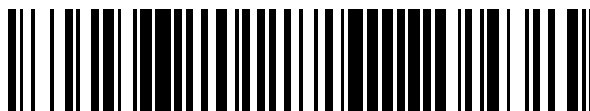


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 500 057**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

G06T 7/00 (2006.01)

G06T 7/20 (2006.01)

G06K 9/00 (2006.01)

C12N 5/073 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.08.2010 E 13152098 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.06.2014 EP 2615460**

54 Título: **Obtención de imágenes y evaluación de embriones, ovocitos y células madre**

30 Prioridad:

22.08.2009 US 236085 P

07.05.2010 US 332651 P

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

29.09.2014

73 Titular/es:

**THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY
OF THE LELAND STANFORD JUNIOR
UNIVERSITY (100.0%)
1705 El Camino Real
Palo Alto, CA 94306, US**

72 Inventor/es:

**WONG, CONNIE C.;
LOEWKE, KEVIN E.;
BAER, THOMAS M.;
REIJO-PERA, RENEE A. y
BEHR, BERRY**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 500 057 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

Obtención de imágenes y evaluación de embriones, ovocitos y células madre

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica prioridad de la Solicitud de Patente Provisional de EE.UU. N° 61/332.651, presentada el 7 de mayo de 2010 y la Solicitud de Patente Provisional de EE.UU. N° 61/236.085, presentada el 22 de agosto de 2009, las cuales se incorporan en su totalidad en la presente memoria como referencia.

Campo de la invención

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

Antecedentes de la invención

La esterilidad es un problema de salud común que afecta a 10-15% de las parejas en edad reproductiva. En los Estados Unidos solamente en el año 2006 se llevaron a cabo aproximadamente 140.000 ciclos de fecundación *in vitro* (FIV) (cdc.gov/art). Esto dio como resultado el cultivo de más de un millón de embriones anualmente con un potencial variable y, con frecuencia impreciso, de implantación y desarrollo a término. La tasa de nacidos vivos por ciclo, después de la FIV fue sólo del 29%, mientras que una media del 30% de los nacidos vivos resultaron de gestaciones múltiples (cdc.gov/art). Se han documentado bien las consecuencias adversas de las gestaciones múltiples tanto para la madre como para los fetos, tales como aborto involuntario, parto prematuro y baja tasa de natalidad. Las posibles causas del fracaso de la FIV son diversas; sin embargo, desde la introducción de la FIV en 1978, uno de los retos más importantes ha sido la identificación de los embriones que sean los más adecuados para la transferencia y los que más probablemente den como resultado un embarazo a término.

La comprensión en la técnica del desarrollo embrionario básico es limitada puesto que los estudios sobre la biología del embrión humano continúan siendo un reto y, frecuentemente están excluidos de la financiación de la investigación. En consecuencia, la mayor parte del conocimiento actual de desarrollo embrionario procede de los estudios de organismos modelo. Sin embargo, aunque los embriones de diferentes especies pasan por etapas de desarrollo similares, el tiempo varía según la especie. Estas diferencias, y muchas otras, hacen inapropiado la extrapolación directa de una especie a otra (Taft, R.E. (2008) *Theriogenology* 69(1):10-16). Las vías generales de desarrollo humano, así como los determinantes moleculares fundamentales subyacentes, son únicos para el desarrollo embrionario humano. Por ejemplo, en los ratones, la transcripción embrionaria se activa aproximadamente 12 horas después de la fecundación, simultáneamente con la primera división por escisión, mientras que en los seres humanos la activación de genes embrionarios (EGA) se produce en el día 3, alrededor del estadio de 8 células (Bell, C. E., et al., (2008) *Mol. Hum. Reprod.* 14:691-701; Braude, P., et al., (1988) *Nature* 332:459-461; Hamatani, T., et al., (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101:10326-10331; Dobson, T., et al., (2004) *Human Molecular Genetics* 13(14):1461-1470). Además, los genes que son modulados en el desarrollo humano temprano son únicos (Dobson, T., et al., (2004) *Human Molecular Genetics* 13(14):1461-1470). Por otra parte, en otras especies como el ratón, más del 85% de los embriones cultivados *in vitro* alcanzan el estadio de blastocisto, uno de los primeros puntos de referencias importantes en el desarrollo de los mamíferos, mientras que los cultivos de embriones humanos tienen una tasa media de formación de blastocistos de aproximadamente 30-50%, con una alta incidencia de mosaicismos y fenotipos anómalos, tales como la 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 estas diferencias, la mayoría de los estudios de desarrollo embrionario pre-implantacional proceden de organismos modelo y son difíciles de relacionar con el desarrollo de embriones humanos (Zernicka-Goetz, M. (2002) *Development* 129:815-829; Wang, Q., et al., (2004) *Dev. Cell* 6:133-144; Bell, C. E., et al., (2008) *Mol. Hum. Reprod.* 14:691-701; Zernicka-Goetz, M. (2006) *Curr. Opin. Genet. Dev.* 16:406-412; Mtango, N. R., et al., (2008) *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 268:223-290).

Tradicionalmente, en las clínicas de FIV, la viabilidad de los embriones humanos se ha evaluado por simples observaciones morfológicas, tales como la presencia de blastómeros mononucleados de tamaño uniforme y el grado de fragmentación celular (Rijinders PM, Jansen CAM. (1998) *Hum. Reprod.* 13:2869-73; Milki AA, et al., (2002) *Fertil. Steril.* 77:1191-5). Más recientemente, otros métodos, tales como el cultivo prolongado de embriones (hasta el estadio de blastocisto en el día 5) y el análisis del estado cromosómico por diagnóstico genético pre-implantacional (DGP) también se han usado para evaluar la calidad de los embriones (Milki A, et al., (2000) *Fertil. Steril.* 73:126-9; Fragouli E, (2009) *Fertil. Steril.* Jun 21 [PubE ya disponible]. El-Toukhy T, et al., (2009) *Hum. Reprod.* 6:20; Vanneste E, et al., (2009) *Nat. Med.* 15:577-83). Sin embargo, también existen riesgos potenciales de estos métodos porque prolongan el período de cultivo y afectan a 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).

Recientemente se ha demostrado que la obtención de imágenes secuenciales puede ser una herramienta útil para observar el desarrollo embrionario temprano. Algunos métodos han utilizado la obtención de imágenes secuenciales para monitorizar el desarrollo embrionario humano después de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (abreviadamente ICSI por la expresión inglesa *Intracytoplasmic Sperm Injection*) (Nagy et al., (1994) *Human*

Reproduction 9(9):1743-1748; Payne et al., (1997) *Human Reproduction* 12:532-541). Se analizaron la extrusión del cuerpo polar y la formación pronuclear y se correlacionaron con buena morfología en el día 3. Sin embargo, ningún parámetro se correlacionó con la formación de blastocistos ni con los resultados del embarazo. Otros métodos han observado la aparición de la primera escisión como un indicador para predecir la viabilidad de los embriones humanos (Fenwick, et al., (2002) *Human Reproduction*, 17:407-412; Lundin, et al., (2001) *Human Reproduction* 16:2652-2657). Sin embargo, estos métodos no reconocen la importancia de la duración de la citocinesis ni de los intervalos de tiempo entre las divisiones tempranas.

Otros métodos han utilizado la obtención de imágenes secuenciales para medir la cadencia y la extensión de las divisiones celulares durante el desarrollo embrionario temprano (WO/2007/144001). Sin embargo, estos métodos solamente divulgan un método básico y general para la obtención de imágenes secuenciales de embriones bovinos, que son sustancialmente diferentes de los embriones humanos en términos de potencial de desarrollo, comportamiento morfológico, programas moleculares y epigenéticos y cadencia y parámetros relacionados con la transferencia. Por ejemplo, los embriones bovinos tardan mucho más tiempo en ser implantados en comparación con los embriones humanos (30 días y 9 días, respectivamente). (Taft, (2008) *Theriogenology* 69 (1):10-16). Más aún, no se divulgan parámetros específicos de obtención de imágenes ni de intervalos de tiempo que pudieran ser predictivos de la viabilidad del embrión humano.

Más recientemente, la obtención de imágenes secuenciales se ha utilizado para observar el desarrollo embrionario humano durante las primeras 24 horas después de la fecundación (Lemmen et al., (2008) *Reproductive BioMedicine Online* 17(3):385-391). Se encontró que la sincronía de los núcleos después de la primera división estaba correlacionada con los resultados del embarazo. Sin embargo, este trabajo llegó a la conclusión de que la primera escisión temprana no era un parámetro predictivo importante, lo cual contradice estudios previos (Fenwick, et al. (2002) *Human Reproduction* 17:407-412; Lundin, et al. (2001) *Human Reproduction* 16:2652-2657).

Finalmente, ningún estudio ha validado los parámetros de la obtención de imágenes por correlación con los programas moleculares o la composición cromosómica de los embriones. De esta manera, los métodos de evaluación de los embriones humanos son deficientes en varios aspectos y se pueden mejorar por los métodos de la presente invención, los cuales implican nuevas aplicaciones de la microscopía secuencial, análisis de imagen y correlación de los parámetros de obtención de imágenes con los perfiles moleculares y la composición cromosómica. La presente invención se dirige a estos aspectos.

Sumario de la invención

Se proporcionan métodos, composiciones y kits para determinar el potencial de desarrollo de uno o más embriones o células pluripotentes en uno o más embriones o células pluripotentes. Estos métodos, composiciones y kits encuentran uso en la identificación *in vitro* de embriones y ovocitos que tengan un buen potencial de desarrollo, es decir, la habilidad o capacidad de desarrollarse hasta un blastocisto, los cuales son por lo tanto útiles en los métodos de tratamiento de la esterilidad en seres humanos, y similares.

En algunos aspectos de la invención, se proporcionan métodos para la determinación del potencial de desarrollo de un embrión o una célula pluripotente. En tales aspectos, se mide uno o más parámetros celulares de un embrión o célula pluripotente para llegar a la medición de un parámetro celular. El parámetro celular se emplea entonces para proporcionar una determinación del potencial de desarrollo del embrión o de la célula pluripotente, determinación que se puede usar para guiar el curso clínico de una acción. En algunas realizaciones, el parámetro celular es un evento morfológico que es medible por microscopía secuencial. En algunas realizaciones, por ejemplo cuando se realizan ensayos con un embrión, el parámetro o los parámetros celulares son: la duración de un evento de citocinesis, por ejemplo la citocinesis 1; el intervalo de tiempo entre la citocinesis 1 y la citocinesis 2; y el intervalo de tiempo entre la citocinesis 2 y la citocinesis 3. En ciertas realizaciones, la duración del ciclo celular 1 se utiliza también como un parámetro celular. En algunas realizaciones, la medición del parámetro celular se emplea comparándolo con una medición de un parámetro celular comparable proveniente de un embrión de referencia y usando el resultado de esta comparación para proporcionar una determinación del potencial de desarrollo del embrión. En algunas realizaciones, el embrión es un embrión humano. En algunas realizaciones, el parámetro celular es un nivel de expresión de un gen que se mide para llegar a una medición de la expresión génica. En algunas realizaciones, la medición de la expresión génica se emplea comparándola con la medición de la expresión génica de una célula pluripotente o embrión de referencia o una o más células de ellos, donde el resultado de esta comparación se emplea para proporcionar una determinación del potencial de desarrollo de la célula pluripotente o del embrión. En algunas realizaciones, el embrión es un embrión humano.

En algunos aspectos de la invención, se proporcionan métodos para clasificar embriones o células pluripotentes por su potencial de desarrollo con respecto a los otros embriones o células pluripotentes del grupo. En tales realizaciones, se mide uno o más parámetros celulares de los embriones o las células pluripotentes del grupo para llegar a una medición del parámetro celular para cada uno de los embriones o células pluripotentes. Las mediciones de los parámetros celulares se emplean entonces para determinar el potencial de desarrollo de cada uno de los embriones o células pluripotentes del grupo con respecto a cada uno de los otros, determinación que se puede usar para guiar el curso clínico de una acción. En algunas realizaciones, el parámetro celular es un evento morfológico que es medible por microscopía secuencial. En algunas realizaciones, por ejemplo cuando se clasifican embriones,

el uno o más parámetros celulares son la duración de un evento de citocinesis, por ejemplo la citocinesis 1; el intervalo de tiempo entre la citocinesis 1 y la citocinesis 2; y el intervalo de tiempo entre la citocinesis 2 y la citocinesis 3. En ciertas realizaciones, también se mide la duración del ciclo celular 1. En algunas realizaciones, el parámetro celular es el nivel de expresión de uno o más genes. En algunas realizaciones, la una o más mediciones de parámetros celulares se emplean comparando entre sí las mediciones de los parámetros celulares de cada uno de los embriones o células pluripotentes del grupo para determinar el potencial de desarrollo de los embriones o células pluripotentes de unos con respecto a otros. En algunas realizaciones, la una o más mediciones de parámetros celulares se emplean comparando cada medición del parámetro celular con una medición del parámetro celular de un embrión o célula pluripotente de referencia para determinar el potencial de desarrollo de cada embrión o célula pluripotente y comparando esos potenciales de desarrollo para determinar el potencial de desarrollo de los embriones o células pluripotentes de unos con respecto a otros.

En algunos aspectos de la invención, se proporcionan métodos para proveer embriones con buen potencial de desarrollo para su transferencia a una hembra para la reproducción asistida (FIV). En tales aspectos, se cultiva uno o más embriones en condiciones suficientes para el desarrollo embrionario. Se mide entonces uno o más parámetros celulares en el uno o más embriones para llegar a una medición del parámetro celular. La medición del parámetro celular se emplea entonces para proporcionar una determinación del potencial de desarrollo del uno o más embriones. El uno o más embriones que demuestren buen potencial de desarrollo se transfieren entonces a una hembra.

Breve descripción de las figuras

La invención se entenderá mejor a partir de la siguiente descripción detallada cuando se lea conjuntamente con los dibujos que se acompañan. Se destaca que, de acuerdo con la práctica común, los diversos aspectos de los dibujos no están a escala. Por el contrario, las dimensiones de los diversos aspectos se amplían o reducen arbitrariamente para mayor claridad. Incluidas en los dibujos están las siguientes figuras.

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

La Figura 2 es una serie de fotografías que muestran la escisión y división celular durante un período de 6 días. Las imágenes llevan las leyendas del día 1 hasta el día 6. La barra de la escala representa 50 μm .

La Figura 3 es un gráfico de barras que muestra los porcentajes del desarrollo satisfactorio hasta blastocistos partiendo de embriones de 1 célula (cigotos). En el transcurso de 4 experimentos independientes, se observó un total de 100 embriones hasta el día 5 a 6 por microscopía secuencial. Se muestra el porcentaje de células que alcanza cada estadio indicado (blastocisto, 8 células, de 4 a 7 células, de 2 a 3 células y 1 célula).

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

La Figura 5 es un diagrama que muestra el curso del tiempo entre estadios usados para las presentes evaluaciones, incluyendo la duración de la primera citocinesis, el tiempo entre la primera y la segunda división (medido como el intervalo de tiempo entre la resolución de la citocinesis 1 y el comienzo de la citocinesis 2) y el tiempo entre la 2ª y la 3ª mitosis (medido como el intervalo de tiempo entre el comienzo de la citocinesis 2 y el comienzo de la citocinesis 3).

La Figura 6 es un gráfico de puntos en 3D que muestra la medición de tres eventos, incluyendo la duración de la primera citocinesis, el intervalo de tiempo entre la primera y la segunda divisiones celulares (medido como el intervalo de tiempo entre la resolución de la citocinesis 1 y el comienzo de la citocinesis 2) y el intervalo de tiempo entre la segunda y la tercera divisiones celulares (medido como el intervalo de tiempo entre el comienzo de la citocinesis 2 y el comienzo de la citocinesis 3), para un grupo grande de embriones. Se muestra que los embriones que alcanzan el estadio de blastocisto (marcados con círculos) aparecen agrupados en el gráfico en 3D, mientras que los embriones que se detienen (marcados con X) antes de alcanzar el estado de blastocisto están completamente dispersos.

La Figura 7 es un gráfico que muestra una curva de característica operativa del receptor (abreviadamente ROC, por la expresión inglesa *Receiver Operating Characteristic*) para predecir la formación de blastocistos usando los 3 parámetros morfológicos dinámicos.

La Figura 8 es un gráfico radial que muestra los niveles de expresión génica de 52 genes a partir de 6 embriones detenidos de 1 a 2 células y 5 embriones normales de 1 a 2 células. La diferencia en los niveles de expresión entre los embriones normales y anormales fue estadísticamente significativa para los genes que se destacan en color amarillo y se marcaron con un asterisco, según se determinó por el ensayo de Mann-Whitney.

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

La Figura 10 es un gráfico de barras que muestra una comparación de los mismos genes que se presentan en la

Fig. 9 en un embrión detenido de 4 células y en embriones normales de 4 células. En la parte superior se muestra un número selecto de imágenes secuenciales del embrión detenido de 4 células.

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

La Figura 12 muestra la expresión génica de genes de blastómeros individuales en diferentes estadios. (A) Expresión génica de dos genes, CTNNB1 y CDX2 provenientes de blastómeros individuales, representados en diferentes estadios celulares, y que muestra los cambios en estos niveles de expresión génica en diferentes estadios, por ejemplo, de 2 células, de 3 células, mórula y blastocisto. (B) Huellas de la expresión génica en barras que representan los genes expresados en el programa materno en comparación con los genes expresados en el programa cigótico.

La Figura 13 es un dibujo de un modelo para el uso del análisis de imágenes secuenciales y el análisis molecular correlacionado para evaluar la viabilidad de embriones.

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

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

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

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

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

La Figura 19 es una tabla de las categorías en las que pueden clasificarse los genes de los que se analizó su nivel de expresión, incluyendo el número de genes por categoría.

La Figura 20 es una tabla de los cuatro Patrones Específicos de Estadios Embrionarios (abreviadamente ESSP, por la expresión inglesa *Embryonic Stage Specific Patterns*) que fueron identificados durante el análisis de la expresión génica de 141 embriones individuales con desarrollados normalmente y de blastómeros individuales, y la clasificación de los genes en cada una de estas categorías.

La Figura 21 muestra el análisis de imagen automatizado que demuestra la capacidad de los parámetros de imagen para predecir la formación de blastocistos. (A) Muestra los resultados del algoritmo de seguimiento para un solo embrión. (B) Muestra un conjunto de 14 embriones que se analizaron. (C) Muestra la comparación del análisis de imagen manual con el análisis automatizado para la duración de la citocinesis. (D) Muestra la comparación del análisis de imagen manual respecto al tiempo entre la primera y la segunda mitosis. (E) Muestra la comparación de una buena morfología de blastocistos con una mala morfología de blastocistos.

La Figura 22 es un dibujo esquemático de un microscopio de campo oscuro de acuerdo con la presente invención; la inserción de la izquierda muestra una configuración de parche de campo oscuro de láser mecanizado.

La Figura 23 es una fotografía de una disposición de tres microscopios como se ilustra en la Figura 22, montados sobre un soporte para la instalación en una incubadora y para las conexiones con un ordenador. La Fig. 23A muestra los microscopios y la Fig. 23B muestra los microscopios dentro de una incubadora.

La Figura 24 es una impresión de pantalla del programa informático de captura de imágenes usado en el presente trabajo, que muestra embriones a los que se les toman imágenes por 3 canales.

Las Figuras 25 (A) a (D) son una serie de cuatro fotografías que muestran imágenes secuenciales seleccionadas provenientes del experimento 2, estación 2. Las Figs. 25(A) y 25(B) son imágenes capturadas antes del cambio de los medios y las Figs. 25(C) y 25(D) son imágenes capturadas después del cambio de los medios.

Las Figuras 26 (A) a (D) son una serie de cuatro fotografías que muestran imágenes secuenciales seleccionadas provenientes del experimento 1, estación 2. Las Figs. 26(A) y 26(B) son imágenes capturadas antes del cambio de los medios y las Figs. 26(C) y 26(D) son imágenes capturadas después del cambio de los medios.

Las Figuras 27 A y B son dibujos de una placa de Petri personalizada con micro-pocillos. La Fig. 27A muestra un dibujo de la placa con dimensiones y la Fig. 27B muestra una vista en 3D de los micro-pocillos.

Las Figuras 28 (A) y (B) son gráficos que muestran la actividad celular con y sin el registro previo de imágenes. Las Figs. 28(A) y 28(B) en conjunto muestran que el registro limpia los resultados y elimina los picos debido al

desplazamiento o rotación del embrión.

Las Figuras 29 (A) y (B) son gráficos (izquierda) y fotografías de células (derecha) que muestran la actividad celular de embriones normales y anormales. En conjunto, la Fig. 29(A) y la Fig. 29(B) muestran que, en el día 3, los embriones tienen una morfología similar, pero las representaciones de su actividad celular son drásticamente diferentes y sólo uno de ellos se desarrolla hasta blastocisto.

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

Las Figuras 31 A-G son una serie de siete fotografías que muestran los resultados del seguimiento en 2D en varios estadios celulares. Las células progresan tal como se indica con los números de marcos asociados con cada par de imágenes: Marco 15 (Fig. 31A), 45 (B), 48 (C), 189 (D), 190 (E), 196 (F) y 234(G). La fila inferior muestra las imágenes simuladas superpuestas. Los contornos son membranas células visibles y las líneas blancas de puntos son membranas ocluidas. Los marcos de imágenes son capturados cada 5 minutos y sólo se presentan unos cuantos.

Las Figuras 32 A y B son una serie de fotografías y dibujos que muestran dos casos satisfactorios de seguimiento celular en 3D. Las ilustraciones bajo cada foto de un embrión muestran la vista de arriba a abajo del modelo en 3D, con excepción del marco 314 y el marco 228, los cuales muestran vistas laterales de los modelos en el marco 314 y el marco 228, respectivamente. Los marcos de las imágenes fueron capturados cada 5 minutos.

La Figura 33 es una representación esquemática de los resultados del filtro de partículas para una división de 1 célula a 2 células. Los puntos de datos son la ubicación en 3D de los centros de las células. Se muestran los puntos para los modelos de 1 célula, los modelos de 2 células, los modelos de 3 células y los modelos de 4 células. La fila superior muestra las partículas después de la predicción y la fila inferior muestra las partículas después del remuestreo.

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

La Figura 35 es un diagrama de flujo que muestra como se usa el análisis de imágenes para modelizar los embriones y medir ciertos parámetros morfológicos.

