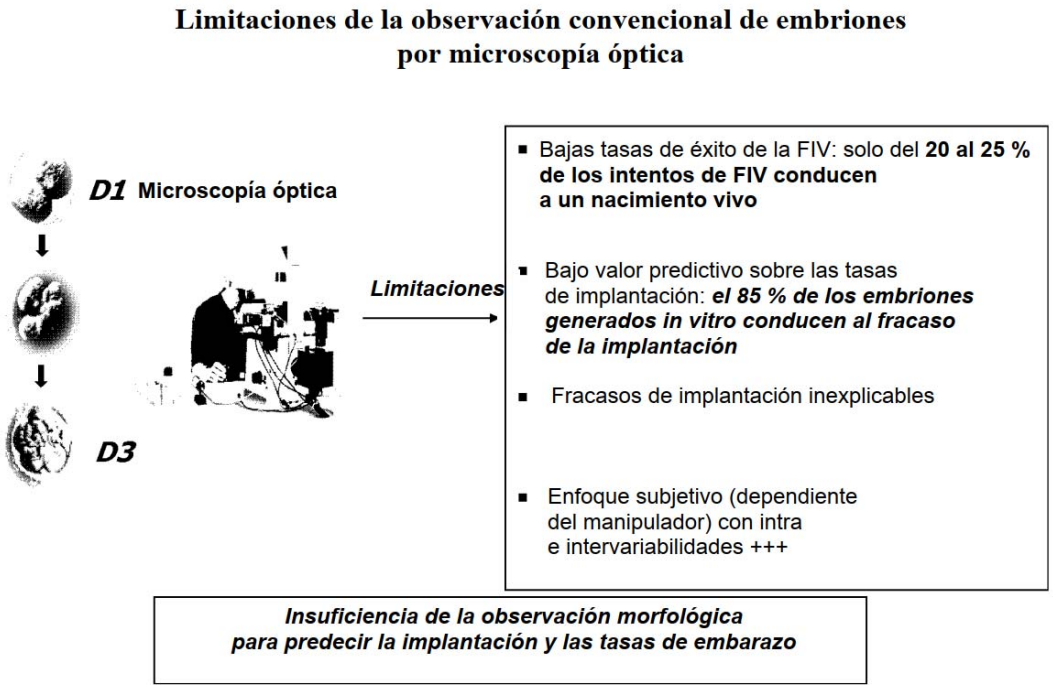


Figura 6A

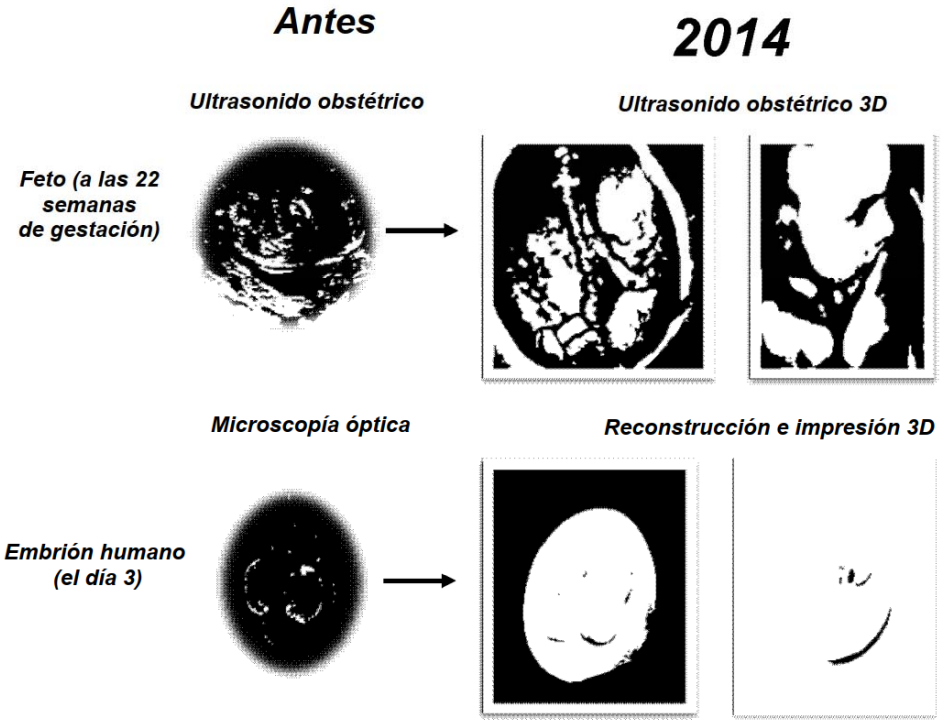


Figura 6B

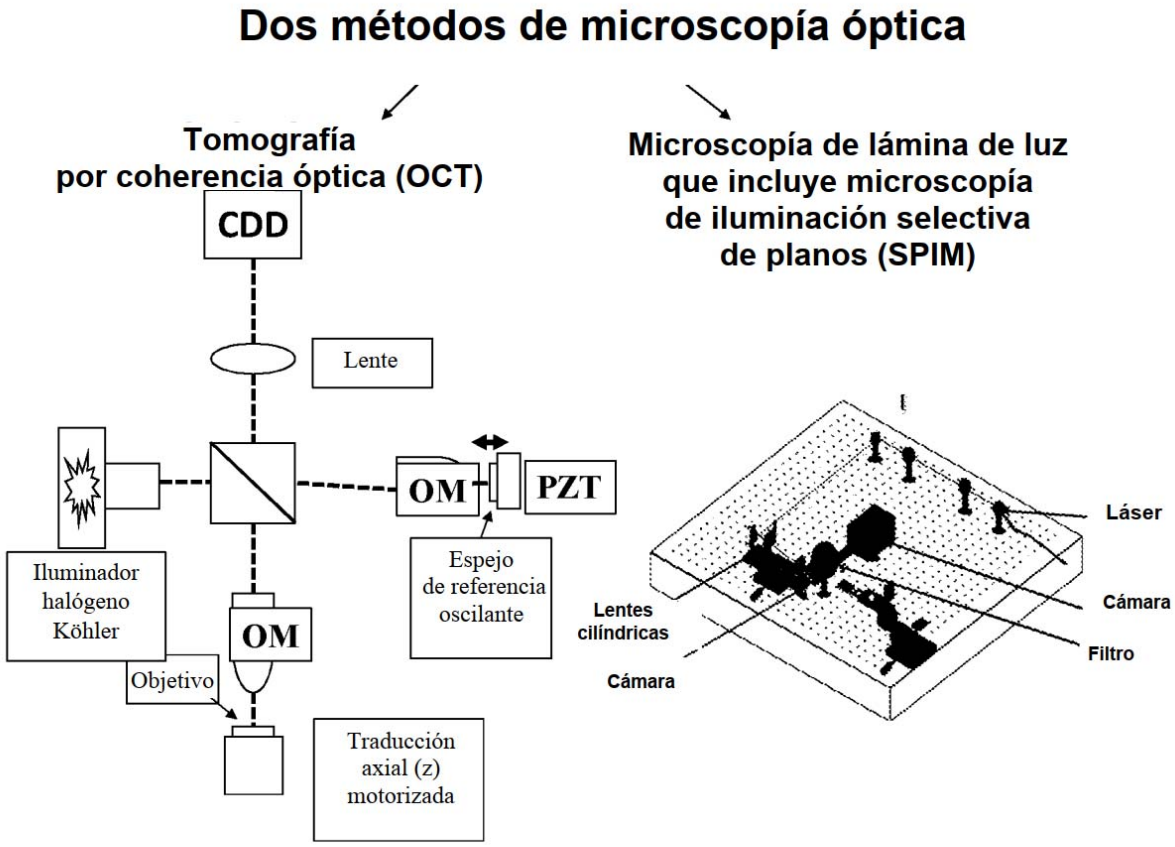

Dos métodos de microscopía óptica
Tomografía por coherencia óptica (OCT)
Microscopía de lámina de luz que incluye microscopía de iluminación selectiva de planos (SPIM)
CDD
Lente
OM
PZT
Iluminador halógeno Köhler
Espejo de referencia oscilante
OM
Objetivo
Traducción axial (z) motorizada
Láser
Cámara
Lentes cilíndricas
Filtro
Cámara