Descripción detallada de la invención

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

Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor comprendido entre los límites superior e inferior de tal intervalo está también específicamente incluido, hasta la décima parte de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto claramente lo dicte de otro modo. Cada intervalo más pequeño entre cualquier valor declarado o valor comprendido en un intervalo declarado y cualquier otro valor declarado o comprendido en ese intervalo declarado está incluido dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden ser incluidos o excluidos independientemente del intervalo, y cada intervalo en el que uno cualquiera, ninguno o ambos límites están incluidos en los intervalos más pequeños también están incluidos dentro de la invención, sujeto a que cualquier límite esté específicamente excluido del intervalo declarado. Cuando el intervalo declarado incluye uno o ambos límites, los intervalos que excluyen cualquiera o ambos de estos límites incluidos también están incluidos en la invención.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que entendería normalmente un experto en la técnica a la cual pertenece esta invención. Aunque se pueden usar cualesquiera métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria para poner en práctica o realizar ensayos sobre la presente invención, se describen ahora algunos materiales y métodos potenciales preferidos. Todas las publicaciones mencionadas en la presente memoria están incorporadas en la presente memoria como referencia para describir y divulgar los métodos y/o materiales en conexión con los que se citan las publicaciones. Cuando exista una contradicción, se entiende que la presente descripción tiene prevalencia sobre cualquier divulgación de una publicación incorporada.

Se debe advertir que, tal como se usa en la presente memoria y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “uno” y “el” incluyen referentes plurales a menos que el contexto lo dicte claramente de otro modo. De este modo, 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 sus equivalentes, por ejemplo, polipéptidos, conocidos por los expertos en la técnica, y así sucesivamente.

- 5 Las publicaciones estudiadas en la presente memoria se proporcionan únicamente para su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada en la presente memoria debe interpretarse como una admisión de que la presente invención no tiene derecho a anteceder tal publicación en virtud de la invención previa. Además, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes de las fechas de publicación reales que puede ser necesario confirmar independientemente.

Definiciones

- 10 Se proporcionan métodos, composiciones y kits para determinar el potencial de desarrollo de uno o más embriones o células pluripotentes y/o la presencia de anomalías cromosómicas en uno o más embriones o células pluripotentes. Estos métodos, composiciones y kits encuentran uso en la identificación *in vitro* de embriones y ovocitos que son más útiles en el tratamiento de la esterilidad en seres humanos. Estos y otros objetos, ventajas y aspectos de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica tras la lectura de los detalles de los métodos y composiciones objetos que se describen más detalladamente a continuación.

- 15 Los términos "potencial de desarrollo" y "competencia para el desarrollo" se usan en la presente memoria para referirse a la habilidad o capacidad de un embrión o célula pluripotente sano para crecer o desarrollarse.

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

El término "célula pluripotente" se usa en la presente memoria para referirse a cualquier célula que tenga la capacidad de diferenciarse en múltiples tipos de células en un organismo. Los ejemplos de células pluripotentes incluyen células madre, ovocitos y embriones de 1 célula (es decir, cigotos).

- 25 El término "célula madre" se usa en la presente memoria para referirse a una célula o una población de células que: (a) tiene la capacidad de auto-renovarse y (b) tiene el potencial de dar lugar a diversos tipos de células diferenciadas. Frecuentemente, una célula madre tiene el potencial de dar lugar a múltiples linajes de células. Tal como se usa en la presente memoria, una célula madre puede ser una célula madre totipotente, por ejemplo, un ovocito fecundado, el cual da lugar a todos los tejidos embrionarios y extraembrionarios de un organismo; una célula madre pluripotente, por ejemplo, una célula madre embrionaria (CME), una célula germinal embrionaria (CGE) o una célula madre pluripotente inducida (CMPi), las cuales dan lugar a todos los tejidos embrionarios de un organismo, es decir, a linajes del endodermo, mesodermo y ectodermo; una célula madre multipotente, por ejemplo, una célula madre mesenquimal, que da lugar a al menos dos de los tejidos embrionarios de un organismo, es decir, al menos dos de los linajes del endodermo, mesodermo y ectodermo, o puede ser una célula madre específica de tejido, la cual da lugar a múltiples tipos de células diferenciadas de un tejido particular. Las células madre específicas de tejido incluyen células embrionarias específicas de tejido, las cuales dan lugar a las células de un tejido particular y células madre somáticas, las cuales residen en los tejidos adultos y pueden dar lugar a las células de ese tejido, por ejemplo las células madre neuronales, que dan lugar a todas las células del sistema nervioso central, las células satélites, que dan lugar al músculo esquelético, y las células madre hematopoyéticas, que dan lugar a todas las células del sistema hematopoyético.

El término "ovocito" se usa en la presente memoria para referirse a una célula germinal femenina no fecundada o gameto. Los ovocitos de la presente solicitud pueden ser ovocitos primarios, en cuyo caso se posicionan para pasar la meiosis I o estar pasándola, u ovocitos secundarios, en cuyo caso se posicionan para pasar la meiosis II o estar pasándola.

- 45 Por "meiosis" se entiende 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 reparten 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 DNA, dando como resultado gametos con un número haploide de cromosomas.

- 50 Por estadio "vesícula germinal" se entiende el estadio de maduración de un ovocito primario que se correlaciona con la profase I del ciclo celular de la meiosis I, es decir, antes de la primera división del material nuclear. A los ovocitos en este estadio también se les llama "ovocitos de vesícula germinal", por el núcleo característicamente grande, llamado vesícula germinal. En un ovocito humano normal cultivado *in vitro*, la vesícula germinal se produce aproximadamente entre las 6-24 horas después del comienzo de la maduración.

- 55 Por estadio "metafase I" se entiende el estadio de maduración de un ovocito primario que se correlaciona con la metafase I del ciclo celular de la meiosis I. En comparación con los ovocitos de vesícula germinal, los ovocitos de la metafase I no tienen un núcleo grande, claramente definido. En un ovocito humano normal cultivado *in vitro*, la metafase I se produce aproximadamente entre las 12-36 horas después del comienzo de la maduración.

Por estadio “metafase II” se entiende la etapa de maduración de un ovocito secundario que se correlaciona con la metafase II del ciclo celular de la meiosis II. La metafase II se distingue por la extrusión del primer cuerpo polar. En un ovocito humano normal cultivado *in vitro*, la metafase II se produce aproximadamente entre las 24-48 horas después del comienzo de la maduración.

5 Por “ciclo celular mitótico”, se entiende los eventos en una célula que dan como resultado la duplicación de los cromosomas de una célula y la división de esos cromosomas y la materia citoplasmática 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 DNA. En la mitosis, la célula inicia y completa la división celular, primero dividiendo su material nuclear y luego dividiendo su material citoplasmático y su material nuclear dividido (citocinesis) en dos células separadas.

10 Por un “primer ciclo celular mitótico” o “ciclo celular 1” se entiende el intervalo de tiempo desde la fecundación hasta la finalización del primer evento de citocinesis, es decir, la división del ovocito fecundado en dos células hijas. En los casos en que los ovocitos son fecundados *in vitro*, el intervalo de tiempo entre la inyección de la gonadotropina coriónica humana (HCG) (que se administra generalmente antes de la recuperación de los ovocitos) hasta la finalización del primer evento de citocinesis, se puede usar como intervalo de tiempo sustitutivo.

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

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

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

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

Por “tercer evento de escisión”, se entiende el tercer conjunto de divisiones, es decir, las divisiones de todas las células nietas. Al finalizar el tercer evento de escisión, el embrión consta típicamente de 8 células.

35 Por “citocinesis” o “división celular” se entiende la fase de la mitosis en la que una célula experimenta una división celular. En otras palabras, es el estadio de mitosis en el cual el material nuclear separado de una célula y su material citoplásmico se dividen para producir dos células hijas. El período de citocinesis se identifica como el período, o la ventana de tiempo, entre el momento en el que se observa por primera vez una constricción de la membrana celular (un “surco de escisión”) y la resolución de ese evento de constricción, es decir, la generación de dos células hijas. El comienzo del surco de escisión puede identificarse visualmente como el punto en el cual la curvatura de la membrana celular cambia desde convexa (redondeada hacia afuera) hasta cóncava (curvada hacia dentro con una mella o hendidura). Esto se ilustra en la Fig. 4, panel superior, por flechas blancas que apuntan a los 2 surcos de escisión. El comienzo de la elongación celular también puede utilizarse para marcar el comienzo de la citocinesis, en cuyo caso se define el período de citocinesis como el período de tiempo entre el comienzo de la elongación celular y la resolución de la división celular.

40 Por “primera citocinesis” o “citocinesis 1”, se entiende el primer evento de división celular después de la fecundación, es decir, la división de un ovocito fecundado para producir dos células hijas. La primera citocinesis ocurre normalmente alrededor de un día después de la fecundación.

50 Por “segunda citocinesis” o “citocinesis 2”, se entiende el segundo evento de división celular observado en un embrión, es decir, la división de una célula hija del ovocito fecundado (la “célula hija líder” o hija A) en un primer conjunto de dos nietas.

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

55 El término “marcador fiduciario” o “marcador fiducial” es un objeto que se utiliza en el campo de la visión de un sistema de imágenes que aparece en la imagen producida para uso como un punto de referencia o una medición.

Puede ser algo colocado en o sobre el objeto al que se le toma la imagen o una marca o un conjunto de marcas en la retícula de un instrumento óptico.

El término “micro-pocillo” se refiere a un recipiente que tiene un tamaño a escala celular, preferiblemente para poder alojar una sola célula eucariota.

5 Células pluripotentes y embriones de interés

En los métodos de la invención, se evalúa el potencial de desarrollo de uno o más embriones o células pluripotentes midiendo uno o más parámetros celulares de uno o más embriones o una o más células pluripotentes y empleando estas mediciones para determinar el potencial de desarrollo del uno o más embriones o de la una o más células pluripotentes. La información así obtenida se puede usar para guiar las decisiones clínicas, por ejemplo, si se transfiere o no un embrión fecundado *in vitro*, si se transplanta o no una célula o células cultivadas.

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

Ejemplos de células pluripotentes que pueden evaluarse por los métodos de la invención incluyen células madre totipotentes, por ejemplo, ovocitos, tales como ovocitos primarios y ovocitos secundarios, células madre pluripotentes, por ejemplo, células CME, células CGE, células CMPi y similares; células mutipotentes, por ejemplo, células madre mesenquimales; y células madre específicas de tejidos. Dichas células pueden proceder de cualquier estadio de vida, por ejemplo, embrionario, neonatal, juvenil o adulto y de cualquier sexo, es decir, XX o XY.

Los embriones y células pluripotentes se pueden obtener a partir de cualquier organismo, por ejemplo cualquier especie de mamíferos, por ejemplo, seres humanos, primates, equinos, bovinos, porcinos, caninos, felinos, etc. Preferiblemente, proceden de un ser humano. Pueden estar previamente congelados, por ejemplo, embriones crioconservados en el estadio de una célula y luego descongelarlos, u ovocitos y células madre congelados y descongelados. Alternativamente, pueden estar recién preparados, por ejemplo, los embriones que se preparan en el momento a partir de ovocitos por técnicas de fecundación *in vitro*; ovocitos recién recogidos y/o recién madurados por medio de técnicas de maduración *in vitro* o que se obtienen a partir de células madre pluripotentes diferenciadas *in vitro* dando células germinales y maduras para dar ovocitos; células madre recién preparadas a partir de la disociación y el cultivo de tejidos por métodos conocidos en la técnica; y similares. Pueden cultivarse en cualesquiera condiciones convenientes conocidas en la técnica para promover la supervivencia, el crecimiento y/o el desarrollo de la muestra que se ha de evaluar, por ejemplo, para los embriones en condiciones tales como las usadas en la técnica de fecundación *in vitro*; véanse, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 6.610.543, la patente de EE.UU. N° 6.130.086, la patente de EE.UU. N° 5.837.543, cuyas descripciones se incorporan en la presente memoria como referencia; para los ovocitos, en condiciones tales como las usadas en la técnica para promover la maduración de ovocitos; véanse, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 5.882.928 y la patente de EE.UU. N° 6.281.013, cuyas descripciones se incorporan en la presente memoria como referencia; para las células madre en condiciones tales como las usadas en la técnica para promover la proliferación, véanse, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 6.777.233, la patente de EE.UU. N° 7.037.892, la patente de EE.UU. N° 7.029.913, la patente de EE.UU. N° 5.843.780, y la patente de EE.UU. N° 6.200.806, la solicitud de patente de EE.UU. N° 2009/0047263; la solicitud de patente de EE.UU. N° 2009/0068742, cuyas descripciones se incorporan en la presente memoria como referencia. Frecuentemente, los embriones/células pluripotentes se cultivan en un medio disponible comercialmente, tal como KnockOut DMEM, DMEM-F12 o el medio de Dulbecco modificado por Iscove que se ha complementado con suero o un sustituto de suero, aminoácidos y factores de crecimiento adaptados a las necesidades del embrión/célula pluripotente particular que se está evaluando.

45 Análisis de las imágenes secuenciales

En algunas realizaciones, los embriones/células pluripotentes se evalúan midiendo parámetros celulares por técnicas de imagen secuenciales. Los embriones/células pluripotentes pueden cultivarse en placas de cultivo estándares. Alternativamente, los embriones/células pluripotentes pueden cultivarse en placas de cultivo personalizadas, por ejemplo placas de cultivo personalizadas con micro-pocillos de calidad óptica, como se describe en la presente memoria. En tales placas de cultivo personalizadas, cada micro-pocillo contiene un único embrión/célula pluripotente y la superficie inferior de cada micro-pocillo tiene un acabado de calidad óptica tal que se pueden obtener simultáneamente imágenes de todo el grupo de embriones dentro de una sola placa, por un único microscopio en miniatura con la resolución suficiente para seguir los procesos de mitosis celular. Todo el grupo de micro-pocillos comparte la misma gota de medio en la placa de cultivo, y también pueden incluir una pared exterior colocada alrededor de los micro-pocillos para la estabilizar la gota de medio, así como marcadores fiduciarios situados cerca de los micro-pocillos. La hidrofobicidad de la superficie se puede ajustar por ataque químico con plasma u otro tratamiento para prevenir la formación de burbujas en los micro-pocillos cuando se llenan con medio. Independientemente de que se use una placa de cultivo estándar o una placa de cultivo personalizada, durante el cultivo se puede cultivar en el mismo medio de cultivo uno o más embriones en desarrollo, por ejemplo pueden

cultivarse por placa entre 1 y 30 embriones.

Se toman las imágenes a lo largo del tiempo y luego se analizan para llegar a las mediciones de uno o más parámetros celulares. Las imágenes secuenciales se pueden obtener con cualquier microscopio controlado por ordenador que esté equipado para el almacenamiento y análisis de imágenes digitales, por ejemplo, microscopios inversos equipados con fases calentadas y cámaras de incubación, o disposiciones de microscopios en miniatura construidas de forma personalizada que caben dentro de una incubadora convencional. La disposición de microscopios en miniatura permite el cultivo concurrente de múltiples placas de muestras en la misma incubadora, y es escalable para adaptarse a múltiples canales sin limitaciones en cuanto al intervalo de tiempo mínimo entre la captura de imágenes sucesivas. Usando microscopios múltiples se elimina la necesidad de mover la muestra, lo que mejora la exactitud del sistema y su fiabilidad global. Los microscopios individuales en la incubadora pueden aislarse parcial o totalmente, proporcionando a cada placa de cultivo su propio ambiente controlado. Esto permite que las placas se transfieran hacia y desde las estaciones de obtención de imágenes sin perturbar el ambiente de las otras muestras.

El sistema de obtención de imágenes para imágenes secuenciales puede emplear iluminación de campo brillante, iluminación de campo oscuro, contraste de fases, contraste de modulación de Hoffman, contraste de interferencia diferencial o fluorescencia. En algunas realizaciones, se puede usar iluminación de campo oscuro para proporcionar un mayor contraste de imagen para la extracción posterior de aspectos y el análisis de las imágenes. Además, se pueden usar fuentes de luz roja o del infrarrojo cercano para reducir la fototoxicidad y mejorar la relación de contraste entre las membranas celulares y la porción interior de las células.

Las imágenes que se adquieren se pueden almacenar ya sea sobre una base continua, como en video en directo o sobre una base intermitente, como en la fotografía secuencial, donde a un sujeto se le toman imágenes repetidamente en una foto fija. Preferiblemente, el intervalo de tiempo entre las imágenes debe ser entre 1 a 30 minutos con el fin de capturar eventos morfológicos significativos, según se describe a continuación. En una realización alternativa, el intervalo de tiempo entre imágenes podría variar dependiendo de la cantidad de actividad celular. Por ejemplo, durante los períodos activos las imágenes podrían tomarse con una frecuencia de cada pocos segundos o cada minuto, mientras que durante los períodos inactivos las imágenes podrían tomarse cada 10 o 15 minutos o más. Se podría utilizar el análisis de la imagen en tiempo real sobre las imágenes capturadas para detectar cuándo y cómo variar los intervalos de tiempo. En nuestros métodos, se estima que la cantidad total de luz que reciben las muestras es equivalente a aproximadamente 24 minutos de exposición continua a luz de bajo nivel durante 5 días de obtención de imágenes. La intensidad de la luz para un sistema de imágenes secuenciales es significativamente menor que la intensidad de la luz que se usa típicamente en un microscopio de reproducción asistida debido a la baja potencia de los diodos emisores de luz (LED) (por ejemplo, usando un LED de 1 W en comparación con una bombilla halógena típica de 100 W) y la alta sensibilidad del sensor de la cámara. De esta manera, la cantidad total de energía luminosa que recibe un embrión usando el sistema de imágenes secuenciales es comparable o inferior a la cantidad de energía que recibe durante el manejo de rutina en una clínica de FIV. Además, el tiempo de exposición puede acortarse significativamente para reducir la cantidad total de exposición a la luz del embrión/célula pluripotente. En 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 bajo nivel es menor que 5 minutos.

Después de la toma de imágenes, las imágenes se extraen y se analizan en ellas diferentes parámetros celulares, por ejemplo, tamaño de la célula, espesor de la zona pelúcida, grado de fragmentación, simetría de las células hijas resultantes de una división celular, intervalos de tiempo entre las primeras pocas mitosis y duración de la citocinesis.

Los parámetros celulares que se pueden medir por obtención de imágenes secuenciales son normalmente eventos morfológicos. Por ejemplo, en la evaluación de embriones, la obtención de imágenes secuenciales se puede usar para medir la duración de un evento de citocinesis, por ejemplo, citocinesis 1, citocinesis 2, citocinesis 3 o citocinesis 4, donde la duración de un evento de citocinesis se define como el intervalo de tiempo entre la primera observación de un surco de escisión (el comienzo de la citocinesis) y la resolución del surco de escisión en dos células hijas (es decir, la producción de dos células hijas). Otro parámetro de interés es la duración de un evento del ciclo celular, por ejemplo, ciclo celular 1, ciclo celular 2, ciclo celular 3 o ciclo celular 4, donde la duración de un evento del ciclo celular se define como el intervalo de tiempo entre la producción de una célula (para el ciclo celular 1, la fecundación de un óvulo; para los posteriores ciclos celulares, la resolución de la citocinesis) y la producción de dos células hijas a partir de esa célula. Otros parámetros celulares de interés que pueden ser medidos por obtención de imágenes secuenciales incluyen intervalos de tiempo que están definidos por estos eventos celulares, por ejemplo, (a) el intervalo de tiempo entre la citocinesis 1 y la citocinesis 2, definible como uno cualquiera del intervalo entre el comienzo de la citocinesis 1 y el comienzo de la citocinesis 2, el intervalo entre la resolución de la citocinesis 1 y la resolución de la citocinesis 2, el intervalo entre el comienzo de la citocinesis 1 y la resolución de la citocinesis 2; o el intervalo entre la resolución de la citocinesis 1 y el comienzo de la citocinesis 2; o (b) el intervalo de tiempo entre la citocinesis 2 y la citocinesis 3, definible como uno cualquiera del intervalo entre el comienzo de la citocinesis 2 y el comienzo de la citocinesis 3, o el intervalo entre la resolución de la citocinesis 2 y la resolución de la citocinesis 3, o el intervalo entre el comienzo de la citocinesis 2 y la resolución de la citocinesis 3, o el intervalo entre la resolución de la citocinesis 2 y el comienzo de la citocinesis 3.

Para los fines de la fecundación *in vitro*, se considera ventajoso que el embrión sea transferido al útero tempranamente en el desarrollo, por ejemplo, hacia el día 2 o el día 3, es decir, hasta el estadio de 8 células, para reducir la pérdida de embriones debido a las desventajas de las condiciones de cultivo relacionadas con el ambiente *in vitro*, y para reducir los resultados adversos potenciales asociados con los errores epigenéticos que puedan ocurrir durante el cultivo (Katari et al., (2009) *Hum. Mol. Genet.* 18(20):3769-78; Sepúlveda et al., (2009) *Fertil. Steril.* 91(5):1765-70). Por consiguiente, es preferible que la medición de los parámetros celulares tenga lugar dentro del período de 2 días desde la fecundación, aunque también están contemplados por los presentes métodos periodos más prolongados de análisis, por ejemplo aproximadamente 36 horas, aproximadamente 54 horas, aproximadamente 60 horas, aproximadamente 72 horas, aproximadamente 84 horas, aproximadamente 96 horas, o más.

Los ejemplos de los parámetros celulares que se pueden evaluar en un ovocito en maduración por obtención de imágenes secuenciales incluyen, sin limitación, cambios en la morfología de la membrana del ovocito, por ejemplo, la velocidad y extensión de la separación desde la zona pelúcida; cambios en la morfología del núcleo del ovocito, por ejemplo, el comienzo, la finalización y la velocidad de rotura de la vesícula germinal (abreviadamente GVBD por la expresión inglesa *Germinal Vesicle Breakdown*); la velocidad y la dirección del movimiento de los gránulos en el citoplasma y el núcleo; la citocinesis del ovocito y el primer cuerpo polar y el movimiento y/o la duración de la extrusión del primer cuerpo polar. Otros parámetros incluyen la duración de la citocinesis del ovocito secundario maduro y del segundo cuerpo polar.

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

Los parámetros pueden medirse manualmente o pueden medirse automáticamente, por ejemplo, por un programa informático de análisis de imágenes. Cuando se emplea el programa informático de análisis de imágenes, se pueden usar algoritmos de análisis de imágenes que emplean una técnica de estimación del modelo probabilístico basado en el método secuencial de Monte Carlo, por ejemplo, generando distribuciones de los modelos hipotéticos de embriones/células pluripotentes, simulando imágenes basadas en un modelo óptico sencillo y comparando estas simulaciones con los datos de las imágenes observadas. Cuando se emplean tales estimaciones del modelo probabilístico, las células pueden modelizarse en cualquier forma apropiada, por ejemplo, como colecciones de elipses en el espacio en 2D, colecciones de elipsoides en el espacio en 3D, y similares. Para hacer frente a las oclusiones y las ambigüedades de profundidad, el método puede requerir restricciones geométricas que se correspondan con el comportamiento físico esperado. Para mejorar la robustez, las imágenes se pueden capturar en uno o más planos focales.

Análisis de la expresión génica

En algunas realizaciones, se evalúan embriones o células pluripotentes midiendo la expresión génica. En tales realizaciones, el parámetro celular es el nivel de expresión de un gen o un perfil de expresión génica. La determinación de la expresión de uno o más genes, es decir, la obtención de un perfil de expresión o la evaluación de la expresión, puede hacerse midiendo los transcritos de ácidos nucleicos, por ejemplo los mRNA del uno o más genes de interés, por ejemplo un perfil de expresión de ácidos nucleicos; o midiendo los niveles de uno o más proteínas/polipéptidos diferentes que son productos de la expresión de uno o más genes de interés, por ejemplo, un perfil de expresión proteómico. En otras palabras, los términos "perfil de expresión" y "evaluación de la expresión" se utilizan ampliamente para incluir un perfil de expresión génica a nivel del RNA o al nivel de las proteínas.

En algunas realizaciones, la expresión de genes puede evaluarse por la obtención de un perfil de expresión de ácidos nucleicos, donde se determina la cantidad o nivel de uno o más ácidos nucleicos en la muestra, por ejemplo, el transcrito de ácido nucleico de uno o más genes de interés. En estas realizaciones, la muestra que se analiza para generar el perfil de expresión es una muestra de ácidos nucleicos. La muestra de ácidos nucleicos comprende una pluralidad o población de ácidos nucleicos distintos que incluye la información de la expresión de los genes de interés del embrión o de la célula que se analiza. El ácido nucleico puede incluir ácidos nucleicos RNA o DNA, por ejemplo, mRNA, cRNA, cDNA, etc., siempre y cuando la muestra retenga la información de la expresión de la célula hospedante o del tejido a partir del cual se obtiene. La muestra puede prepararse de varias formas diferentes, como se conoce en la técnica, por ejemplo, por el aislamiento del mRNA de una célula, donde el mRNA aislado se utiliza como tal, se amplifica, se emplea para preparar cDNA, cRNA, etc., como es conocido en la técnica de la expresión diferencial. La muestra pueden prepararse a partir de una sola célula, por ejemplo, una célula pluripotente de un cultivo de células pluripotentes de interés, o de una sola célula (blastómero) de un embrión de interés, o de varias células, por ejemplo, una fracción de un cultivo de células pluripotentes, o 2, 3 ó 4, o más blastómeros de un embrión de interés, usando protocolos estándares.

El perfil de expresión puede generarse a partir de la muestra inicial de ácidos nucleicos usando cualquier protocolo conveniente. Si bien se conocen una variedad de maneras diferentes de generación de perfiles de expresión, tales como las empleadas en el campo del análisis de la expresión génica diferencial, un tipo representativo y conveniente de protocolo para la generación de perfiles de expresión es un protocolo de generación de perfiles de expresión génica basado en matrices (chips). Tales aplicaciones son ensayos de hibridación en los cuales se emplea un ácido nucleico que presenta ácidos nucleicos "sonda" para cada uno de los genes que se ensayaron/perfilaron en el perfil que se ha de generar. En estos ensayos, se prepara en primer lugar una muestra de los ácidos nucleicos diana a partir de la muestra inicial de ácidos nucleicos que se analiza, donde la preparación puede incluir el marcaje de los ácidos nucleicos diana con un marcador, por ejemplo, un miembro de un sistema productor de señales. Después de la preparación de la muestra del ácido nucleico diana, la muestra se pone en contacto con la matriz en condiciones de hibridación, con lo cual se forman complejos entre los ácidos nucleicos diana que son complementarios a las secuencias de las sondas unidas a la superficie de la matriz. Se detecta luego la presencia de complejos hibridados, cualitativa o cuantitativamente.

La tecnología de hibridación específica que puede ser puesta en práctica para generar los perfiles de expresión empleados en los presentes métodos incluye la tecnología descrita en las Patentes de EE.UU. N° 5.143.854; 5.288.644; 5.324.633; 5.432.049; 5.470.710; 5.492.806; 5.503.980; 5.510.270; 5.525.464; 5.547.839; 5.580.732; 5.661.028; 5.800.992; las descripciones de las cuales se incorporan en la presente memoria como referencia; así como también los documentos WO 95/21265; WO 96/31622; WO 97/10365; WO 97/27317; EP 373203; y EP 785280. En estos métodos, una matriz de ácidos nucleicos "sonda" que incluye una sonda para cada uno de los genes determinativos del fenotipo cuya expresión se analiza, se pone en contacto con los ácidos nucleicos diana como se ha descrito anteriormente. El contacto se lleva a cabo en condiciones de hibridación, por ejemplo, condiciones de hibridación estrictas, y el ácido nucleico no unido se elimina posteriormente. El término "condiciones de ensayo estrictas", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a las condiciones que son compatibles con la producción de pares de unión de ácidos nucleicos, por ejemplo, los ácidos nucleicos que están unidos a una superficie y los que están en la fase de solución, con la complementariedad suficiente para proporcionar el nivel deseado de especificidad en el ensayo, mientras que son menos compatibles con la formación de pares de unión entre los miembros de unión de complementariedad insuficiente para proporcionar la especificidad deseada. Las condiciones de ensayo estrictas son la suma o la combinación (totalidad) tanto de las condiciones de hibridación como de las condiciones de lavado.

El patrón resultante del ácido nucleico hibridado proporciona información referente a la expresión de cada uno de los genes que han sido sondados, donde la información de expresión es en términos de si el gen se expresa o no y, típicamente, a qué nivel, donde los datos de la expresión, es decir, el perfil de expresión (por ejemplo, en la forma de un transcriptosoma), pueden ser tanto cualitativos como cuantitativos.

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

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

Si bien se conocen en la técnica una variedad de maneras diferentes de ensayos de los niveles de proteína, un tipo representativo y conveniente de protocolo para el ensayo de los niveles de proteína es el ELISA. En los ensayos ELISA y los basados en ELISA, uno o más anticuerpos específicos para las proteínas de interés se pueden inmovilizar sobre una superficie sólida seleccionada, preferiblemente una superficie que exhibe una afinidad por la proteína, tal como los pocillos de una placa de microtitulación de poliestireno. Después de lavado para eliminar el material adsorbido incompletamente, los pocillos de la placa del ensayo se recubren con una proteína "bloqueadora" no específica que se sabe que es antigénicamente neutra respecto a la muestra del ensayo, tales como seroalbúmina bovina (BSA), caseína o soluciones de leche en polvo. Esto permite el bloqueo de los sitios de adsorción no específicos en la superficie inmovilizante, reduciendo así la señal de fondo causada por la unión no específica del antígeno sobre la superficie. Después de lavado para eliminar la proteína bloqueadora no unida, la superficie inmovilizante se pone en contacto con la muestra que se ha de analizar en condiciones que conduzcan a la formación de complejos inmunitarios (antígeno/anticuerpo). Tales condiciones incluyen la dilución de la muestra con diluyentes tales como BSA o gamma globulina bovina (BGG) en solución salina tamponada de fosfato (PBS)/Tween o PBS/Triton-X 100, los cuales también tienden a ayudar en la reducción de la señal de fondo no específica, y dejar la muestra incubando durante aproximadamente 2-4 horas a temperaturas del orden de aproximadamente 25°-27°C (aunque se pueden usar otras temperaturas). Después de la incubación, se lava la superficie en contacto con el antisuero para eliminar el material que no haya formado el complejo inmunitario. Un procedimiento de lavado ilustrativo incluye un lavado con una solución tal como PBS/Tween, PBS/Triton-X 100 o

tampón de borato. La existencia y la cantidad de formación del complejo inmunitario pueden ser determinadas luego sometiéndolo al complejo inmunitario unido a un segundo anticuerpo que tenga especificidad para la diana que difiere de la del primer anticuerpo y detectando la unión del segundo anticuerpo. En ciertas realizaciones, el segundo anticuerpo tendrá una enzima asociada, por ejemplo ureasa, peroxidasa o fosfatasa alcalina, la cual generará un precipitado de color por incubación con un sustrato cromógeno apropiado. Por ejemplo, se puede emplear una anti-IgG humana conjugada con ureasa o con peroxidasa, durante un período de tiempo y bajo condiciones que favorezcan el desarrollo de la formación del complejo inmunitario (por ejemplo, la incubación durante 2 horas a temperatura ambiente en una solución que contiene PBS, tal como PBS/Tween). Después de dicha incubación con el segundo anticuerpo y el lavado para eliminar el material no unido, se cuantifica la cantidad del marcador, por ejemplo, por incubación con un sustrato cromógeno, tal como urea y púrpura de bromocresol, en el caso de un marcador de ureasa, o el ácido 2,2'-azino-di-(3-etil-benzotiazolina)-6-sulfónico (ABTS) y H₂O₂, en el caso de un marcador de peroxidasa. La cuantificación se logra entonces midiendo el grado de generación de color, por ejemplo, usando un espectrofotómetro de espectro visible.

El formato precedente puede alterarse uniéndolo primero la muestra a la placa de ensayo. Luego, se incuban el anticuerpo primario con la placa de ensayo, seguido por la detección del anticuerpo primario unido usando un segundo anticuerpo marcado con especificidad para el anticuerpo primario.

El sustrato sólido sobre el cual se inmovilizan el anticuerpo o los anticuerpos puede estar hecho de una amplia variedad de materiales y tener una amplia variedad de formas, por ejemplo, placa de microtitulación, microperla, tira reactiva, partícula de resina, etc. El sustrato puede elegirse para maximizar las relaciones de señal a ruido, para minimizar la unión de la señal fondo, así como para facilitar la separación y el coste. Los lavados se pueden efectuar de la manera más apropiada para el sustrato que se use, por ejemplo, por la retirada de una perla o tira reactiva de un depósito, vaciando o diluyendo un depósito, tal como un pocillo de placa de microtitulación, o lavando una perla, partícula, columna cromatográfica o filtro, con una solución de lavado o disolvente.

Alternativamente, se pueden emplear métodos no basados en ELISA para medir los niveles de una o más proteínas en una muestra. Ejemplos representativos incluyen, aunque sin limitación, espectrometría de masas, matrices proteómicas, tecnología de microesferas xMAP™, citometría de flujo, transferencias tipo Western e inmunohistoquímica.

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

En la generación del perfil de expresión, en algunas realizaciones una muestra se analiza para generar un perfil de expresión que incluya los datos de expresión de al menos un gen/proteína, a veces una pluralidad de genes/proteínas, donde por pluralidad se entiende al menos dos genes/proteínas diferentes y, frecuentemente, al menos aproximadamente 3, típicamente al menos aproximadamente 10 y más generalmente al menos aproximadamente 15 genes/proteínas diferentes o más, tales como 50 o más, o 100 o más, etc.

En el sentido más amplio, la evaluación de la expresión puede ser cualitativa o cuantitativa. Como tal, en el caso en el que la detección sea cualitativa, los métodos proporcionan una lectura o evaluación, por ejemplo, la determinación, de si el analito diana, por ejemplo, el ácido nucleico o producto de expresión, está presente o no en la muestra que se analiza. Aún en otras realizaciones, los métodos proporcionan una detección cuantitativa de si el analito diana está presente en la muestra que se analiza, es decir, una evaluación o determinación de la cantidad real o abundancia relativa del analito diana, por ejemplo, el ácido nucleico o la proteína en la muestra que se analiza. En tales realizaciones, la detección cuantitativa puede ser absoluta o relativa, si el método es un método de detección de dos o más analitos diferentes, por ejemplo, ácidos nucleicos o proteínas diana, en una muestra. Como tal, el término "cuantificar" cuando se utiliza en el contexto de cuantificar en una muestra un analito diana, por ejemplo, ácido(s) nucleico(s) o proteína(s), se puede referir a la cuantificación absoluta o relativa. La cuantificación absoluta puede lograrse por la inclusión de concentraciones conocidas de uno o más analitos de control y referenciando, es decir, normalizando, el nivel detectado del analito diana con los analitos de control conocidos (por ejemplo, por generación de una curva patrón). Alternativamente, la cuantificación relativa se puede lograr por comparación de los niveles o cantidades detectados entre dos o más analitos diana diferentes para proporcionar una cuantificación relativa de cada uno de los dos o más analitos diferentes, por ejemplo, de uno con respecto al otro.

Los ejemplos de genes cuyos niveles de expresión son predictivos del potencial de desarrollo del cigoto incluyen: Cofilin (NM_005507), DIAPH1 (NM_001079812, NM_005219), ECT2 (NM_018098), MYLC2/MYL5 (NM_002477), DGCR8 (NM_022720), Dicer/DICER1 (NM_030621, NM_177438), TARBP2 (NM_004178, NM_134323, NM_134324), CPEB1 (NM_001079533, NM_001079534, NM_001079535, NM_030594), Symplekin/SYMPK (NM_004819), YBX2 (NM_015982), ZAR1 (NM_175619), CTNNB1 (NM_001098209, NM_001098210, NM_001098210, NM_001904), DNMT3B (NM_006892, NM_175848, NM_175849, NM_175850), TERT (NM_198253, NM_198255), YY1 (NM_003403), IFGR2/IFNGR2 (NM_005534), BTF3 (NM_001037637, NM_001207) y NELF (NM_001130969, NM_001130970, NM_001130971, NM_015537). Otros genes cuyos niveles de expresión pueden servir como parámetros celulares predictivos del potencial de desarrollo del embrión se proporcionan en la Fig. 8. Para llegar a una medición del nivel de expresión génica, se evalúa frecuentemente el nivel de expresión y

luego se normaliza con respecto a un control estándar, por ejemplo, el nivel de expresión de un gen en la muestra que se sabe que es constante a través del desarrollo, por ejemplo GAPDH o RPLPO, o de un gen cuya expresión en ese punto de tiempo es conocida.

Los niveles de expresión génica se pueden determinar a partir de una sola célula, por ejemplo un blastómero proveniente de un embrión de interés, o un ovocito aislado, o una célula aislada de un cultivo de células madre, etc., o se pueden determinar a partir de un embrión, por ejemplo de 2, 3 ó 4, o más blastómeros de un embrión de interés, hasta el embrión de interés completo e incluyéndolo, o de múltiples células de un cultivo de células madre, hasta el cultivo completo de células madre e incluyéndolo, etc.

En otros aspectos, la presente invención comprende un protocolo para llevar a cabo la genotipificación y el análisis de la expresión génica simultáneos en una sola célula. Para los embriones, esto se puede usar para mejorar el diagnóstico genético pre-implantacional (DGP), un procedimiento donde se retira una sola célula de un embrión y se analiza su DNA para detectar los defectos cariotípicos o la presencia de genes de enfermedades específicas. Nuestro método permite el análisis simultáneo de la expresión génica y de los genes. El método comprende los siguientes pasos: (1) recoger una única célula en un pequeño volumen de medio o tampón, (2) realizar una transcripción inversa de una sola etapa y una amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando una mezcla de cebadores de genotipificación y de análisis de expresión génica, (3) recoger una parte alícuota del cDNA amplificado después de menos de 18 ciclos de PCR para preservar la linealidad de la amplificación, (4) usar la parte alícuota de cDNA para realizar el análisis de expresión génica con técnicas estándares, tal como PCR cuantitativa en tiempo real, (5) usar la muestra restante para realizar una segunda ronda de PCR para amplificar aún más la información genética para los fines de la genotipificación y (6) realizar la genotipificación usando técnicas estándares, tal como electroforesis en gel.

Determinación del potencial de desarrollo a partir del análisis de imágenes y/o de la expresión génica

Una vez que se han obtenido las mediciones de los parámetros celulares, las mediciones se emplean para determinar el potencial de desarrollo del embrión/célula pluripotente. Como se mencionó anteriormente, los términos "potencial de desarrollo" y "competencia para el desarrollo" se refieren a la habilidad o capacidad de una célula pluripotente o tejido para crecer o desarrollarse. Por ejemplo, en el caso de un ovocito o embrión, el potencial de desarrollo puede ser la habilidad o capacidad del ovocito o embrión para crecer o desarrollarse hasta un blastocisto sano. Como otro ejemplo, en el caso de una célula madre, el potencial de desarrollo es la habilidad o capacidad para crecer o desarrollarse en una o más células de interés, por ejemplo una neurona, una célula muscular, un linfocito B o T, y similares. En algunas realizaciones, el potencial de desarrollo de un ovocito o embrión es la habilidad o la capacidad de ese ovocito o embrión para desarrollarse hasta un blastocisto sano; para implantarse satisfactoriamente en un útero; para pasar la gestación; y/o para nacer vivo. En algunas realizaciones, el potencial de desarrollo de una célula pluripotente es la habilidad o capacidad de dicha célula pluripotente de desarrollarse en una o más células de interés, por ejemplo una neurona, una célula muscular, un linfocito B o T y similares; y/o contribuir a un tejido de interés *in vivo*.

Por "buen potencial de desarrollo" se entiende que el embrión/célula pluripotente es estadísticamente probable que se desarrolle como se desea, es decir, tiene un 55%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o más de probabilidad, por ejemplo 100% de probabilidad, de desarrollarse como se desea. En otras palabras, 55 de cada 100, 60 de cada 100, 70 de cada 100, 80 de cada 100, 90 de cada 100, 95 de cada 100 o 100 de cada 100 embriones o células pluripotentes que demuestran mediciones de parámetros celulares utilizados para llegar a la determinación del buen potencial de desarrollo, de hecho, continúan hasta desarrollarse como se desea. Contrariamente, por "potencial de desarrollo deficiente" se entiende que el embrión/célula pluripotente no es estadísticamente probable que se desarrolle como se desea, es decir, tiene un 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5% o menos de probabilidad, por ejemplo, 0% de probabilidad, de desarrollarse como se desea. En otras palabras, solamente 50 de cada 100, 40 de cada 100, 30 de cada 100, 20 de cada 100, 10 de cada 100 o 5 de cada 100 o menos de los embriones o células pluripotentes que demuestran mediciones de parámetros celulares utilizados para llegar a la determinación del potencial de desarrollo deficiente, continúan de hecho hasta desarrollarse como se desea. Tal como se usa en la presente memoria, los embriones y células pluripotentes "normales" o "sanos demuestran buen potencial de desarrollo, mientras que los embriones y células pluripotentes "anormales" muestran un potencial de desarrollo deficiente.

En algunas realizaciones, la medición del parámetro celular se usa directamente para determinar el potencial de desarrollo del embrión/célula pluripotente. En otras palabras, el valor absoluto de la medición por sí mismo es suficiente para determinar el potencial de desarrollo. Ejemplos de esto en realizaciones que usan técnicas de imagen secuenciales para medir los parámetros celulares incluyen, sin limitación, los siguientes, cualquiera de los cuales solo o en combinación son indicativos de buen potencial de desarrollo en un embrión humano: (a) una citocinesis 1 que dura aproximadamente 0-30 minutos, por ejemplo, aproximadamente 6-20 minutos, de media aproximadamente 12-14 minutos; (b) un ciclo celular 1 que dura aproximadamente 20-27 horas, por ejemplo, aproximadamente 25-27 horas; (c) un intervalo de tiempo entre la resolución de la citocinesis 1 y el comienzo de la citocinesis 2 que es aproximadamente 8-15 horas, por ejemplo, aproximadamente 9-13 horas, con un valor medio de aproximadamente 11 +/- 2,1 horas; (d) un intervalo de tiempo, es decir, sincronía entre el comienzo de la citocinesis 2 y el comienzo de la citocinesis 3 que es aproximadamente 0-5 horas, por ejemplo, aproximadamente 0-3 horas, con un tiempo medio de aproximadamente 1 +/- 1,6 horas. Los ejemplos de mediciones directas, cualquiera de las

cuales, solas o en combinación, son indicativas de potencial de desarrollo deficiente en un embrión humano, incluyen, sin limitación: (a) una citocinesis 1 que dura más de aproximadamente 30 minutos, por ejemplo, aproximadamente 32, 35, 40, 45, 50, 55 o 60 minutos o más; (b) un ciclo celular 1 que dura más de aproximadamente 27 horas, por ejemplo, 28, 29 o 30 o más horas; (c) un intervalo de tiempo entre la resolución de la citocinesis 1 y el comienzo de la citocinesis 2 que dura más de 15 horas, por ejemplo, aproximadamente 16, 17, 18, 19 o 20 o más horas, o menos de 8 horas, por ejemplo, aproximadamente 7, 5, 4 o 3 o menos horas; (d) 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 medición del parámetro celular se emplea comparándola con una medición del parámetro celular de un embrión/célula pluripotente de referencia o control y usando el resultado de esta comparación para proporcionar una determinación del potencial de desarrollo del embrión/célula pluripotente. Los términos "referencia" y "control", tal como se usan en la presente memoria, significan un embrión o célula estandarizada que se usa para interpretar las mediciones de parámetros celulares de un embrión/célula pluripotente dados y asignarles una determinación del potencial de desarrollo. La referencia o control puede ser un embrión/célula pluripotente que se sabe que tiene un fenotipo deseado, por ejemplo, un buen potencial de desarrollo y por lo tanto puede ser un embrión/célula pluripotente de referencia positiva o de control. Alternativamente, el embrión/célula pluripotente de referencia/control puede ser un embrión/célula pluripotente que se sabe que no tiene el fenotipo deseado, y por lo tanto ser un embrión/célula pluripotente de referencia/control negativo.

En ciertas realizaciones, la(s) medición(s) obtenida(s) de un parámetro celular se compara(n) con una(s) medición(s) de un parámetro celular comparable proveniente de un solo embrión/célula pluripotente de referencia/control para obtener información sobre el fenotipo del embrión/célula pluripotente que se analiza. Aún en otras realizaciones, la(s) medición(s) obtenida(s) de un parámetro celular obtenido se compara(n) con la(s) medición(s) de un parámetro celular comparable a partir de dos o más embriones o células pluripotentes diferentes de referencia/control, para obtener más información en profundidad sobre el fenotipo del embrión/célula analizado. Por ejemplo, las mediciones del parámetro celular obtenidas del o de los embriones o de la o de las células pluripotentes que se analizan, se pueden comparar con un embrión o célula pluripotente tanto positivo como negativo para obtener información confirmada con respecto a si el embrión/célula tiene el fenotipo de interés.