Figura 6C

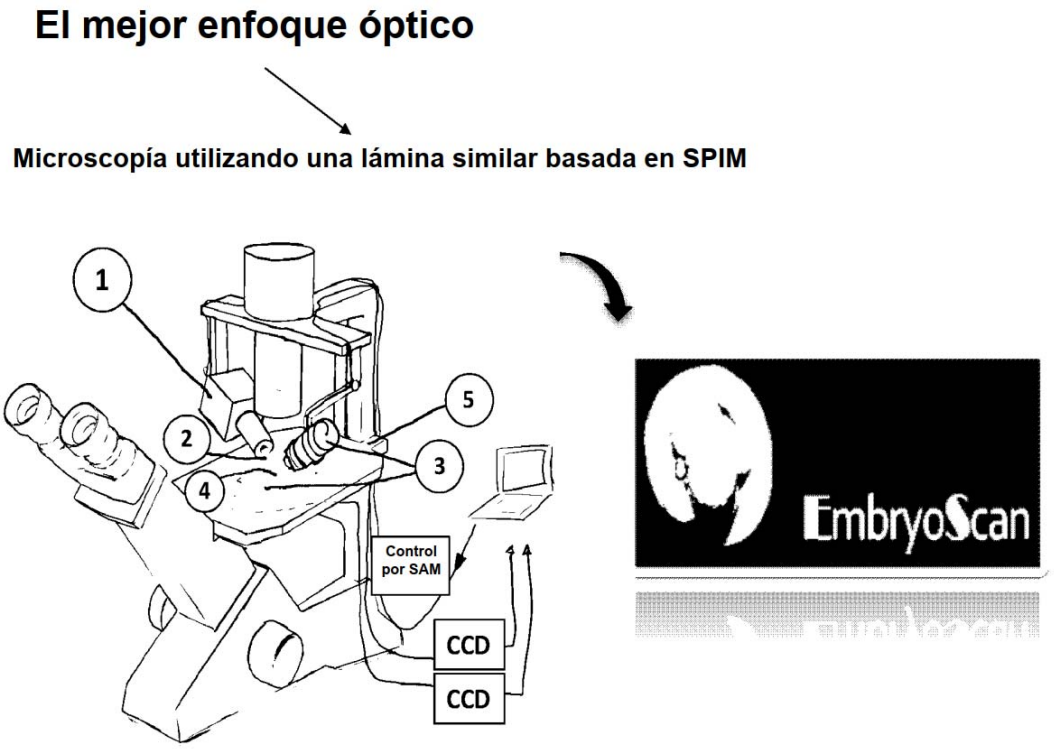


Figura 6D

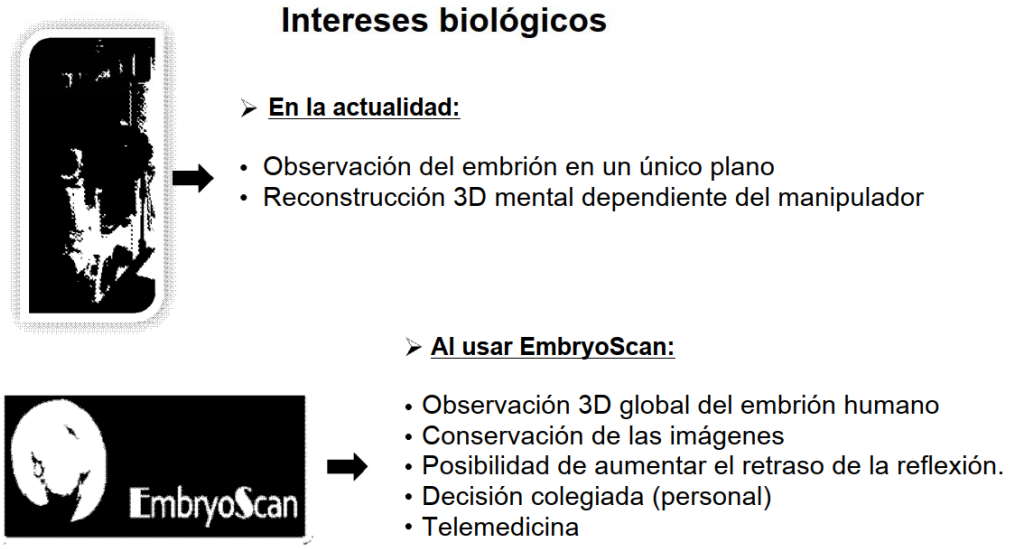


Figura 6E