Como ejemplo, la citocinesis 1 en un embrión humano normal, es decir, con buen potencial de desarrollo, es aproximadamente 0-30 minutos, más habitualmente alrededor de 6-20 minutos, de media aproximadamente 12-14 minutos, es decir, aproximadamente 1, 2, 3, 4 o 5 minutos, más habitualmente alrededor de 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 minutos, en algunos casos 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o hasta aproximadamente 30 minutos. Un periodo de tiempo más largo para completar la citocinesis 1 en el embrión que se analiza en comparación con el observado en un embrión normal de referencia es indicativo de potencial de desarrollo deficiente. Como un segundo ejemplo, el ciclo celular 1 en un embrión normal, es decir, desde el momento de la fecundación hasta la finalización de la citocinesis 1, se completa típicamente en aproximadamente 20-27 horas, más habitualmente en aproximadamente 25-27 horas, es decir, aproximadamente en 15, 16, 17, 18 o 19 horas, más habitualmente en aproximadamente 20, 21, 22, 23 o 24 horas y más habitualmente en aproximadamente 25, 26 o 27 horas. Un ciclo celular 1 que es más largo en el embrión que se analiza en comparación con el observado en un embrión normal de referencia es indicativo de potencial de desarrollo deficiente. Como un tercer ejemplo, la resolución de la citocinesis 1 y el comienzo de la citocinesis 2 en embriones humanos normales es aproximadamente 8-15 horas, más frecuentemente alrededor de 9-13 horas, con un valor medio de aproximadamente 11 +/- 2,1 horas; es decir, 6, 7 u 8 horas, más habitualmente alrededor de 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 analiza en comparación con el observado en un embrión normal de referencia es indicativo de potencial de desarrollo deficiente. Como un cuarto ejemplo, el intervalo de tiempo entre el comienzo de la citocinesis 2 y el comienzo de la citocinesis 3, es decir, la sincronía de la segunda y tercera mitosis, en embriones humanos normales es habitualmente alrededor de 0-5 horas, más habitualmente alrededor de 0, 1, 2 ó 3 horas, con un tiempo medio de aproximadamente 1 +/- 1,6 horas; un intervalo más largo entre la finalización de la citocinesis 2 y la citocinesis 3 en el embrión que se analiza en comparación con el observado en un embrión normal de referencia es indicativo de potencial de desarrollo deficiente. Finalmente, como un ejemplo de cómo pueden ser aplicada esta realización cuando se usan niveles de expresión génica como parámetros para evaluar el potencial de desarrollo, niveles de expresión inferiores de Cofilin, DIAPH1, ECT2, MYLC2, DGCR8, Dicer, TARBP2, CPEB1, Symplekin, YBX2, ZAR1, CTNNB1, DNMT3B, TERT, YY1, IFGR2, BTF3 y/o NELF, es decir, una expresión inferior en 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces o 100 veces, en embriones de 2 células que se analizan en comparación con la observada en un embrión normal de referencia de 2 células son indicativos de potencial de desarrollo deficiente, mientras que la expresión que es igual a o mayor que la observada en un embrión normal de referencia de 2 células es indicativa de buen potencial de desarrollo. Otros ejemplos se pueden derivar de datos empíricos, por ejemplo, observando uno o más embriones o células pluripotentes de referencia junto al embrión/célula pluripotente de ensayo. Puede emplearse cualquier embrión/célula pluripotente de referencia, por ejemplo, una muestra normal de referencia con buen potencial de desarrollo o una muestra anormal de referencia con potencial de desarrollo deficiente. En algunos casos, se puede emplear más de una muestra de referencia, por ejemplo, se puede usar tanto una muestra normal de referencia como una muestra anormal de referencia.

En algunas realizaciones, puede ser deseable usar mediciones de parámetros celulares que se obtienen por

microscopía secuencial o por perfiles de expresión, pero no tanto por microscopía secuencial como por perfiles de expresión. En otras realizaciones, puede ser deseable usar mediciones de parámetros celulares que se obtienen por microscopía secuencial, así como mediciones de parámetros celulares obtenidas por perfiles de expresión.

5 Como se estudió anteriormente, se pueden medir y emplear uno o más parámetros para determinar el potencial de desarrollo de un embrión o célula pluripotente. En algunas realizaciones, una medición de un solo parámetro puede ser suficiente para llegar a una determinación del potencial de desarrollo. En algunas realizaciones, puede ser deseable emplear mediciones de más de un parámetro, por ejemplo, 2 parámetros celulares, 3 parámetros celulares o 4 o más parámetros celulares.

10 En ciertas realizaciones, puede ser deseable el análisis de múltiples parámetros ya que dicho análisis de múltiples parámetros puede proporcionar una mayor sensibilidad y especificidad. Por sensibilidad se entiende la proporción de positivos reales que se han identificado correctamente como tales. Esto puede ser representado matemáticamente como:

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

15 De este modo, en un método en el cual los “positivos” son los embriones que tienen buen potencial de desarrollo, es decir, que se desarrollarán hasta blastocistos, y “negativos” son los embriones que tienen potencial de desarrollo deficiente, es decir, que no se desarrollarán hasta blastocistos, una sensibilidad del 100% significa que el ensayo reconoce como tales todos los embriones que se desarrollarán hasta blastocistos. En algunas realizaciones, la
20 sensibilidad del ensayo puede ser aproximadamente 70%, 80%, 90%, 95%, 98% o más, por ejemplo 100%. Por especificidad se entiende la proporción de negativos que son correctamente identificados como tales. Esto puede ser representado matemáticamente como

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

25 De este modo, en un método en el cual los positivos son los embriones que tienen buen potencial de desarrollo, es decir, que se desarrollarán hasta blastocistos, y negativos son los embriones que tienen potencial de desarrollo deficiente, es decir, que no se desarrollarán hasta blastocistos, una especificidad del 100% significa que el ensayo
30 reconoce como tales todos los embriones que no se desarrollarán hasta blastocistos, es decir, se detendrán antes del estadio de blastocisto. En algunas realizaciones, la especificidad del ensayo puede ser aproximadamente 70%, 80%, 90%, 95%, 98% o más, por ejemplo 100%.

35 Como se demuestra en los apartados de ejemplos siguientes y en la Figura 7, el uso de tres parámetros proporciona una sensibilidad del 94% y una especificidad del 93%, con un punto de corte de 3 veces las desviaciones típicas de la distribución de blastocistos. En otras palabras, los métodos de la invención son capaces de identificar correctamente el número de embriones que se van a desarrollar en blastocistos el 94% de las veces (sensibilidad) y el número de embriones que se van a detener antes del estadio de blastocistos el 93% de las veces (especificidad). Además, los valores medios especificados y/o los puntos de corte se pueden modificar dependiendo del conjunto de datos usados para calcular estos valores así como la aplicación específica.

40 En algunas realizaciones, la evaluación de un embrión o célula pluripotente incluye la generación de un informe escrito que incluye la evaluación por el experto del embrión/célula pluripotente objeto, por ejemplo, una “evaluación del potencial de desarrollo”, una “evaluación de anomalías cromosómicas”, etc. Por lo tanto, un método en cuestión puede incluir además una etapa de generación o producción de un informe que proporciona los resultados de tal evaluación, pudiendo facilitarse dicho informe en forma de un medio electrónico (por ejemplo, una visualización electrónica en una pantalla de ordenador) o en forma de un medio tangible (por ejemplo, un informe impreso sobre
45 papel u otro medio tangible).

50 Un “informe”, tal como se describe en la presente memoria, es un documento electrónico o tangible que incluye elementos del informe que proporcionan información de interés relativa a una evaluación a la que se ha llegado por los métodos de la invención. Un informe objeto se puede generar total o parcialmente de forma electrónica. Un informe objeto incluye al menos una evaluación del potencial de desarrollo del embrión o célula pluripotente en cuestión, una evaluación de la probabilidad de la existencia de anomalías cromosómicas, etc. Un informe objeto puede incluir además una o más de entre: 1) información sobre la instalación del ensayo; 2) información sobre el proveedor del servicio; 3) datos del objeto; 4) datos de la muestra; 5) un apartado del informe con la evaluación detallada, proporcionando la información relativa a cómo se llegó a la evaluación, por ejemplo, a) las mediciones de los parámetros celulares tomadas, b) los valores de referencia empleados, si los hubiera; y 6) otras características.

El informe puede incluir información sobre la instalación del ensayo, información que es relevante para el hospital, clínica o laboratorio en el que se llevó a cabo la recogida de muestras y/o la generación de datos. La recogida de muestras puede incluir cómo se generó la muestra, por ejemplo, cómo se recogió de un sujeto y/o cómo se cultivó, etc. La generación de datos puede incluir cómo se adquirieron las imágenes o cómo se analizaron los perfiles de expresión génica. Esta información puede incluir uno o más detalles con relación a, por ejemplo, el nombre y la ubicación de la instalación de ensayo, la identidad del técnico de laboratorio que llevó a cabo el ensayo y/o que introdujo los datos de entrada, la fecha y hora en que se realizó el ensayo y/o se analizaron los resultados, la ubicación donde la muestra y/o los datos de los resultados se almacenaron, el número de lote de los reactivos (por ejemplo, kit, etc.) usados en el ensayo, y similares. Los campos del informe con esta información se pueden rellenar generalmente usando información proporcionada por el usuario.

El informe puede incluir información sobre el proveedor del servicio, que puede estar ubicado fuera del centro de salud en el que se encuentra el usuario, o dentro del centro sanitario. Los ejemplos de tal información pueden incluir el nombre y la ubicación del proveedor de servicios, el nombre del revisor y, cuando sea necesario o se desee, el nombre de la persona que llevó a cabo la preparación de las muestras y/o la generación de datos. Los campos del informe con esta información se pueden rellenar generalmente usando datos proporcionados por el usuario, los cuales se pueden proporcionar entre las selecciones previamente introducidas (por ejemplo, usando un menú desplegable). Otra información sobre el proveedor de servicios en el informe puede incluir información del contacto para la información técnica sobre el resultado y/o sobre el informe interpretativo.

El informe puede incluir un apartado de datos objeto, incluyendo la historia clínica de los sujetos de los cuales se han recogido los ovocitos o células pluripotentes, la edad del paciente, las características del ciclo de fecundación *in vitro* (por ejemplo, la tasa de fecundación, el nivel de la hormona estimulante del folículo (FSH) el día 3) y, cuando se recogen ovocitos, los parámetros de cohorte del cigoto/embrión (por ejemplo, número total de embriones). Estos datos del sujeto se pueden integrar para mejorar la evaluación del embrión y/o ayudar a determinar el número óptimo de embriones a transferir. El informe también puede incluir datos administrativos del sujeto (es decir, datos que no son esenciales para la evaluación del potencial de desarrollo), tales como información para identificar al sujeto (por ejemplo, nombre, fecha de nacimiento (Fec. Nac.) del sujeto, sexo, dirección postal y/o dirección de residencia, número del historial clínico (NHC), número de habitación y/o cama en un centro sanitario), información del seguro, y similares), el nombre del médico del paciente o de otro profesional sanitario que ordenó la evaluación del potencial de desarrollo y, si es diferente del médico solicitante, el nombre de un médico de la plantilla que es responsable del cuidado del paciente (por ejemplo, el médico de atención primaria).

El informe puede incluir un apartado de datos de la muestra, que puede proporcionar información sobre la muestra biológica analizada en la evaluación, tal como el tipo de muestra (embrión o célula pluripotente y tipo de célula pluripotente), cómo se manipuló la muestra (por ejemplo, temperatura de conservación, protocolos de preparación) y la fecha y hora de la recogida. Los campos del informe con esta información se pueden rellenar generalmente usando datos proporcionados por el usuario, algunos de los cuales se pueden proporcionar entre las selecciones previamente introducidas (por ejemplo, usando un menú desplegable).

El informe puede incluir un apartado de informe de evaluación, que puede incluir información relativa a cómo se llegó a las evaluaciones/determinaciones, tal como se describe en la presente memoria. El informe interpretativo puede incluir, por ejemplo, imágenes secuenciales del embrión o célula pluripotente que se analiza y/o resultados de la expresión génica. La parte de evaluación del informe, puede incluir también opcionalmente un apartado de una o más recomendaciones. Por ejemplo, cuando los resultados indican un buen potencial de desarrollo de un embrión, la recomendación puede incluir una recomendación de que se trasplante un número limitado de embriones en el útero durante el tratamiento de fecundación, como se recomienda en la técnica.

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

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

Utilidad

Como se estudió anteriormente, los métodos de la invención se pueden usar para evaluar embriones o células pluripotentes para determinar su potencial de desarrollo. Esta determinación del potencial de desarrollo se puede usar para guiar las decisiones y/o acciones clínicas. Por ejemplo, con el objetivo de aumentar las tasas de embarazo, los médicos suelen transferir múltiples embriones a las pacientes, lo que potencialmente da como

resultado embarazos múltiples que ponen en riesgo la salud tanto de la madre como de los fetos. Usando los resultados obtenidos a partir de los métodos de la invención, se determina antes del trasplante el potencial de desarrollo de los embriones que se transfieren para desarrollarse en fetos, lo que permite al profesional médico decidir cuántos embriones se han de transferir, de manera que se maximice la probabilidad de éxito de un embarazo a término al tiempo que se minimiza el riesgo.

Las evaluaciones realizadas siguiendo métodos de la invención pueden también encontrar uso en la clasificación de embriones o células pluripotentes en un grupo de embriones o células pluripotentes para su potencial de desarrollo. Por ejemplo, en algunos casos, múltiples embriones pueden ser capaces de desarrollarse en blastocistos, es decir, tendrán un buen potencial de desarrollo. Sin embargo, algunos embriones tendrán más probabilidades de alcanzar el estadio de blastocistos o convertirse en un blastocisto de mayor calidad que los otros, es decir, tendrán mejor potencial de desarrollo que otros embriones. En tales casos, se pueden usar métodos de la invención para clasificar los embriones en el grupo. En tales métodos, se miden uno o más parámetros celulares para cada embrión/célula pluripotente para llegar a la medición de un parámetro celular para cada embrión/célula pluripotente. La una o más mediciones de parámetros celulares de cada uno de los embriones o células pluripotentes se emplean luego para determinar el potencial de desarrollo de los embriones o células pluripotentes de unos con respecto a otros. En algunas realizaciones, se emplean las mediciones de parámetros celulares procedentes de cada uno de los embriones o células pluripotentes comparándolas directamente unas con otras para determinar el potencial de desarrollo de los embriones o células pluripotentes. En algunas realizaciones, se emplean las mediciones de los parámetros celulares de cada uno de los embriones o células pluripotentes comparando las mediciones de los parámetros celulares con una medición de un parámetro celular de un embrión/célula pluripotente de referencia para determinar los potenciales de desarrollo para cada embrión/célula pluripotente y comparando luego los potenciales de desarrollo determinados para cada embrión/célula pluripotente para determinar el potencial de desarrollo de los embriones o células pluripotentes de unos con respecto a otros. De esta manera, un profesional que evalúa, por ejemplo, múltiples cigotos/embriones, puede elegir para su transferencia solamente los embriones de mejor calidad, es decir, los que tienen el mejor potencial de desarrollo, a fin de maximizar las probabilidades de éxito de un embarazo a término al tiempo que se minimiza el riesgo.

Las evaluaciones realizadas siguiendo los métodos de la invención también pueden encontrar uso en la determinación del potencial de desarrollo de ovocitos que son madurados *in vitro* y de las células madre que se cultivan *in vitro*. La información sobre el potencial de desarrollo de los ovocitos obtenidos por los métodos de la invención puede guiar la selección de los ovocitos para la fecundación por parte del profesional, dando como resultado una mayor probabilidad de éxito en la obtención de blastocistos a partir de estos ovocitos. Asimismo, la información sobre el potencial de desarrollo de las células madre pueden informar al profesional para la selección de las células madre que se han de usar en los procedimientos para, por ejemplo, reconstituir o reemplazar un tejido *in vivo* en un sujeto que lo necesite.

Reactivos, dispositivos y kits

También se proporcionan reactivos, dispositivos y sus kits para llevar a la práctica uno o más de los métodos anteriormente descritos. Los reactivos, dispositivos y sus kits objetos pueden variar grandemente. Los reactivos y dispositivos de interés incluyen los mencionados anteriormente con respecto a los métodos de medición de cualquiera de los parámetros celulares antes mencionados, en donde dichos reactivos pueden incluir placas de cultivo, medios de cultivo, microscopios, programas informáticos de obtención de imágenes, programas informáticos de análisis de imágenes, cebadores de ácidos nucleicos, matrices de sondas de ácidos nucleicos, anticuerpos, reactivos de sistemas productores de señales, etc., dependiendo del protocolo de medición particular que se vaya a ejecutar. Por ejemplo, los reactivos pueden incluir cebadores de PCR que son específicos para uno o más de los genes Cofilin, DIAPH1, ECT2, MYLC2/MYL5, DGCR8, Dicer/DICER1, TARBP2, CPEB1, Symplekin/SYMPK, YBX2, ZAR1, CTNNB1, DNMT3B, TERT, YY1, IFGR2/IFNGR2, BTF3 y NELF, como se describió anteriormente. Otros ejemplos de reactivos incluyen matrices que comprenden sondas que son específicas para uno o más de los genes de interés, o anticuerpos para las proteínas codificadas por estos genes de interés.

Además de los componentes anteriores, los kits objetos incluirán además instrucciones para poner en práctica los métodos objetos. Estas instrucciones pueden estar presentes en los kits objetos en una variedad de formas, una o más de las cuales puede estar presente en el kit. Una de las formas en que estas instrucciones pueden estar presentes es como información impresa en un medio o sustrato adecuado, por ejemplo, un trozo o trozos de papel sobre las cuales está impresa la información, en el paquete del kit, en un prospecto del paquete, etc. Otro medio más sería un medio legible por ordenador, por ejemplo, un disquete, un CD, etc., sobre el cual se ha registrado la información. Otro medio más que puede estar presente es una dirección de una página web que puede usarse vía Internet para acceder a la información en un sitio lejano. Cualquier medio conveniente puede estar presente en los kits.

Obtención de imágenes celulares automatizadas con una disposición de microscopios

Algunos de los métodos descritos anteriormente requieren la capacidad de observar el desarrollo de los embriones y las células madre por medio de la obtención de imágenes secuenciales. Esto puede lograrse usando un sistema compuesto por una disposición de microscopios en miniatura de múltiples canales que se puede adaptar dentro de

una incubadora estándar. Esto permite obtener las imágenes de múltiples muestras rápida y simultáneamente, sin tener que mover físicamente las placas. Un prototipo ilustrativo, que se muestra en la Fig. 22, consiste en una disposición de microscopios de 3 canales con iluminación de campo oscuro, aunque podrían usarse otros tipos de iluminación. Por "tres canales", se entiende que hay tres microscopios independientes que obtienen simultáneamente imágenes de tres placas de cultivo distintas. Se usa un motor de pasos para ajustar la posición focal para enfocar o adquirir una pila de imágenes en 3D. Se usan LED de luz blanca para la iluminación, aunque se ha observado que para los embriones humanos el uso de LED de luz roja o del infrarrojo (IR) cercano puede mejorar la relación de contraste entre las membranas celulares y las porciones internas de las células. Esta relación de contraste mejorada puede ayudar al análisis de las imágenes, tanto manual como automatizado. Además, el movimiento a la región del infrarrojo puede reducir la fototoxicidad para las muestras. Las imágenes se capturan por cámaras web de bajo costo y alta resolución, pero pueden usarse otros tipos de cámaras.

Como se muestra en la Fig. 22, cada microscopio del sistema prototipo descrito anteriormente se usa para obtener imágenes de una placa de cultivo que puede contener en cualquier posición 1-30 embriones. El microscopio recoge la luz proveniente de un LED de luz blanca conectado a un disipador térmico para ayudar a disipar cualquier calor generado por el LED, el cual es muy pequeño para tiempos de exposición breves. La luz pasa a través de un parche de campo oscuro convencional para detener la luz directa, a través de una lente condensadora y encima de una "placa de Petri" marcada con espécimen, que es una placa de cultivo que aloja los embriones que se cultivan y estudian. La placa de cultivo puede tener pocillos que ayuden a mantener el orden de los embriones y evitar que se muevan mientras que la placa se lleva hacia y desde la incubadora. Los pocillos pueden colocarse suficientemente juntos de modo que los embriones puedan compartir la misma gota de medios. La luz dispersa se hace pasar luego a través de un objetivo del microscopio, luego a través de un doblete acromático y por un sensor CMOS. El sensor CMOS actúa como una cámara digital y está conectado a un ordenador para el análisis y seguimiento de imágenes como se ha descrito anteriormente.

Este diseño es fácilmente ampliable para proporcionar significativamente más canales y diferentes técnicas de iluminación, y se puede modificar para acomodar dispositivos fluidos para alimentar las muestras. Además, el diseño puede integrarse con un sistema de control de retroalimentación, donde las condiciones de cultivo, tales como temperatura, CO₂ (para controlar el pH), y los medios se optimizan en tiempo real sobre la base de la retroalimentación y a partir de los datos de las imágenes. Este sistema se usó para adquirir vídeos secuenciales del desarrollo embrionario humano, lo cual tiene utilidad en la determinación de la viabilidad de los embriones para los procedimientos de fecundación *in vitro* (FIV). Otras aplicaciones incluyen la terapia con células madre, el cribado de fármacos y la ingeniería de tejidos.

En una realización del dispositivo, la iluminación se proporciona por un diodo emisor de luz blanca (LED) Luxeon montado sobre un disipador de calor de aluminio y accionado por un controlador de corriente regulada BuckPuck. La luz procedente del LED se hace pasar a través de una lente colimadora. La luz colimada pasa luego a través de un tope de parche mecanizado por láser personalizado, tal como se muestra en la Fig. 22, y se enfoca en un cono hueco de luz que usa 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 se dispersa por la muestra se recoge. En una realización, se usan objetivos Olympus con 20 aumentos, aunque se pueden usar aumentos menores para aumentar el campo de visión, o se pueden usar mayores aumentos para aumentar la resolución. La luz recogida se pasa luego a través de una lente de doblete acromático (es decir, una lente de tubo) para reducir los efectos de la aberración cromática y esférica. Alternativamente, la luz recogida desde el objetivo que toma la imagen se puede hacer pasar a través de otro objetivo, que apunta en dirección opuesta, que actúa como un reemplazo de la lente de tubo. En una configuración, el objetivo que toma la imagen puede ser un objetivo de 10 aumentos, mientras que el objetivo de lente de tubo puede ser un objetivo 4 aumentos. La imagen resultante es capturada por un sensor CMOS con una resolución de 2 megapíxeles (1600 x 1200 píxeles). También se pueden usar diferentes tipos de sensores y resoluciones.

La Fig. 23A muestra una fotografía de la disposición de microscopios multicanal, que tiene 3 microscopios idénticos. Todos los componentes ópticos están montados en tubos de lentes. En el funcionamiento del sistema de la disposición, las placas de Petri se cargan en plataformas acrílicas que están montadas sobre platinas manuales con inclinación en 2 ejes, lo que permite el ajuste del plano de la imagen con respecto al eje óptico. Estas platinas están fijadas en la base del microscopio y no se mueven después de la alineación inicial. Los módulos de iluminación, que consisten en los LED, lentes colimadoras, topes de parches, y lentes condensadoras, se montan en las platinas xyz manuales para posicionar y enfocar la luz de la iluminación. Los módulos para la obtención de las imágenes, que constan de los objetivos, las lentes acromáticas y los sensores CMOS, también se montan en las platinas manuales xyz para posicionar el campo de visión y enfocar los objetivos. Los 3 módulos de obtención de imágenes se acoplan a portaobjetos lineales y se apoyan por un brazo de palanca única, que se acciona por un motor de pasos. Esto permite el enfoque controlado por ordenador y la captura automática de pilas de imágenes. Se pueden usar otros métodos de enfoque automático, así como de accionamiento.

La disposición de microscopios se colocó dentro de una incubadora estándar, como se muestra en la Fig. 23B. Los sensores de imagen CMOS están conectados por conexión USB a un solo nodo situado en el interior de la incubadora, el cual se envía a un PC externo, junto con otras líneas de comunicación y de energía. Todos los cables eléctricos salen de la incubadora a través del centro de un tapón de caucho sellado con pegamento de silicona.

La disposición de microscopios descrita anteriormente se usó para registrar imágenes secuenciales del desarrollo temprano del embrión humano y el crecimiento documentado desde el cigoto a través de los estadios de blastocisto. Se hizo un seguimiento de un total de 242 embriones en cuatro experimentos diferentes. Fuera de este grupo, a 100 se les tomaron imágenes hasta el día 5 ó 6; y los otros se retiraron de las estaciones de imágenes en diversos tiempos para el análisis de la expresión génica. En la Fig. 24 se muestra una captura de pantalla del programa informático de captura de imágenes y los embriones a los que se les tomaron imágenes. Las imágenes se capturaron cada 5 minutos, con aproximadamente 1 segundo de exposición a luz tenue por imagen. La cantidad total de luz recibida por las muestras fue equivalente a 24 minutos de exposición continua, similar al nivel total experimentado en una clínica de fecundación *in vitro* durante la manipulación. La duración de 1 segundo de exposición a la luz por imagen puede reducirse. Antes de trabajar con los embriones humanos, realizamos amplios experimentos de control con embriones pre-implantacionales de ratón para asegurarnos de que tanto la velocidad de formación de blastocistos como los patrones de expresión génica no se vieron afectados por el proceso de obtención de imágenes.

Las Figs. 25 y 26 muestran imágenes seleccionadas de las secuencias secuenciales. Se muestran imágenes para el día 1, el día 2,5, el día 4 y el día 5,5. Para la secuencia mostrada en la Fig. 25, se desarrollaron 3 de los 9 embriones hasta blastocistos y para la secuencia mostrada en la Fig. 26, se desarrollaron 5 de los 12 embriones hasta blastocistos. Los embriones individuales se siguieron a lo largo del tiempo, a pesar de que sus posiciones en el campo fotográfico se desplazaron cuando los embriones se sometieron a un cambio de medio el día 3. El uso de medios secuenciales es necesario para cumplir con los requerimientos específicos de los estadios de los embriones en desarrollo. Durante el cambio de medios, los embriones se retiraron de la estación de obtención de imágenes durante unos pocos minutos y se transfirieron a nuevas placas de Petri. Con el fin de mantener el seguimiento de la identidad de cada embrión durante el cambio de medios, la transferencia de las muestras de una placa a otra se grabó en video para comprobar que los embriones no se mezclaban. Este proceso también se usó durante la recogida de las muestras para el análisis de la expresión génica. El problema del seguimiento de la identidad del embrión se puede mitigar por el uso de pocillos para ayudar a disponer los embriones en un orden particular.

Placas de Petri con micro-pocillos

Cuando se transfieren placas de Petri entre las diferentes estaciones, los embriones a veces pueden moverse, haciendo difícil mantener el seguimiento de la identidad del embrión. Esto plantea un reto cuando se realiza la obtención de imágenes secuenciales en una estación y los embriones se mueven posteriormente a una segunda estación para la selección de los embriones y su transferencia. Un método es cultivar los embriones en placas de Petri individuales. Sin embargo, esto requiere que cada embrión tenga su propia gota de medios. En un procedimiento típico de FIV, por lo general es deseable cultivar todos los embriones de un paciente en la misma placa de Petri y en la misma gota de medios. Para solucionar este problema, hemos diseñado una placa de Petri personalizada con micro-pocillos. Esto evita que los embriones se muevan y mantiene su disposición en la placa de Petri cuando se transfieren a y desde la incubadora o las estaciones de obtención de imágenes. Además, los pocillos son lo suficientemente pequeños y están suficientemente separados de tal manera que pueden compartir la misma gota de medios y ser observados todos simultáneamente por el mismo microscopio. La superficie inferior de cada micro-pocillo tiene un acabado de calidad óptica. La Fig. 27A muestra un dibujo con dimensiones para una realización. En esta versión, hay 25 micro-pocillos suficientemente separados con un campo de visión de 1,7 x 1,7 mm. La Fig. 27B muestra una vista en 3D de los micro-pocillos, que están rebajados aproximadamente 100 micrómetros en la superficie de la placa. En la placa se incluyen marcadores fiduciarios, incluidos letras, números y otras marcas, para ayudar a la identificación.

Todas las referencias citadas en la presente memoria se incorporan como referencia en su totalidad.

Ejemplos

Los ejemplos siguientes se presentan con el fin de proporcionar a los expertos en la técnica una divulgación y una descripción de cómo realizar y usar la presente invención, y no están destinados a limitar el alcance de lo que los inventores consideran su invención ni tienen la intención de representar que los experimentos que siguen son todos o los únicos experimentos realizados. Se han hecho esfuerzos para asegurar la exactitud de los números usados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.), pero se debe contar con algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular medio ponderal, la temperatura está en grados Centígrados y la presión es o está próxima a la atmosférica.

Fuente de la muestra

Todos los embriones usados en este estudio se recogieron durante un período de varios años y fueron fecundados y crioconservados por varios embriólogos. El número medio de embriones por paciente en nuestro estudio fue 3, y se incluyeron todos los grupos de edad que se encontraron en un centro de FIV habitual. Notablemente, todos los embriones usados para estos experimentos se generaron por FIV (en oposición a la inyección intracitoplásmica de espermatozoides, en lo sucesivo abreviadamente IIE), de modo que los embriones procedían de espermatozoides que tenía una función relativamente normal (al menos en términos de su capacidad para penetrar el cúmulo, la zona, y el oolema y

formar un pronúcleo). Los protocolos de estimulación fueron protocolos largos estándares de Lupron (cdc.gov/art). La crioconservación de embriones humanos sobrantes se llevó a cabo colocándolos en un medio de congelación (1,2-propanodiol 1,5 M + sacarosa 0,2 M) durante 25 minutos a temperatura ambiente (22 + 2°C). Los embriones se congelaron a continuación, usando un protocolo de congelación lenta (-1°C/min a -6,5°C; mantenimiento durante 5 minutos; siembra; mantenimiento durante 5 minutos; -0,5°C/min a -80°C, inmersión en nitrógeno líquido). Comité. No pudo asociarse a los embriones ninguna información sanitaria protegida.

Se validó un gran conjunto de embriones crioconservados y se realizaron las siguientes observaciones: 1) Los embriones demostraron el ritmo indicativo del desarrollo embrionario normal, en términos de puntos de referencia que incluyen: escisión hasta 2 células (ocurrió tempranamente el día 2), comienzo de la degradación del RNA (ocurrió los días 1 a 3), escisión hasta 4 y 8 células (ocurrió al final del día 2 y del día 3, respectivamente), activación del genoma embrionario (el día 3 en el estadio de 8 células), y formación de la mórula y el blastocisto (ocurrió en los días 4 y 5, respectivamente). 2) Los embriones demostraron una eficacia en alcanzar el estadio de blastocisto que es típica de los embriones obtenidos en un entorno clínico. Esto es debido probablemente al hecho de que los embriones se crioconservaron en es estadio 2PN y representaban la disposición de embriones encontrada en una clínica de FIV puesto que no se realizó ninguna "preselección" de los que se desarrollarían y no se desarrollarían antes de la crioconservación en el estadio de 1 célula (como es típico de los embriones crioconservados más tarde en el desarrollo el día 3 o en los estadios de blastocisto). Por lo tanto, nuestros datos confirman que estos embriones mostraron tasas similares de formación de blastocisto en comparación con los observados en las clínicas típicas de FIV. 3) Los estudios previos han demostrado que los embriones que se congelan en estadio 2PN presentan un potencial similar para el desarrollo, implantación, embarazo clínico y parto, en comparación con los embriones recientes. Otros estudios también han mostrado resultados similares para los ovocitos congelados lo que sugiere que los eventos más tempranos del desarrollo embrionario humano mantienen un ritmo apropiado después de la crioconservación. 4) Nos concentramos en los parámetros que no dependían del momento de la fecundación o del tiempo de descongelación. El primer parámetro que medimos (duración de la primera citocinesis) es de corta duración (aproximadamente de 10-15 minutos) y no depende del momento de la fecundación en este estudio (que puede medirse independientemente en todos los embriones, independientemente del resultado final). Más aún, todos los parámetros subsiguientes se miden con respecto a este punto de medición inicial y se comparan entre los embriones que se desarrollan con éxito hasta blastocisto y los que no lograron hacerlo. 5) Finalmente, hacemos notar que se sabe que los embriones recientes (sin congelar) que están en el estadio 3PN se desarrollan a lo largo del mismo período de tiempo que los embriones normales recientes; se compararon los parámetros de los embriones en el estadio 3PN recientes que se obtuvieron de la clínica de FIV de Stanford, y se observó que no eran diferentes de los parámetros de nuestros embriones crioconservados ni los informes publicados.

Plan experimental

En cuatro conjuntos experimentales, seguimos el desarrollo de 242 embriones en el estadio pronuclear (61, 80, 64 y 37, respectivamente). En cada conjunto de experimentos, los cigotos humanos se descongelaron el día 1 y se cultivaron en grupos pequeños en múltiples placas. Cada placa se observó d independientemente con microscopía secuencial bajo iluminación de campo oscuro en estaciones de obtención de imágenes separadas. En intervalos de aproximadamente 24 horas, se retiró una placa de embriones del sistema de obtención imágenes y se recogió como embriones individuales o como células individuales (blastómeros) para el análisis de la expresión génica por PCR cuantitativa de alto rendimiento en tiempo real. Cada placa contenía típicamente una mezcla de embriones que había alcanzado el estadio de desarrollo esperado en el momento de ser recogidos (denominados "normales") y los que se habían detenido o retrasado en estadios de desarrollo más temprano, o fragmentados ampliamente (denominados "anómalos"). Los embriones se analizaron, como embriones intactos individuales o se disociaron en blastómeros individuales, seguido por amplificación del RNA específico de genes. Se obtuvieron las imágenes de un subconjunto de embriones (100 de 242) hasta el día 5 ó 6 con el objetivo de monitorizar la formación de blastocistos.

Cultivo y microscopía de embriones humanos

Se descongelaron embriones humanos extrayendo los crioviales del depósito de conservación en nitrógeno líquido y se dejaron a la temperatura ambiente. Una vez que un vial se hubo descongelado, se abrió y los embriones se visualizaron bajo un microscopio de disección. El contenido del vial se vertió a continuación en la parte inferior de una cápsula de cultivo 3003. Los embriones se localizaron en la gota y se evaluó y registró la supervivencia de cada embrión. A temperatura ambiente, los embriones se transfirieron a una cápsula de cultivo 3037 que contenía 1,2-propanodiol 1,0 M + sacarosa 0,2 M durante 5 minutos, a continuación 1,2-propanodiol 0,5 M + sacarosa 0,2 M durante 5 minutos, y 1,2-propanodiol 0,0 M + sacarosa 0,2 M durante 5 minutos. Posteriormente, los embriones se cultivaron en medio de escisión Quinn's Advantage Cleavage Medium (CooperSurgical), complementado con 10% de Quinn's Advantage Serum Protein Substitute (SPS; CooperSurgical) entre los días 1 a 3, y Quinn's Advantage Blastocyst Medium (CooperSurgical) con 10% de SPS después del día 3 utilizando microgotas bajo aceite. Todos los experimentos usaron el mismo tipo de medio de escisión-estadio, excepto en dos estaciones durante el primer experimento, en las cuales que usan un medio Global (LifeGlobal, Guilford, CT). En este pequeño subconjunto (12 embriones), los embriones mostraron una tasa de formación de blastocistos ligeramente inferior (3 de cada 12, ó 25%), pero la sensibilidad y especificidad de nuestros parámetros predictivos fueron ambas del 100% para este grupo.

La obtención de imágenes secuenciales se realizó en múltiples sistemas para acomodar el análisis concurrente de múltiples muestras, así como para validar la consistencia de los datos a través de diferentes plataformas. Los sistemas consistieron en 7 microscopios individuales: (1) dos microscopios Olympus IX-70/71 modificados y equipados con platinas calentadas Tokai Hit, varios LED Luxeon de luz blanca, y una abertura para la iluminación de campo oscuro; (2) dos microscopios Olympus CKX-40/41 modificados y equipados con platinas calentadas, varios LED Luxeon de luz blanca, e iluminación de contraste de modulación de Hoffman (nota: estos sistemas sólo se usaron durante los primeros 4 experimentos, después de lo cual se decidió que era preferible la iluminación de campo oscuro para medir los parámetros); y (3) una disposición de microscopios en miniatura de 3 canales construida de forma personalizada que cabe dentro de una incubadora estándar, equipada con varios LED Luxeon de luz blanca y aberturas para la iluminación de campo oscuro. No observamos ninguna diferencia significativa en el comportamiento del desarrollo, la tasa de formación de blastocistos o los perfiles de expresión génica entre los embriones cultivados en estos diferentes sistemas, de hecho, nuestros parámetros para la predicción de blastocistos fueron consistentes con múltiples sistemas y experimentos.

La intensidad de la luz para todos los sistemas fue significativamente menor que la de la luz usada típicamente en un microscopio de reproducción asistida debido a la baja potencia de los LED (en relación con una bombilla halógena típica de 100 W) y la alta sensibilidad de los sensores de la cámara. Usando un medidor de potencia óptica, determinamos que la potencia de un microscopio de reproducción asistida típico (Olympus IX-71 Hoffman Modulation Contrast) a una longitud de onda de 473 nm varía desde aproximadamente 7 hasta 10 mW dependiendo de los aumentos, mientras que la potencia de nuestros sistemas de obtención de imágenes se midieron para que estuvieran entre 0,2 y 0,3 mW a la misma longitud de onda. Las imágenes se capturaron en un tiempo de exposición de 1 segundo cada 5 minutos durante un máximo de 5 o 6 días, dando como resultado aproximadamente 24 minutos de exposición a la luz continua. A una potencia de 0,3 mW, esto es equivalente a aproximadamente 1 minuto de exposición bajo un típico microscopio de reproducción asistida.

Para realizar el seguimiento de la identidad de cada embrión durante el experimento de obtención de imágenes y de expresión génica correlacionadas, instalamos una cámara de video en el estereomicroscopio y registramos el proceso de transferencia de muestras durante el cambio de los medios y la recogida de muestras. Realizamos experimentos de control con embriones de ratón pre-implantacionales (n = 56) y un pequeño subconjunto de embriones humanos (n = 22), y no observamos diferencia significativa (p = 0,96) en la tasa de formación de blastocistos entre los embriones a los que se les tomó las imágenes y los de control.

Análisis por qRT-PCR de alto rendimiento

Para el análisis por qRT-PCR de un solo embrión o de un solo blastómero, los embriones se trataron primero con una solución de Tyrode ácida para eliminar la zona pelúcida. Para recoger los blastómeros individuales, los embriones se incubaron en medio Quinn's Advantage libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} con HEPES (CooperSurgical) durante de 5 a 20 minutos a 37°C con pipeteado preciso. Las muestras se recogieron directamente en 10 μL de tampón de reacción; se realizó una reacción de transcripción inversa/preamplificación en una etapa subsiguiente como se ha descrito anteriormente. Como cebadores específicos de genes durante las reacciones de transcripción inversa y preamplificación se usaron una mezcla de cebadores y sondas de qRT-PCR del ensayo bajo demanda 20X ABI (Applied Biosystems). Las reacciones de qRT-PCR de alto rendimiento se realizaron con Fluidigm Biomark 96.96 Dynamic Arrays tal como se ha descrito anteriormente usando las sondas de qRT-PCR del ensayo bajo demanda ABI. Todas las muestras se cargaron en 3 o 4 duplicados técnicos. El análisis de los datos de la qRT-PCR se realizó con qBasePlus (Biogazelle), Microsoft Excel y un programa informático personalizado. Del análisis de los datos se omitieron ciertos genes debido a la mala calidad de los datos (por ejemplo, curvas deficientes de amplificación por PCR) o consistentemente baja a nula expresión en los embriones evaluados. Para el análisis de la edad de los blastómeros, el panel de transcritos maternos usado incluye DAZL, GDF3, IFITM1, STELLAR, SYCP3, VASA, GDF9, PDCD5, ZAR1 y ZP1, mientras que el panel de genes embrionarios incluye ATF7IP, CCNA1, EIF1AX, EIF4A3, H2AFZ, HSP70.1, JARID1B, LSM3, PABPC1 y SERTAD1. Se calculó el valor de la expresión de cada gen en relación con los genes de referencia GAPDH y RPLP0, así como en relación la media de los genes, usando los métodos geNorm y $\Delta\Delta\text{Ct}$. Se seleccionaron GAPDH y RPLP0 como genes de referencia para este estudio basándose empíricamente en el valor de la estabilidad génica y del coeficiente de variación: 1,18 y 46% para GAPDH y 1,18 y 34% para RPLP0. Estos fueron los más estables entre los 10 genes constitutivos que se analizaron, y se encontraban dentro de la gama de un conjunto típico de muestras heterogéneas. En segundo lugar, observamos que en los blastómeros individuales, como se esperaba, la cantidad de transcritos de RPLP0 y GAPDH disminuyó en aproximadamente 1 valor de Ct por división entre el estadio de 1 célula y el estadio de 8 células, lo que es congruente con las expectativas de que cada célula hereda aproximadamente la mitad de la combinación de mRNA con cada división por escisión, en ausencia de nuevos transcritos antes de la EGA durante los 3 primeros días del desarrollo humano. En tercer lugar, observamos que el nivel de expresión de estos genes de referencia en los blastómeros individuales, se mantuvo estable entre el estadio de 8 células y el estadio de mórula, después que comenzara la EGA. Al nivel de embrión intacto, los valores de Ct tanto para RPLP0 como para GAPDH se mantuvieron muy constantes durante todo el desarrollo hasta el estadio de mórula, con un ligero aumento a continuación del estadio de blastocisto, tal vez debido al aumento de los niveles de transcritos en el mayor número de los blastómeros presentes. La mayor parte del análisis de la expresión génica realizados en este estudio se enfocó en los estadios de desarrollo previos al estadio de mórula, sin embargo, cuando el nivel de expresión de los

genes de referencia era extremadamente estable.

Seguimiento automatizado de las células

Nuestro algoritmo de seguimiento de las células usa un marco probabilístico basado en los métodos secuenciales de Monte Carlo, a los cuales en el campo de la visión por ordenador se alude frecuentemente como el filtro de partículas. El filtro de partículas sigue la propagación de tres principales variables en el tiempo: el estado, el control, y la medición. La variable estado es un modelo de un embrión y se representa como una colección de elipses. La variable control es una entrada que transforma la variable estado y consiste en nuestro modelo de propagación y división celular. La variable medición es una observación del estado y consiste en nuestras imágenes adquiridas por el microscopio secuencial. Nuestra estimación del estado actual en cada etapa de tiempo se representa con una distribución de probabilidad *a posteriori*, la cual se aproxima por un conjunto de muestras ponderadas llamadas partículas. Usamos los términos *partículas* y *modelos embrionarios* intercambiabilmente, donde una partícula es una hipótesis de un modelo embrionario en un momento dado. Después de la inicialización, el filtro de partículas aplica repetidamente tres etapas: predicción, medición y actualización.

Predicción: Las células se representan como elipses en el espacio en 2D y cada célula tiene una orientación e índice de solapamiento. El índice de solapamiento especifica la altura relativa de las células. En general, hay dos tipos de comportamiento que queremos predecir: movimiento celular y división celular. Para el movimiento celular, nuestra entrada de control toma una partícula y perturba aleatoriamente cada parámetro para cada célula, incluyendo la posición, la orientación y la longitud de los ejes mayor y menor. La perturbación se muestrea aleatoriamente a partir de una distribución normal con varianza relativamente pequeña (5% de los valores inicializados). Para la división celular, usamos el siguiente enfoque. En un momento dado de tiempo, para cada partícula, le asignamos una probabilidad del 50% de que se dividirá una de las células. Este valor se escoge empíricamente, y se extiende por una amplia gama de posibles divisiones celulares, mientras que se mantiene una buena cobertura de la configuración actual. Si se predice una división, entonces, la célula que se divide se escoge aleatoriamente. Cuando se elige una célula para que se divida aplicamos una división simétrica a lo largo del eje mayor de la elipse, produciendo dos células hijas de igual tamaño y forma. A continuación perturbamos aleatoriamente cada valor de las células hijas. Finalmente, seleccionamos aleatoriamente los índices de solapamiento de las dos células hijas, manteniendo mientras su solapamiento colectivo con respecto al resto de las células.

Después de aplicar la entrada de control, convertimos cada partícula en una imagen simulada. Esto se logra proyectando la forma elíptica de cada célula sobre la imagen simulada usando el índice de solapamiento. Los valores de los píxeles correspondientes se establecen en un valor binario de 1 y se dilatan para crear un espesor de la membrana comparable a los datos de la imagen observada. Debido que los embriones son parcialmente transparentes y se recoge luz fuera del foco, las membranas celulares en la parte inferior del embrión son sólo visibles algunas veces. En consecuencia, se añaden membranas celulares ocluidas con una probabilidad de 10%. En la práctica, hemos encontrado que estos puntos de membranas ocluidas son cruciales para modelizar la forma precisa, pero es importante hacerlos suficientemente dispersos para que no parezcan un borde visible.

Medición: Una vez que se ha generado una distribución de modelos hipotéticos, las imágenes simuladas correspondientes se comparan con la imagen del microscopio real. La imagen del microscopio se procesa previamente para crear una imagen binaria de membranas celulares usando un método basado en el principio de curvatura seguido por la formación de umbrales. La exactitud de la comparación se evalúa usando una distancia truncada de sesgo simétrico, la cual se usa luego para asignar un peso, o probabilidad, a cada partícula.

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

Una vez que los embriones han sido modelados, podemos extraer los parámetros de la obtención dinámica de imágenes, tales como la duración de la citocinesis y el tiempo entre las mitosis, como se estudió en el texto principal. Nuestro programa informático de seguimiento de células se implementó previamente en Matlab, y los tiempos de computación variaron desde un par de segundos a medio minuto para cada imagen dependiendo del número de partículas. Nuestra versión actual del programa informático está implementada en C, y los tiempos de computación varían desde 1 a 5 segundos, dependiendo del número de partículas.

Ejemplo 1

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

Métodos

Embriones humanos de 1 célula congelados, también denominados cigotos, se descongelaron y se colocaron en cultivo y se cultivaron bajo condiciones tales como las que se usan en los procedimientos de FIV. Como se describió con más detalle anteriormente, estos embriones parecen ser representativos de la población típica de la fecundación *in vitro* (FIV) puesto que se congelaron en el estadio 2PN y por tanto se crioconservaron indiscriminadamente. Esto

está en contraste con los embriones típicamente crioconservados en estadios posteriores del desarrollo tras la transferencia de los que se percibió que eran de la más alta calidad durante los ciclos recientes. Para algunos experimentos, los embriones se colocaron en una placa de cultivo estándar. Para otros experimentos, los embriones se cultivaron en placa de cultivo personalizada con micro-pocillos de calidad óptica.

5 Los embriones en crecimiento, por lo general entre 1 y 30 por placa, se siguieron individualmente por la obtención de imágenes secuenciales con un microscopio controlado por ordenador, equipado para el almacenamiento y análisis de imágenes digitales. En algunos casos, la obtención de imágenes secuenciales se realizó con microscopios invertidos equipados con platinas calentadas y cámaras de incubación. En otros casos, la obtención de imágenes secuenciales se realizó con disposiciones de microscopios en miniatura construidas de forma personalizada que caben dentro de una incubadora convencional, lo que permitió el cultivo simultáneo de múltiples placas de muestras en la misma incubadora y que fue escalable para acomodar múltiples canales sin limitaciones en cuanto al intervalo de tiempo mínimo entre la captura de imágenes sucesivas. Usar múltiples microscopios también eliminó la necesidad de mover la muestra, lo que mejora la exactitud y la fiabilidad del sistema en general. Los sistemas de obtención de imágenes usaron iluminación de campo oscuro, lo cual proporcionó el aumento del contraste de las imágenes para la extracción de las características subsiguientes y el análisis de las imágenes, aunque se notó que otra iluminación habría sido suficiente. Los microscopios individuales en la incubadora estaban aislados unos de otros, proporcionando a cada placa de cultivo su propio ambiente controlado. Esto permitió que las placas se transfirieran hacia y desde las estaciones de obtención de imágenes sin perturbar el ambiente de las otras muestras.

20 Las imágenes secuenciales se recogieron para el análisis posterior de la morfología celular, incluyendo la medición de al menos uno de los parámetros celulares siguientes: la duración de la primera citocinesis, el intervalo de tiempo entre la primera y la segunda división celular y el intervalo de tiempo entre la segunda y la tercera división celular. Las imágenes mostradas en las figuras se tomaron a un tiempo de exposición de 1 segundo cada 5 minutos durante hasta 5 o 6 días. Como se describe con mayor detalle más adelante, la primera citocinesis ocurre habitualmente un día después de la fecundación y dura entre aproximadamente 14 minutos. La primera y la segunda divisiones celulares están separadas habitualmente por una media de aproximadamente 11 horas. La segunda y la tercera divisiones celulares están separadas habitualmente por una media de aproximadamente 1 hora. De esta manera, la obtención de las imágenes se prolongó durante un período de tiempo que duró aproximadamente 36 horas (más o menos varias horas) después de la fecundación.

Resultados

30 La línea de tiempo de desarrollo de un embrión humano sano pre-implantacional en cultivo se documentó en un período de seis días por la obtención de imágenes secuenciales (Fig. 2). Se observó que un cigoto humano normal experimenta la primera división por escisión tempranamente el día 2. Posteriormente, el embrión se escinde dando un embrión de 4 células y 8 células más tarde el día 2 y el día 3, respectivamente, antes de la compactación en una mórula el día 4. La primera diferenciación celular morfológicamente evidente se observa los días 5 y 6 durante la formación del blastocisto, cuando los blastómeros totipotentes se diferencian en células trofodérmicas, las cuales dan lugar a las estructuras extraembrionarias como la placenta, o en la masa celular interna, la cual se desarrolla hasta el feto *in vivo* y a células madre embrionarias pluripotentes *in vitro*.

40 A continuación seguimos el desarrollo de 242 embriones fecundados normalmente en cuatro conjuntos de experimentos independientes y documentamos la distribución de los embriones normales y detenidos entre las muestras que se cultivaron hasta el día 5 y 6. De los 242 embriones, 100 se cultivaron hasta el día 5 o 6 y se observó que la tasa de formación de blastocisto estaba entre 33% - 53%, similar a la tasa de formación de blastocisto en una clínica típica de FIV (Fig. 3). Los embriones restantes quedaron detenidos en diferentes estadios de desarrollo, con mayor frecuencia entre los estadios de 2 células y de 8 células, y se definieron como anómalos (Fig. 3). Con el fin de identificar los parámetros cuantitativos de la obtención de imágenes que predicen el éxito en el desarrollo embrionario hasta llegar al estadio de blastocisto, extrajimos y analizamos varios parámetros de los vídeos secuenciales, incluyendo el tamaño de los blastómeros, el espesor de la zona pelúcida, el grado de fragmentación, la duración de los primeros ciclos celulares, los intervalos de tiempo entre las primeras pocas mitosis y la duración de la primera citocinesis. Durante el análisis de imágenes de video de embriones, tanto de desarrollo normal como anormal, observamos que muchos embriones detenidos experimentaban una citocinesis aberrante durante la primera división celular. Los embriones normales completaron la citocinesis en una ventana de tiempo estrecha de 14,3 +/- 6,0 min desde la aparición de los surcos de escisión hasta completar la separación de las células hijas, de una manera suave y controlada. Esto se muestra en la parte superior de la Fig. 4. En contraste, los embriones anormales mostraron comúnmente uno de dos fenotipos de citocinesis aberrantes. En el fenotipo más suave, la morfología y el mecanismo de la citocinesis parecían normales, pero el tiempo requerido para completar el proceso fue más largo, variando desde unos pocos minutos adicionales hasta una hora (Fig. 4). De vez en cuando, un embrión que experimentó una citocinesis ligeramente prolongada aún se convirtió en un blastocisto. En el fenotipo más acusado, la morfología y el mecanismo de la citocinesis estaban perturbados. Por ejemplo, como se muestra en el ejemplo en el panel inferior de la Fig. 4, los embriones formaban un surco de escisión de un solo lado y experimentaban una serie inusual de eventos de arrugamientos de la membrana durante varias horas antes de que finalmente se fragmentaran en componentes más pequeños. También se observaron otras variaciones de este comportamiento. Además, los embriones anormales que demuestran estos fenotipos más acusados con frecuencia se fragmentan, proporcionando evidencia directa de que la fragmentación de embriones es probablemente un

subproducto de la citocinesis aberrante que posteriormente da como resultado el desarrollo embrionario anormal.

El análisis detallado de nuestros resultados de imágenes indicó que los embriones normales seguían una ritmo estricto en la citocinesis y la mitosis durante las divisiones tempranas, antes de que comience la activación de genes embrionarios (EGA), lo que sugiere que el potencial de desarrollo de un embrión está predeterminado por los programas heredados maternos. En particular, observamos tres intervalos temporales, o parámetros, en los ciclos de células de los embriones en estadios tempranos que estaban regulados estrictamente: (1) la duración de la primera citocinesis, (2) intervalo de tiempo entre la primera y segunda mitosis y (3) sincronía de la segunda y tercera mitosis. La relación entre estos tres intervalos de tiempo y los cambios morfológicos se muestra en la Fig. 5. Para los embriones normales, medimos estos parámetros que eran, aproximadamente, 14,3 +/- 6,0 minutos, 11,1 +/- 2,1 horas y 1,0 +/- 1,6 horas, respectivamente (expresados aquí como la media más/menos la desviación típica).

También obtuvimos imágenes de un conjunto pequeño (n = 10) de embriones recién obtenidos (no crioconservados) que fueron 3PN (triploides) a partir del estadio de una sola célula. Se ha demostrado que los embriones 3PN siguen la misma línea de tiempo de eventos de referencia que los embriones normales recién obtenidos durante al menos los tres primeros ciclos celulares. De estos embriones se obtuvieron imágenes antes de nuestros experimentos principales con el fin de validar los sistemas de obtención de imágenes (pero por razones técnicas no se realizó su seguimiento hasta blastocistos). A parte de este conjunto de embriones recién obtenidos, 3 de los embriones siguieron una línea de tiempo de eventos similar a la de nuestros embriones 2PN crioconservados, variando la duración de la citocinesis entre 15 y 30 minutos, variando el tiempo entre la primera y segunda mitosis entre 9,6 y 13,8 horas y variando el tiempo entre la segunda y tercera mitosis entre 0,3 y 1,0 horas. Sin embargo, en 7 de los embriones observamos un fenotipo de citocinesis único que se caracterizó por la aparición simultánea de 3 surcos de escisión, una citocinesis ligeramente prolongada y, finalmente, la separación en tres células hijas (Fig. 4). Estos embriones tenían una duración de la citocinesis que oscilaba entre 15 y 70 minutos (caracterizada como el tiempo entre el comienzo de los surcos de escisión hasta la separación completa en 3 células hijas), variando el tiempo entre la primera y segunda mitosis (3 células a 4 células) entre 8,7 y 12,7 horas y variando el tiempo entre la segunda y tercera mitosis (4 células a 5 células) entre 0,3 y 2,6 horas. Esta observación, junto con la amplia gama de fenotipos de citocinesis mostrada por los embriones anormales, sugiere que nuestros embriones crioconservados no sufren un retraso en el desarrollo por el proceso de crioconservación y se comportan similarmente a los cigotos recientes que se escinden en 2 blastómeros.

Se podían predecir los embriones que alcanzaban el estadio de blastocisto, con sensibilidad y especificidad del 94% y 93% respectivamente, por tener una primera citocinesis entre 0 y 33 minutos, un tiempo entre la primera y segunda mitosis entre 7,8 y 14,3 horas y un tiempo entre la segunda y tercera mitosis entre 0 y 5,8 horas (Fig. 6). Por el contrario, se había predicho que se detenían los embriones que presentaban valores fuera de una o más de estas ventanas. Todos los embriones normales que se desarrollaron satisfactoriamente en un blastocisto mostraron valores similares de los tres parámetros. En contraste, los embriones anormales exhibieron una elevada cantidad de variabilidad en los tiempos que tardaron en completar los intervalos (Fig. 6). Observamos que (1) un período de tiempo más largo de lo normal para completar la primera citocinesis indica potencial de desarrollo deficiente; (2) un intervalo más largo o más corto de lo normal entre la primera y la segunda divisiones celulares indica potencial de desarrollo deficiente; y (3) un intervalo más largo de lo normal entre la segunda y la tercera divisiones celulares indica potencial de desarrollo deficiente. Por lo tanto, estos parámetros fueron predictivos de la capacidad del embrión para proceder a la formación de blastocisto y la calidad del blastocisto.

Finalmente, observamos que si bien cada parámetro era autónomamente predictivo del potencial de desarrollo del embrión, el uso de la totalidad de los tres parámetros proporcionaba una sensibilidad y especificidad que excedían ambas el 90%, con un punto de corte de 3 veces las desviaciones típicas. La curva de característica operativa del receptor (abreviadamente ROC, por la expresión inglesa *Receiver Operating Characteristic*) para estos parámetros se muestra en la Fig. 7. La curva de este gráfico muestra la tasa de positivos verdaderos (sensibilidad) frente a la tasa de positivos falsos (1 - especificidad) para distintos puntos de corte de la desviación típica. Para llegar a esta ROC, se utilizaron los siguientes números: número de positivos verdaderos = 34 (predichos correctamente que llegan a blastocisto); número de negativos verdaderos = 54 (predichos correctamente que se detienen), número de positivos falsos = 4 (predichos incorrectamente que llegan a blastocisto); número de negativos falsos = 2 (predichos incorrectamente que se detienen).

Análisis

Nuestro análisis indica que es mucho más probable que los embriones que siguen un ritmo estricto en la mitosis y la citocinesis durante las tres primeras divisiones por escisión tanto que se desarrollen hasta llegar al estadio de blastocisto como que formen un blastocisto de alta calidad con una masa celular interna expandida (MCI). Se pueden utilizar parámetros morfológicos dinámicos para seleccionar los embriones óptimos para transferencia o crioconservación durante un procedimiento de FIV. Estos parámetros se pueden utilizar también para distinguir entre diferentes calidades de blastocisto, lo que permite una clasificación de los potenciales de desarrollo relativos de los embriones dentro de un grupo. La práctica habitual en las clínicas de FIV es transferir en el estadio de 8 células (día 3). Algunas clínicas eligen cultivar los embriones hasta el estadio de blastocisto (día 5), puesto que la transferencia de blastocistos tiene hasta el doble de tasas de implantación en comparación con la transferencia en el día 3. Sin embargo, muchas clínicas evitan el cultivo prolongado debido al mayor riesgo de trastornos epigenéticos. Los

parámetros predictivos de obtención de imágenes se pueden utilizar para predecir la viabilidad de embriones en el estadio de 4 células (el día 2) y previamente a la activación de genes embrionarios. Esto puede permitir la transferencia o la crioconservación de embriones un día completo antes de lo que normalmente se hace en la práctica y antes de que los embriones experimenten cambios significativos en sus programas moleculares. Esto puede permitir también que los embriones más óptimos sean seleccionados para DGP u otros tipos de análisis.

Ejemplo 2

Validación de los parámetros de obtención de imágenes a través del análisis de la expresión génica y utilización del análisis de la expresión génica para determinar el potencial de desarrollo.

Métodos

Embriones humanos de 1 célula congelados, también denominados cigotos, se descongelaron y colocaron en cultivo y se cultivaron bajo condiciones tales como las que se usan en los procedimientos de FIV. Para algunos experimentos, los embriones fueron colocados en una placa de cultivo estándar. Para otros experimentos, los embriones se cultivaron en una placa de cultivo personalizada con micro-pocillos de calidad óptica.

Los embriones fueron retirados del cultivo y el sistema de imágenes y se recogieron o como embriones individuales o células individuales (blastómeros) para el análisis de la expresión génica. Cada placa contenía típicamente una mezcla de embriones, algunos alcanzando el estadio de desarrollo esperado en el momento de la recogida, y otros, deteniéndose en los estadios de desarrollo más tempranos o fragmentándose ampliamente. Los que alcanzaron el estadio de desarrollo esperado en el momento de la recogida fueron clasificados como "normales", mientras que los que se detuvieron se consideraron "anormales". Por ejemplo, cuando una placa de embriones se separó de la estación de obtención de imágenes al final del día 2 para recoger muestras, cualquier embrión que había alcanzado el estadio de 4 células y pasado más allá se identificó como normal, mientras que los que no habían llegado a alcanzar la etapa de 4 células eran etiquetados como detenidos. Estos embriones detenidos fueron clasificados según el estadio de desarrollo en el cual se llegaron a detener, de tal manera que un embrión con sólo 2 blastómeros al final del día 2 se analizaba como un embrión de 2 células detenido. Se tuvo cuidado de excluir a los embriones que morfológicamente parecían estar muertos y porosos en el momento de la recogida de muestras (por ejemplo, blastómeros degenerados). Sólo los embriones que parecían vivos (tanto normales como detenidos) fueron utilizados para el análisis de expresión génica. Sin embargo, es posible que los embriones que parecían normales durante el momento de la recogida en última instancia pudieran detenerse si se les permitiera crecer hasta un estadio posterior. El análisis de la expresión génica de embriones representativos de cada una de estas clases se realizó por RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR). Aproximadamente a intervalos de 24 horas, se recogieron embriones de los sistemas de obtención de imágenes individuales para el análisis por qRT-PCR de alto rendimiento de la expresión génica con reacciones múltiples de hasta 96 genes analizados frente a 96 muestras. El análisis de la expresión génica se realizó con el Fluidigm Biomark System, que puede llevar a cabo hasta 9216 reacciones simultáneas de qRT-PCR basadas en el ensayo TaqMan en cantidades de nanolitros.

Resultados

Con el fin de dilucidar los mecanismos moleculares que subyacen bajo los eventos morfológicos, se realizó un perfil de la expresión génica correlacionada. Se analizaron por muestra los niveles de expresión de 96 genes diferentes que pertenecían a diferentes categorías, incluyendo genes constitutivos, marcadores de células germinales, factores maternos, marcadores de EGA, marcadores de trofoblastos, marcadores de masa celular interna, marcadores de pluripotencia, reguladores epigenéticos, factores de transcripción, receptores hormonales y otros (Tabla 1, en la Figura 19). Se analizaron dos conjuntos de genes ligeramente diferentes, pero solapantes, en dos conjuntos experimentales diferentes, proporcionando un conjunto único de diagnóstico de genes del destino de un embrión humano. Los conjuntos únicos de genes fueron compilados a partir de datos sobre la expresión génica en embriones de organismos modelo, o en células madre embrionarias humanas, así como de nuestros propios datos de micromatrices no publicados. En este estudio se revela por primera vez el estado de expresión de estos conjuntos de genes en embriones humanos pre-implantacionales.

El valor de la expresión de cada gen con relación a los genes de referencia GAPDH y RPLP0, así como con relación a la media de los genes, se calculó utilizando los métodos geNorm (E1-Toukhy T, et al., (2009) *Hum. Reprod.*) y AACt (Vanneste E, et al., (2009) *Nat. Med.* 15:577-83). El valor de la estabilidad génica y el coeficiente de variación fueron 1,18 y 46% para GAPDH y 1,18 y 34% para RPLP0, los más estables entre los 10 genes constitutivos que hemos analizado, y bien dentro del intervalo de un conjunto típico de muestras heterogéneas. En blastómeros individuales, como se esperaba, la cantidad de transcritos de RPLP0 y GAPDH disminuyó en aproximadamente 1 valor de Ct por división entre el estadio de 1 célula y el estadio de 8 células, debido al efecto de reducción a la mitad de la división por escisión, así como a la falta de EGA durante los primeros 3 días de desarrollo humano. El nivel de expresión de estos genes de referencia en blastómeros individuales, se mantuvo estable entre el estadio de 8 células hasta mórula. A nivel del embrión completo, los valores de Ct tanto de RPLP0 como de GAPDH se mantuvieron ampliamente constantes durante todo el desarrollo hasta el estadio de mórula. El nivel de expresión de RPLP0 y GAPDH aumentó significativamente en los blastocistos, muy probablemente debido al aumento del número de blastómeros presentes. Estas variaciones no afectaron a la validez de RPLP0 ni de GAPDH como genes de

referencia. La mayor parte del análisis de la expresión génica llevado a cabo en este estudio se enfocó en los estadios de desarrollo anteriores a la etapa de mórula, cuando el nivel de expresión de los genes de referencia era extremadamente estable.

Expresión génica diferencial entre embriones normales y anormales. La Fig. 8 muestra el nivel medio de expresión de 52 genes de 6 embriones anormales de 1 a 2 células y 5 embriones normales de 1 a 2 células representados en un gráfico radial a escala logarítmica. Los embriones detenidos mostraron en general menor cantidad de mRNA en comparación con los embriones normales, siendo los genes que facilitaron la citocinesis, el procesamiento del RNA y la biogénesis de miRNA los más intensamente afectados. Los genes marcados con un asterisco indican una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre embriones normales y anormales según lo determinado por el ensayo de Mann-Whitney. Estos 18 genes son Coffillin, DIAPH1, ECT2, MYLC2, DGCR8, Dicer, TARBP2, CPEB1, Symplekin, YBX2, ZAR1, CTNNB1, DNMT3B, TERT, YY1, IGFR2, BTF3 y NELF. Cada gen pertenece a un grupo como se indica en la Figura, es decir, citocinesis: Coffillin, DIAPH1, ECT2 y MYCL2; biogénesis de miRNA: DGCR8, Dicer y TARBP2; procesamiento del RNA: YBX2; factores maternos: ZAR1; constitutivos: CTNNB1; pluripotencia: DNMT3B, TERT e YY1; receptor: IGFR2; y factor de transcripción: BTF3 y NELF. En la mayoría de los casos, la expresión de estos genes era más alta en embriones normales de 1 y 2 células que en embriones detenidos de 1 y 2 células.

Curiosamente, ciertas categorías de genes estaban más afectadas en los embriones anormales que otras. Por ejemplo, en los embriones anormales, la mayoría de los genes constitutivos, los receptores de hormonas y factores maternos no estaban alterados apreciablemente en la expresión génica, mientras que muchos genes implicados en la citocinesis y la biogénesis de miRNA mostraron una expresión significativamente reducida. Por otra parte, entre los genes que estaban afectados, algunos genes mostraron una diferencia mucho mayor entre los embriones normales y anormales que otros. Por ejemplo, los genes implicados en la vía de la biogénesis de miRNA, como DGCR8, Dicer y TARBP2, mostraron niveles de expresión muy reducidos en los embriones anormales. Notablemente, CPEB1 y Symplekin, dos de los genes más intensamente afectados, pertenecían al mismo mecanismo molecular que regula el almacenamiento y reactivación de mRNA materno por la manipulación de la longitud de una cola de poli(A) del transcrito (Bettegowda, A., et al., (2007) *Front. Biosci.* 12:3713-3726). Estos datos sugieren que la anomalía de los embriones se correlaciona con defectos en el programa de regulación del mRNA del embrión.

Correlación de la citocinesis con perfiles de expresión génica. El análisis de la expresión génica se realizó con genes que codificaban componentes clave de la citocinesis. La identidad de cada embrión fue seguida por la instalación de una cámara en el estereomicroscopio y la grabación en vídeo del proceso de transferencia de la muestra durante el cambio de los medios y la recogida de muestras. Cuando se evaluaron los perfiles de expresión génica de embriones anormales, observamos una fuerte correlación entre la citocinesis aberrante y el menor nivel de expresión génica en componentes clave de la citocinesis. Curiosamente, los perfiles de expresión génica de embriones anormales fueron tan diversos y variables como sus fenotipos morfológicos aberrantes.

Se descubrió que la expresión de genes de citocinesis variaba entre embriones normales de 2 células y embriones anormales de 2 células (Fig. 9) y entre embriones normales y anormales de 4 células (Fig. 10). Las Figs. 9 y 10 muestran las expresiones relativas de genes que están más altamente expresados en embriones normales de dos células humanas (Fig. 9) y en embriones normales de 4 células (Fig. 10), correlacionados con fenotipos de citocinesis diferentes. Como se representa en la Fig. 9, un embrión detenido de 2 células que mostró un arrugamiento anormal de la membrana durante la primera citocinesis tenía niveles de expresión significativamente reducidos de todos los genes reguladores de citocinesis analizados. Los genes que muestran diferencias en la Fig. 9 son Anillin, Coffillin, DIAPH1, DIAPH2, DNM2, ECT2, MKLP2, MYCL2 y RhoA. Los niveles de expresión normales se expresan en las barras de la derecha y se puede ver que son más elevados en cada gen. En las fotografías por encima de las gráficas de la Figura 9, que muestran embriones anormales de dos células, la barra de escala representa 50 μ m. La Fig. 10 muestra los resultados de un embrión detenido de cuatro células que experimentó una citocinesis aberrante con un surco de citocinesis de un solo lado y la citocinesis extremadamente prolongada durante la primera división mostró una disminución de la expresión en los reguladores de citocinesis Anillin y ECT2. La barra de escala en la Fig. 10 también representa 50 μ m.

Patrones de expresión génica específicos de los estadios embrionarios. La Fig. 11 muestra cuatro patrones específicos de los estadios embrionarios (abreviadamente ESSP, por la expresión inglesa *Embryonic Stage Specific Patterns*) que fueron identificados durante el análisis de la expresión génica de 141 embriones individuales y blastómeros individuales que se habían desarrollado con normalidad. Los genes incluidos en cada uno de los cuatro ESSP se enumeran en la Tabla 2 (Fig. 20). Los gráficos de la Fig. 11 fueron creados agrupando genes sobre la base de patrones de expresión similares y obteniendo la media de sus valores de expresión (en relación con los genes de referencia). El nivel de expresión relativo de un ESSP se calculó obteniendo la media de los niveles de expresión de genes con un patrón de expresión similar. Los niveles de expresión génica están representados frente a diferentes estadios celulares, es decir, 1c = una célula, M = mórula, B = blastocisto. En la Fig. 11, se muestra la expresión relativa de genes de cada uno de los cuatro ESSP en función del desarrollo, desde 1 célula (1c) hasta mórula y blastocisto. El ESSP1 muestra la herencia materna, el ESSP2 muestra la activación de la transcripción de genes, el ESSP3 muestra la activación en estadios tardíos y el ESSP4 muestra transcritos persistentes. Como se indica en el ESSP2, el punto típico de transferencia en una clínica de FIV se produce el día 3, cuando los embriones están

experimentando importantes cambios en el desarrollo debido a la activación de los genes embrionarios. Los datos de las imágenes secuenciales indican que el potencial de desarrollo de un embrión puede ser identificado por el estadio de 4 células, permitiendo con ello la transferencia más temprana de embriones el día 2 y previamente a esta activación de genes. Esta transferencia temprana es útil para mejorar la tasa de éxito de los procedimientos de FIV.

En la Tabla 2 (Fig. 20) se enumeran los genes que pertenecen a cada una de los cuatro ESSP identificados. El nivel relativo de la expresión génica de cada gen se calculó con respecto a los genes de referencia (GAPDH y RPLP0) y con relación a la media de los genes. El patrón de expresión de cada gen frente a la línea de tiempo del desarrollo embrionario siguió uno de los cuatro ESSP siguientes: patrón ESSP (1) estadio temprano: genes que comienzan con valores elevados, se degradan lentamente y dejan de expresarse antes del estadio de blastocisto; patrón ESSP (2) estadio intermedio: genes que se activan después del estadio de 4 células; patrón ESSP (3) estadio tardío: genes que se activan en la mórula o el blastocisto; y patrón ESSP (4) Constante: genes que tienen valores de expresión relativamente constantes.

El ESSP1 describió el patrón de genes heredados por vía materna. Estos transcritos comenzaron con un alto nivel de expresión en el estadio de cigoto y posteriormente declinaron a medida que se desarrollaron los embriones en blastocistos. La semivida de estos transcritos era aproximadamente 21 horas. Los factores maternos clásicos de otros organismos modelo, tales como GDF9 y ZAR1, así como los genes específicos de células germinales (ovocito) VASA y DAZL quedaron incluidos en esta categoría. El ESSP2 incluyó los genes embrionarios activados, los cuales fueron transcritos por primera vez en los embriones después del estadio de 4 células. Algunos genes de esta categoría parecieron mostrar dos ondas de activación, la primera y más pequeña en el estadio de 5 a 6 células, y la segunda y más grande en el estadio de 8 células. Genes de EGA conocidos de otros organismos modelo, tales como EIF1AX31 y JARID1 B32, quedaron incluidos en esta categoría. El ESSP3 estaba compuesto de genes activados tardíos que no se expresaron hasta el estadio de blastocisto, incluido el marcador de trofoblastos GCM1. El ESSP4 contenía transcritos persistentes que mantenían la expresión estable con relación a los genes de referencia en todo el desarrollo. La semivida de estos genes era 193 horas, aproximadamente 9 veces más larga que ESSP1. Esta categoría incluía una mezcla de genes constitutivos, factores de transcripción, reguladores epigenéticos, receptores hormonales y otros. Estos 4 patrones de expresión génica se confirmaron en otro conjunto de experimentos usando 61 muestras de embriones normales y blastómeros individuales.

Los embriones anormales que exhibían un comportamiento aberrante citocinético y mitótico durante las primeras divisiones se correlacionaron con perfiles de expresión génica altamente erráticos, especialmente en los genes implicados en la gestión del RNA embrionario. Así, uno puede combinar estas metodologías para proporcionar métodos que puedan usarse para predecir la viabilidad de los embriones pre-implantacionales. Los resultados sugieren que los embriones anormales comienzan la vida con programas defectuosos en el procesamiento del RNA y la biogénesis de miRNA, causando una degradación excesiva del mRNA materno. La naturaleza estocástica de tal degradación no regulada del RNA conduce a la destrucción aleatoria de transcritos, causando la gran variedad de fenotipos aberrantes observados en embriones anormales. La disminución del nivel de los miRNA causa defectos en la degradación regulada del RNA materno, lo que lleva a la detención del desarrollo en diferentes estadios.

Análisis de blastómeros individuales. A fin de evaluar cuándo comenzó la diferenciación molecular en los embriones humanos pre-implantacionales, se analizó el nivel de expresión de CDX2 en blastómeros individuales, recogidos de 17 embriones en diferentes estadios de desarrollo. La Fig. 12A muestra el nivel relativo de expresión de dos genes, CTBBN1 (barras oscuras) y CDX2 (barras claras) en función del estadio de desarrollo, desde 2 células hasta blastocisto. Como puede verse, CDX2 se expresó esporádicamente a niveles bajos en algunos blastómeros individuales de embriones previos al estadio de 4 células (Fig. 12A). Sin embargo, a partir del estadio de 6 células en adelante, cada embrión contenía por lo menos 1 blastómero que expresaba CDX2 a un nivel significativo. El nivel de expresión del gen constitutivo CTNNB1 también mostrado en la Fig. 12A permaneció constante entre los blastómeros del mismo embrión, lo que indica que el patrón de expresión heterogéneo de CDX2 no era un artefacto de qPCR. Los datos de un experimento independiente demostraron observaciones similares. Estos resultados indican que la diferenciación molecular en embriones humanos pre-implantacionales podría ocurrir tan temprano como inmediatamente después del estadio de 4 células.

Curiosamente, la inspección de los perfiles de expresión génica en blastómeros individuales, reveló embriones que contenían blastómeros con huellas de expresión génica que corresponden a diferentes edades de desarrollo. El perfil de expresión génica de un embrión dado en cualquier momento dado es igual a la suma de la degradación del mRNA materno y la EGA. Un blastómero más joven de desarrollo temprano contiene por lo general una gran cantidad de transcritos maternos y una baja cantidad de genes cigóticos, y lo opuesto es cierto para un blastómero más viejo en una edad de desarrollo más avanzada. En este experimento, el programa material se definió como los valores medios de expresión de 10 marcadores del ESSP1 (transcritos maternos) y el programa embrionario por los valores medios de expresión de 10 marcadores del ESSP2 (transcritos embrionarios). El panel de transcritos maternos usado incluye DAZL, GDF3, IFITM1, STELLAR, SYCP3, VASA, GDF9, PDCD5, ZAR1 y ZP1, mientras que el panel de genes embrionarios incluye ATF7IP, CCNA1, EIF1 AX, EIF4A3, H2AFZ, HSP70.1, JARID1 B, LSM3, PABPC1 y SERTAD1. Entre los 6 blastómeros recogidos satisfactoriamente de este embrión de 8 células particular, 3 blastómeros mostraron una huella de expresión génica similar a la de los blastómeros de una muestra de un embrión normal de 3 células, mientras que los otros 3 blastómeros fueron similares a los blastómeros de una muestra de un embrión normal de 8 células (Fig. 12B). La explicación más probable de esta observación es la

detención de una subpoblación de células dentro del embrión. Este fenotipo de detención parcial también se observó en otro embrión de 9 células y 2 mórulas, entre las muestras analizadas. El hecho de que el nivel de transcritos maternos se mantuviera alto en los blastómeros detenidos, que habían pasado la misma cantidad de tiempo en cultivo que sus células hermanas normales, indica que la degradación del RNA materno no es un proceso espontáneo que ocurre simplemente con el tiempo sino que lo más probable es que requiera el funcionamiento de los mecanismos específicos de degradación del RNA, tales como los microRNA (miRNA). Estos datos también proporcionan una prueba más de que la degradación del mRNA materno es un evento conservado del desarrollo durante la embriogénesis de mamíferos y es necesario para el desarrollo normal del embrión (Bettegowda, A., et al., (2008) *Reprod. Fertil. Dev.* 20:45-53). Además, estos datos sugieren que los blastómeros individuales en un embrión son autónomos y pueden desarrollarse independientemente unos de los otros. Además, estos resultados indican que se pueden utilizar los ensayos del nivel de expresión génica que se describen en la presente memoria para analizar el nivel de un mRNA (lo cual es indicativo del nivel de expresión génica) en una célula que se ha de analizar, donde el RNA es de un gen conocido por ser parte del programa materno, y la persistencia de tal nivel de expresión en una estadio más tardío del desarrollo embrionario está correlacionado con una probabilidad de resultado anormal, o parte del programa embrionario, donde la ausencia en el tiempo es indicativa de una probabilidad de un resultado anormal. Los genes del programa materno examinados aquí son ZAR1, PDCD5, NLRP5, H5F1, GDF9 y BNC2. Se conocen otros genes de efecto materno y pueden ser utilizados.

Activación de genes embrionarios. Los presentes métodos están basados al menos en parte en los hallazgos de que los embriones anormales, detenidos en su desarrollo, exhiben con frecuencia ritmos aberrantes de citocinesis y mitosis durante las primeras tres divisiones antes de que ocurra la EGA (activación de genes embrionarios). Esto sugiere que el destino del desarrollo de un embrión está determinado en gran medida por la herencia materna, un hallazgo en notable concordancia con un modelo matemático de desarrollo humano pre-implantacional realizado por Hardy et al., en 2001³⁴. Por otra parte, las anomalías de la citocinesis y la mitosis están fuertemente correlacionadas con la disminución de los niveles de transcritos maternos en los genes que regulan la biogénesis de miRNA y el enmascaramiento, almacenamiento y reactivación del mRNA materno. Los miRNA regulan la traducción promoviendo la degradación del mRNA en diversos procesos biológicos, incluyendo el desarrollo del organismo y su diferenciación (Blakaj, A. & Lin, H. (2008) *J. Biol. Chem.* 283:9505-9508; Stefani, G. & Slack, F. J. (2008) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9:219-230). Cada vez más pruebas de los organismos modelo muestran que los miRNA pueden ser los reguladores clave de la degradación de transcritos maternos en embriones tempranos (Bettegowda, A., et al., (2008) *Reprod. Fertil. Dev.* 20:45-53). Por lo tanto, los defectos en la biogénesis de miRNA es probable que conduzcan al desarrollo anormal del embrión. Por otro lado, el fallo en la gestión adecuada de los mRNA maternos también puede conducir a una embriogénesis deficiente. Los ovocitos de mamíferos sintetizan una gran mezcla de transcritos de RNA materno necesaria para dar soporte al crecimiento temprano del embrión antes de nacer de la madre. Estos transcritos son reprimidos y almacenados durante un período prolongado de tiempo, hasta que son reactivados después de la fecundación. Los defectos en este programa de gestión del RNA materno afectarán probablemente a la cantidad y la calidad de los transcritos maternos y por lo tanto perjudican la posibilidad de un desarrollo satisfactorio.

Modelo para evaluar la viabilidad de los embriones. La Fig. 13 muestra un modelo del desarrollo embrionario humano basado en la obtención de imágenes y el análisis molecular correlacionados. Se muestra la línea de tiempo del desarrollo desde el cigoto hasta el blastocisto incluyendo breves momentos críticos para la predicción del desarrollo satisfactorio hasta blastocisto y un diagrama del desarrollo embrionario. Los datos moleculares clave, tal como se observan en el diagrama, indican que los embriones humanos comienzan la vida con un conjunto distinguible de los RNA del ovocito que se hereda de la madre. Este conjunto de los RNA se mantiene y se empaqueta adecuadamente por programas específicos de gestión del RNA en el huevo. Después de la fecundación, la degradación de un subconjunto de los RNA maternos específicos para el huevo (ESSP1; patrón específico del estado embrionario 1) deben ser degradados a medida que comienza la transición desde el ovocito hasta el embrión. Al mismo tiempo, otros RNA se reparten idealmente por igual entre cada blastómero a medida que continúa el desarrollo (ESSP4). La degradación y el reparto satisfactorios de los RNA culmina con la activación del genoma embrionario (EGA) y la transcripción de los genes del ESSP2 autónomamente en una célula. Cabe destacar que, durante las divisiones por escisión, los blastómeros embrionarios pueden detenerse o progresar independientemente. El resultado del desarrollo autónomo de las células en el embrión es que los blastómeros individuales pueden detenerse o progresar y a medida que progresa el embrión de 8 células hasta el estadio de mórula y más allá, la calidad del blastocisto será impactada por el número de células que se detengan o progresen más allá de 8 células. Los datos de las imágenes demuestran que existen períodos críticos del desarrollo que predicen el éxito o el fracaso: la primera citocinesis, la segunda división por escisión y la sincronía de las segunda y tercera divisiones por escisión. Estos parámetros se pueden medir automáticamente utilizando los algoritmos de seguimiento de células y el programa informático descritos anteriormente. Los sistemas y métodos descritos se pueden utilizar para diagnosticar el resultado de los embriones con predictores de imágenes clave y pueden permitir la transferencia de menos embriones en etapas más tempranas del desarrollo (antes de la EGA).

Ejemplo 3

Obtención de imágenes de la maduración de ovocitos y del desarrollo subsiguiente del embrión.

Resultados

Una de las principales limitaciones de los actuales procedimientos de FIV es la calidad y la disponibilidad de ovocitos. Por ejemplo, los actuales protocolos de FIV reclutan los ovocitos desde la pequeña mezcla del ciclo que proporciona un pequeño número de ovocitos (por ejemplo 1-20) para la fecundación. Por otra parte, aproximadamente el 20% de los ovocitos recuperados después de la estimulación hormonal durante los procedimientos de FIV se clasifican como inmaduros, y normalmente se descartan debido a un potencial reducido para el desarrollo embrionario bajo las condiciones de cultivo actuales.

Un método para aumentar la mezcla de ovocitos es a través de la maduración *in vitro*. La Fig. 14 muestra tres estadios de desarrollo durante la maduración *in vitro*, incluyendo la vesícula germinal, la metafase I y la metafase II. Los estadios de la vesícula germinal y la metafase I se clasifican como ovocitos inmaduros, mientras que la metafase II se clasifica como madura debido a la presencia del primer cuerpo polar, que se produce a las 24-48 horas después de iniciarse la maduración *in vitro*. La Fig. 15 muestra el desarrollo embrionario de un ovocito que ha sido madurado *in vitro*.

Otro método para aumentar la mezcla de ovocitos es reclutar los ovocitos de la mezcla primaria y secundaria, que proporciona hasta varios miles de ovocitos. En este procedimiento, los folículos inactivos son reclutados en el ovario y son programados *in vitro* para producir ovocitos con la composición cromosómica, el estado epigenético, la expresión del RNA y la morfología normales. En otros aspectos, los ovocitos pueden proceder de células madre pluripotentes diferenciadas *in vitro* hasta células germinales y maduras hasta ovocitos humanos.

Como se ilustra en la Fig. 14, el proceso de maduración de un ovocito *in vitro* está marcado por varios cambios celulares que pueden ser utilizados para definir parámetros celulares para medición y análisis en los métodos de la presente invención. Estos incluyen, por ejemplo, los cambios en la morfología de la membrana del ovocito, por ejemplo, la velocidad y extensión de separación de la zona pelúcida; los cambios en la morfología del núcleo del ovocito, por ejemplo, el comienzo, la finalización y la tasa de rotura de la vesícula germinal (GVBD); la velocidad y la dirección del movimiento de los gránulos en el citoplasma y el núcleo; y el movimiento y la extrusión del primer cuerpo polar.

Ejemplo 4

Obtención de imágenes de la diferenciación de células madre.

Resultados

El análisis de imágenes secuenciales también se puede utilizar para evaluar la viabilidad, el potencial de desarrollo y el resultado de otros tipos de células, tales como células madre, células madre pluripotentes inducidas (CMPi) y células madre embrionarias humanas (CMEh). El potencial de desarrollo de las células madre puede evaluarse usando análisis de imágenes secuenciales para medir los cambios en la morfología durante el desarrollo y la diferenciación celulares (Fig. 17). Las células diferenciadas pueden entonces ser analizadas y seleccionadas para el trasplante *in vivo* u otro uso. Varios parámetros de las células madre pueden ser extraídos y analizados a partir de datos de imágenes secuenciales, tales como la duración de la citocinesis, el tiempo entre los eventos de mitosis, tamaño y forma celular, número de células, movimiento de las células, patrones de división, diferenciación, división asimétrica (donde una célula hija mantiene una célula madre, mientras que la otra se diferencia), división simétrica (donde ambas células hijas o bien permanecen como células madre o bien se diferencian ambas) y la especificación del destino (determinando con exactitud cuándo se diferencia una célula madre).

La fórmula básica de la terapia de células madre es que las células madre no diferenciadas pueden ser cultivadas *in vitro*, diferenciarse en tipos de células específicos y posteriormente ser trasplantadas a los receptores para la regeneración de tejidos dañados y/u órganos. El análisis de imágenes secuenciales se puede utilizar como un dispositivo de alto rendimiento no invasivo para identificar las células madre que forman una progenie diferenciada no tumorigénica capaz de integración en tejidos maduros. Las aplicaciones potenciales incluyen el tratamiento de trastornos neurológicos, tales como el Alzheimer y el Parkinson, trastornos del sistema vascular y las enfermedades cardíacas, trastornos musculares y óseos, tal como artritis, enfermedades autoinmunitarias y cánceres, así como el descubrimiento de fármacos por la evaluación de dianas y nuevos productos terapéuticos.

En los seres humanos, los tejidos dañados son generalmente reemplazados por el reclutamiento continuo y la diferenciación de células madre en el cuerpo. Sin embargo, la capacidad del cuerpo para la regeneración se reduce con el envejecimiento. Un ejemplo de esto es la incontinencia urinaria que resulta de la deficiencia del esfínter. El envejecimiento se cree que es una de las principales causas de la deficiencia del esfínter, porque el número de fibras musculares y la densidad de los nervios disminuyen con la edad. Con el fin de tratar a las pacientes con incontinencia, se pueden derivar CMPi de fibroblastos cultivados de tejidos de la pared vaginal con el fin de producir células musculares lisas diferenciadas. Estas células diferenciadas pueden entonces ser trasplantadas *in vivo*. Antes del trasplante, se puede utilizar el análisis de imágenes secuenciales para caracterizar las CMPi con respecto a la pluripotencia, diferenciación, metilación y tumorigenicidad. Otras aplicaciones incluyen la obtención de imágenes secuenciales de CMPi que proceden de células de la piel de los pacientes con Parkinson y se diferencian en neuronas para trasplante (Fig. 18).

Ejemplo 5

Validación de los parámetros de la obtención de imágenes a través del análisis automatizado

Como lo demuestran los datos de las imágenes secuenciales, el desarrollo embrionario humano es un proceso altamente variable entre los embriones dentro de una cohorte y los embriones pueden exhibir una amplia gama de comportamientos durante la división celular. Por lo tanto, la caracterización manual de ciertos eventos de desarrollo, tal como la duración de la citocinesis altamente anormal (Fig. 4) puede estar sometida a interpretación. Para validar nuestros parámetros de obtención de imágenes y la capacidad para predecir sistemáticamente la formación de blastocistos, hemos desarrollado un algoritmo para el seguimiento automatizado de las divisiones celulares hasta el estadio de 4 células. Nuestro algoritmo de seguimiento emplea una técnica de estimación del modelo probabilístico basada en métodos secuenciales de Monte Carlo. Esta técnica funciona generando distribuciones de modelos hipotéticos de embriones, simulando imágenes basadas en un modelo óptico sencillo y comparando estas simulaciones con los datos de las imágenes observadas (Fig. 21a).

Los embriones fueron modulados como una colección de elipses con posición, orientación e índice de solapamiento (para representar las alturas relativas de las células). Con estos modelos, se puede extraer la duración de la citocinesis y el tiempo entre mitosis. La citocinesis está definida típicamente por la primera aparición del surco de citocinesis (donde se forman indentaciones bipolares a lo largo del eje de escisión) hasta la separación completa de las células hijas. Hemos simplificado el problema por la aproximación de la citocinesis como la duración del alargamiento de las células antes de la división de 1 célula en 2 células. Una célula se considera alargada si la diferencia de las longitudes de los ejes supera el 15% (elegido empíricamente). El tiempo entre la mitosis se deduce directamente contando el número de células en cada modelo.

Hemos probado nuestro algoritmo en un conjunto de 14 embriones humanos (Fig. 21b) y comparamos las mediciones automatizadas con el análisis manual de imágenes (Fig. 21c, Fig. 21d). En este conjunto de datos, 8 de los 14 embriones alcanzaron el estadio de blastocisto, con buena morfología (parte superior de la Fig. 21e). Las mediciones automatizadas fueron emparejadas cuidadosamente con las mediciones manuales y predijeron correctamente que la totalidad de los 8 embriones se desarrollaban hasta blastocistos. 2 de los 14 embriones se desarrollaron hasta blastocistos con morfología deficiente (mala calidad de la masa celular interna; parte inferior de la Fig. 21e). Para estos embriones, la evaluación manual indicó que 1 se desarrollaría hasta blastocisto y 1 se detendría, mientras que la evaluación automatizada predijo que ambos se detendrían. Por último, 4 de los 14 embriones se detuvieron con anterioridad al estadio de blastocisto, y ambos métodos predijeron correctamente que se detendrían.

Marco del filtro de partículas

El filtro de partículas es una técnica de estimación de modelos basada en la simulación de Monte Carlo. Se utiliza para estimar modelos desconocidos u "ocultos" generando distribuciones de modelos hipotéticos y comparando estos modelos con los datos observados. Su capacidad para adaptarse a la dinámica de los movimientos arbitrarios y las incertidumbres en las mediciones hace que sea un candidato ideal para el seguimiento de las divisiones celulares.

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

Una estimación del estado actual x en cada etapa de tiempo t se representa con una distribución de probabilidad posterior. Este concepto de posterior se refiere a menudo como la creencia y se define como la probabilidad condicional del estado actual x_t dadas todas las mediciones de imágenes pasadas $z_{1:t}$ y de los controles pasados $u_{1:t}$.

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

El filtro de partículas aproxima la distribución de probabilidad posterior a un conjunto de muestras ponderadas, o partículas, denominadas:

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

donde M es el número de partículas. Los términos partículas y modelos embrionarios se utilizan indistintamente en la presente memoria. Por lo tanto, una sola partícula $x_t^{[m]}$ (donde $1 \leq m \leq M$) es una hipótesis del modelo embrionario en el tiempo t .

Después de la inicialización, el filtro de partículas aplica varias veces tres etapas. La primera etapa es la predicción,

donde se propaga cada partícula usando la entrada de control:

$$\mathbf{x}_t^{[m]} \sim p(\mathbf{x}_t | \mathbf{u}_t, \mathbf{x}_{t-1}^{[m]}).$$

La serie resultante de partículas es una aproximación de la probabilidad previa. La segunda etapa es la actualización de las mediciones, donde a cada partícula se le asigna una ponderación de su importancia que corresponde a la probabilidad de la medición actual:

$$\mathbf{w}_t^{[m]} = p(\mathbf{z}_t | \mathbf{x}_t^{[m]}).$$

El conjunto de partículas ponderadas es una aproximación de la distribución de probabilidad posterior $bel(\mathbf{x}_t)$.

Un componente clave del filtro de partículas entra en la tercera etapa, donde el conjunto de partículas se remuestrea de acuerdo con sus ponderaciones. Esta etapa de remuestreo enfoca la distribución de partículas en la región de la máxima probabilidad.

Representación de células

Las células están representadas como elipses en el espacio de 2D. Cada célula tiene un eje mayor, un eje menor y una posición con 2 dimensiones en coordenadas cartesianas, dadas por la ecuación:

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

Cada elipse tiene también una dirección de rumbo θ (viraje), que permite que gire en el plano x-y. Puesto que las elipses casi siempre se solapan unas con otras, también hemos nombrado un índice de solapamiento h , que especifica el orden de solapamiento (o la altura relativa de las células). Los parámetros para cada modelo embrionario en el tiempo t , por lo tanto se expresan como:

$$\mathbf{x}_t^{[m]} = \begin{bmatrix} x_{01} & y_{01} & a_1 & b_1 & \theta_1 & h_1 \\ x_{02} & y_{02} & a_2 & b_2 & \theta_2 & h_2 \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ x_{0N} & y_{0N} & a_N & b_N & \theta_N & h_N \end{bmatrix},$$

donde N es el número de células en este modelo.

Perturbación y división de las células

La primera etapa del filtro de partículas es la predicción, donde se propaga cada partícula usando la entrada de control. Para nuestra aplicación, hay dos tipos de comportamiento que queremos modelizar. El primer tipo de comportamiento incluye el movimiento celular, que incluye la traslación, la rotación alrededor del ángulo de viraje y los cambios en la longitud de los ejes mayor y menor. El segundo tipo de comportamiento es la división celular, donde una célula se divide en dos células nuevas.

Para modelizar el movimiento celular, nuestra entrada de control toma una partícula y perturba aleatoriamente cada valor para cada célula: x_{0i} , y_{0i} , a_i , b_i , θ_i . La perturbación se muestrea aleatoriamente desde una distribución normal con una varianza relativamente pequeña (usualmente fijada en el 5% de los valores inicializados).

Para modelizar la división celular, usamos la siguiente aproximación. En un punto dado en el tiempo, para cada partícula, asignamos una probabilidad del 50% de que se divida una de las células. Este valor fue elegido empíricamente y abarca una amplia gama de posibles divisiones celulares, mientras se mantiene una buena cobertura de la configuración actual. Si se predice una división, a continuación, la célula que se divide es elegida aleatoriamente. Un modelo más sofisticado podría tener en cuenta factores adicionales, tales como el número de

células en una partícula y la historia de sus patrones de división, y podría crear potencialmente modelos basados en el comportamiento observados a partir de datos reales.

Cuando una célula se elige para dividirse, se aplica una división simétrica a lo largo del eje mayor de la elipse, produciendo dos células hijas de igual tamaño y forma. Cada valor de las células hijas es entonces perturbado aleatoriamente. La perturbación se muestrea de nuevo a partir de una distribución normal, pero con una varianza mayor (10% de los valores inicializados) para acomodar una gran variabilidad de nuevas formas de células. Finalmente, los índices de solapamiento de las dos células hijas se seleccionan aleatoriamente, manteniendo mientras su solapamiento colectivo con respecto al resto de las células.

Simulación de imágenes

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

Hay dos observaciones físicas que deben ser tenidas en cuenta. En primer lugar, aunque el microscopio enfoca a un solo plano a través del embrión, la profundidad de campo es bastante grande y se recoge luz fuera de foco de casi todo el embrión. Y segundo, los embriones son parcialmente transparentes, lo que significa que las membranas de las células en la parte inferior del embrión a veces pueden (pero no siempre) ser vistas a través de las células de la parte superior del embrión.

Teniendo en cuenta estas observaciones físicas, se describe ahora el modelo de simulación de imágenes. Para cada célula, su forma elíptica correspondiente se proyecta sobre la imagen simulada utilizando el índice de solapamiento h . Los valores de los píxeles correspondientes se establecen en un valor binario de 1 y se dilatan para crear un espesor de membrana comparable a los datos de las imágenes observadas. El índice de solapamiento h especifica el orden en el cual se encuentran las células unas sobre otras. Dado que las membranas celulares ocluidas son visibles solamente algunas veces, si se detectan puntos ocluidos, se colocan en la imagen simulada con baja probabilidad (típicamente alrededor del 10%). En la práctica, mientras que estos puntos de membrana ocluidos son necesarios para el modelado exacto de la forma, es importante hacerlos lo suficientemente escasos como para que no se parezcan a un borde visible.

Preprocesamiento de imágenes

A continuación se describirá la variable de medición z . Un objetivo del método de la presente invención consiste en extraer imágenes binarias de las membranas celulares de las imágenes del microscopio para la comparación con las imágenes simuladas. Estas membranas exhiben gran curvatura y alto contraste, pero no es fácil extraerlas usando técnicas basadas en umbrales de intensidad o de color. Por consiguiente, se emplea un detector basado en las curvaturas principales. Este método utiliza el operador Hessiano:

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

donde I_{xx} , I_{xy} e I_{yy} , son derivadas parciales de segundo orden evaluadas en la localización de píxel s y a escala Gaussiana σ . Los valores de Eigen de la matriz Hessiana 2×2 proporcionan información acerca de las curvaturas principales, mientras que el signo de los valores de Eigen distinguen "valles" de "crestas" 43. Para detectar los picos o crestas brillantes, la curvatura principal en cada píxel se calcula como

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

donde λ_2 es el valor de Eigen mínimo. Para detectar las membranas de espesor variable, se aplica el operador Hessiano en un intervalo de escalas (es decir, $\sigma_{\min} \leq \sigma \leq \sigma_{\max}$) y se extrae la curvatura máxima en toda esta gama. Finalmente, a la imagen Hessiana se le asigna un umbral para crear una imagen binaria de las membranas celulares extraídas. El nivel umbral se establece normalmente en dos veces la desviación típica de los valores de píxeles en la matriz Hessiana.

Ponderaciones de partículas

Como se describe en el apartado titulado "Marco del filtro de partículas", la segunda etapa principal del filtro de

partículas es la actualización de las mediciones, en donde a las partículas se les asigna una ponderación de importancia que corresponde a la probabilidad de la medición actual dado un modelo particular. En nuestro caso, la ponderación de importancia se determina comparando la imagen del microscopio preprocesada que se analizó anteriormente con la imagen simulada que también se analizó anteriormente.

- 5 Este problema ha sido investigado previamente, donde las ponderaciones del filtro de partículas se calcularon comparando imágenes simuladas con imágenes reales utilizando información mutua normalizada. Este enfoque es similar a la idea de emparejamiento con la ocupación de rejillas, que busca localizaciones de píxeles que están ambas ocupadas (valor 1) o ambas vacías (valor 0). Estos métodos pueden tener problemas cuando las imágenes simuladas y reales son similares en forma, pero están ligeramente desalineadas. En su lugar, el método que se describe utiliza una función de probabilidad basado en la distancia de sesgo, que mide el valor medio de las distancias más cercanas desde un conjunto de puntos a otro. Se definen dos conjuntos de puntos A (en el conjunto de números reales de tamaño m) y B (en el conjunto de números reales de tamaño n), correspondientes a los píxeles que no son cero en la imagen simulada y en la imagen real, respectivamente. La distancia de sesgo hacia adelante desde el conjunto de puntos A a B viene dada por:

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

La distancia de sesgo hacia atrás se define similarmente. El presente método emplea la distancia de sesgo simétrico, que proporciona una medición de hasta qué punto la imagen simulada coincide con la imagen real, así como de hasta qué punto la imagen real coincide con la imagen simulada:

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

- 20 En la práctica, las mediciones de distancias individuales se truncan para reducir la influencia del ruido. Para reducir el tiempo de cálculo, las distancias se determinan observando las localizaciones de píxeles en las transformadas de distancia de las imágenes.

- La distancia de sesgo se utiliza como una medición de probabilidad de nuestra medición de datos dado el modelo estimado. Es decir, en el tiempo t, para una medición de imagen dada z_t y un modelo de partículas $x_{t[m]}$, la ponderación de la importancia de la partícula viene dada por:

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

La constante λ se fija normalmente en 1 y se puede variar para controlar la “planicidad” de la distribución de probabilidad.

Remuestreo de partículas y asignación dinámica

- 30 La tercera etapa principal del filtro de partículas es el remuestreo, donde las partículas se seleccionan en proporción a su ponderación para crear un nuevo conjunto de partículas. Las partículas con baja probabilidad se descartan, mientras que las partículas con alta probabilidad se multiplican. Ha habido mucho trabajo previo en el desarrollo de algoritmos eficaces para el remuestreo. El presente método utiliza la aproximación de baja varianza.

- 35 Una cuestión importante en los filtros de partículas es la elección del número de partículas. La opción más sencilla es utilizar un valor fijo, por ejemplo, $M = 1000$. Luego, para cada etapa de tiempo, el conjunto de partículas M se transforma en otro conjunto del mismo tamaño. En el contexto de la aplicación, puede haber períodos relativamente largos de tiempo durante los cuales las células están inactivas o simplemente cambiando ligeramente de tamaño y posición. Se aprovecha esta observación para reducir la carga de procesamiento asignando dinámicamente el número de partículas de acuerdo con la cantidad de actividad celular. Es decir, cuando las células están activas y dividiéndose, aumentamos el número de partículas y cuando las células están inactivas, reducimos el número de partículas.

- 45 Para medir el grado de actividad celular, se calcula la suma de las diferencias al cuadrado (SDC) en las intensidades de píxeles entre la nueva imagen (adquirida por el microscopio) y la imagen anterior. Para reducir el ruido, las imágenes primero se suavizan con un filtro Gaussiano y se suaviza el valor de SDC a lo largo del tiempo con una media móvil de causalidad. A continuación se ajusta dinámicamente el número de partículas en proporción a este valor y se trunca para que permanezca dentro de los límites $100 < M < 1000$. La Fig. 30 es un gráfico que muestra

cómo podría asignarse el número de partículas a un embrión que se divide desde el estadio de 1 célula al de 4 células. Cabe señalar que este método sólo proporciona una medición de la cantidad de “actividad” en la imagen, pero no distingue entre la división celular y el movimiento de embriones (traslación y/o rotación) porque no se realizó un registro de imagen previo. En esta situación (determinar el número de partículas) esto es aceptable ya que el número de partículas debería aumentar en cualquier evento. En la práctica, ajustamos también el número de partículas basándonos en el número de células en el modelo embrionario más probable. Es decir, se generan más partículas cuando se cree que están presentes más células en las imágenes.

Limitaciones del seguimiento en dos dimensiones

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

Representación de la célula y seguimiento en tres dimensiones

Este apartado describe un algoritmo para el seguimiento en 3D de la división celular. Muchas de las etapas del algoritmo en 2D se llevan sobre este algoritmo, con algunas excepciones clave. Hay una nueva representación de la célula para su uso en 3D. Las células están representadas como elipsoides en el espacio de 3D, dado por la ecuación:

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

Cada elipsoide también tiene una dirección de rumbo θ , rotación longitudinal o tono ψ y rotación lateral o de rodillo α . Por lo tanto, la representación de cada modelo embrionario en el tiempo t viene dada por:

$$\mathbf{x}_t^{[m]} = \begin{bmatrix} x_{01} & y_{01} & z_{01} & a_1 & b_1 & c_1 & \theta_1 & \psi_1 & \alpha_1 \\ x_{02} & y_{02} & z_{02} & a_2 & b_2 & c_2 & \theta_2 & \psi_2 & \alpha_2 \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ x_{0N} & y_{0N} & z_{0N} & a_N & b_N & c_N & \theta_N & \psi_N & \alpha_N \end{bmatrix}$$

Un efecto importante de este modelo revisado es que puede haber ambigüedades asociadas a inferir formas en 3D a partir de imágenes en 2D. Por ejemplo, una célula que es de forma esférica tendría una apariencia similar a una célula con un eje principal más largo y una rotación longitudinal más grande. Esto no es una preocupación importante, ya que como se verá más adelante, la distribución de partículas mantendrá estas hipótesis múltiples hasta que haya suficiente información disponible para hacer una distinción (por ejemplo, de un evento como la división celular).

Los elipsoides se consideran rígidos; es decir, la deformación no está explícitamente modelada. Sin embargo, permitimos una pequeña cantidad de solapamiento entre elipsoides vecinos y suponemos que en estas regiones de solapamiento las células están aplanadas unas contra otras. Esta es una consideración importante, puesto que se observa comúnmente en los embriones, de la que damos cuenta en los siguientes apartados.

Perturbación y división de las células

Nuestro modelo de perturbación y división de las células en 3D es similar al modelo del Apartado 4, “Perturbación y la división de las células”, con algunas excepciones clave. La estimación de la forma en 3D se puede utilizar para reforzar la conservación de volumen. Esto evita que las células crezcan y se vuelvan arbitrariamente grandes, particularmente en la dirección z . La conservación del volumen se aplica en dos situaciones. En primer lugar, para la perturbación de una célula, se varían los ejes A y B , y se calcula c de manera que el volumen se conserve para esa

célula individual. En segundo lugar, para la división de una célula, se aplica la siguiente restricción:

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

donde el subíndice p indica una célula parental y los subíndices d1 y d2 representan las dos células hijas. En la práctica, permitimos una ligera violación de estas restricciones dejando que el volumen total del embrión fluctúe entre más/menos 5% del volumen original. Esto se utiliza para compensar las potenciales inexactitudes en la estimación del volumen inicial.

Cuando se elige una célula para ser dividida en 3D, su división se modela de la siguiente manera. En primer lugar, para la célula individual elegida, se aplica una división a lo largo del eje largo de la elipse, que podría ser o bien a, b, o c dependiendo de la configuración. Las células hijas se inicializan para ser iguales en tamaño y estar separadas uniformemente, teniendo en cuenta la rotación de la célula parental. Sus parámetros son entonces perturbados para cubrir una amplia gama de configuraciones posibles, usando de nuevo una distribución normal con una varianza ajustada a 10% de los valores inicializados.

Restricciones geométricas

Los problemas de oclusión y ambigüedad en la profundidad están parcialmente mitigados por la conservación del volumen. Sin embargo, también son necesarias restricciones con respecto a las relaciones espaciales con los elipsoides vecinos. La primera restricción es que está prohibido que las células se solapen en más de 20% de radio. Para las células que se solapan en una cantidad aceptable, se hace la suposición de que se han aplanado unas contra otras. El modelo de partículas que se describe representa este fenómeno ignorando los puntos dentro de la de elipsoides que intersecan durante la simulación de imágenes. Esto tuvo motivaciones empíricas y se correlaciona bien con el comportamiento observado físicamente.

Se impone una segunda restricción que mantiene las células estrechamente próximas. Esta restricción está directamente relacionada con el comportamiento físico de los embriones humanos, donde las células están restringidas por una membrana llamada zona pelúcida. La zona se modela como una envoltura esférica y se utiliza para imponer condiciones de contorno. El radio de la zona se establece como 30% mayor que el radio del embrión de 1 célula.

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

Simulación de imágenes

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

Ejemplo de seguimiento de células en 2D

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

La obtención de imágenes de los embriones comenzó cuando eran cigotos o huevos fecundados con forma

aproximadamente esférica. Para inicializar el conjunto de partículas, se calcula el umbral Hessiano como se describe en el Apartado 6, "Preprocesamiento de imágenes" y se ajusta a un círculo utilizando mínimos cuadrados. Todas las partículas se inicializan luego como círculos con orientaciones aleatorias muestreados de una distribución uniforme.

La Fig. 31 muestra los resultados del algoritmo en 2D para el seguimiento de las divisiones celulares del estadio de 1 célula a 4 células. Los resultados muestran que las membranas celulares fueron extraídas satisfactoriamente por el algoritmo, incluso para las células situadas hacia la parte inferior que están parcialmente ocluidas. Cabe señalar que en la mayoría de aplicaciones del filtro de partículas, el "único" mejor modelo se representa frecuentemente como una suma ponderada de los parámetros de estado de la distribución de partículas. Sin embargo, para los resultados presentados en la presente memoria, se muestra la partícula con la mayor probabilidad.

Ejemplo de seguimiento de células en 3D.

La Fig. 32 muestra dos aplicaciones satisfactorias del algoritmo para 3D anteriormente descrito para el seguimiento desde el estadio de 1 célula hasta el de 4 células. La Fig. 33 es un diagrama que muestra un ejemplo de cómo las partículas se distribuyen durante una división de 1 célula a 2 células (correspondiente al primer ejemplo mostrado en la Fig. 32). Este gráfico muestra la localización en 3D de los centros de cada célula. A medida que la célula empieza a dividirse, las predicciones muestran una ambigüedad en cuanto a qué célula hija se encontrará en la parte superior de la otra, pero esto se resuelve en un par de marcos.

Extracción de los parámetros predictores

Una vez que los embriones han sido modelados usando los métodos descritos anteriormente, pueden extraerse de los modelos ciertos parámetros. Típicamente, se utiliza el modelo mejor o el más probable. Estos parámetros incluyen, por ejemplo, la duración de la primera citocinesis, el tiempo entre la primera y la segunda divisiones celulares, y el tiempo entre la segunda y tercera divisiones celulares. La duración de la citocinesis se puede aproximar midiendo cuánto tiempo tarda en largarse un modelo de una célula antes de dividirse en dos células. El alargamiento se puede medir observando la relación de los ejes mayor y menor de la elipse. Otros parámetros que se pueden extraer de los modelos incluyen el tiempo entre la fecundación y la primera división celular, las formas y simetrías de las células y los procesos de división, los ángulos de división, fragmentación, etc. Los parámetros pueden ser extraídos utilizando el algoritmo de seguimiento de la célula en 2D o el algoritmo de seguimiento de la célula en 3D.

La citocinesis está definida por la primera aparición del surco de citocinesis hasta la separación completa de las células hijas. Puesto que nuestros modelos embrionarios se componen de elipses no deformables, es un reto la identificación de la aparición del surco de citocinesis. Un método sería permitir que se deformen las elipses, pero esto da como resultado un problema de seguimiento más complejo. Otro método sería buscar cambios en la curvatura de la imagen preprocesada del microscopio; sin embargo, esto frustra el propósito de tratar de medir nuestros parámetros predictivos directamente desde los modelos embrionarios. Por lo tanto, simplificamos el problema aproximando la duración de la primera citocinesis a la duración del alargamiento de las células antes de la división de 1 célula a 2 células. El alargamiento se cuantifica calculando la relación entre el eje mayor a y el eje menor b de la elipse. Una célula se considera alargada si:

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

Este valor de 15% fue elegido empíricamente y funciona bien para este conjunto de datos en particular; sin embargo, se pueden utilizar otros valores. Una vez que un modelo embrionario se ha dividido en 2 células, podemos extraer la duración aproximada de la primera citocinesis calculando la duración del alargamiento para el modelo de 1 célula.

En principio, medir el tiempo entre los eventos de mitosis es sencillo. Por ejemplo, el tiempo entre la primera y segunda mitosis se puede medir como el tiempo entre el modelo de 2 células y el modelo de 3 células. Sin embargo, en algunos casos los embriones pueden exhibir un comportamiento inusual y aleatorio. Esto incluye, por ejemplo, un embrión que va desde 1 célula a 2 células, desde 2 células a aparentemente 3 ó 4 células, y luego de nuevo a 2 células. El algoritmo descrito es capaz de seguir este tipo de comportamientos, pero plantea un reto para determinar el intervalo de tiempo entre los eventos de mitosis.

Una forma de tratar este comportamiento es la siguiente: En lugar de medir el tiempo entre un modelo de 2 células y de 3 células (con el fin de encontrar el tiempo entre la primera y segunda mitosis), esto se puede aproximar contando simplemente el número de marcos de imagen en los que es más probable un modelo 2 células. Esto funciona bien en algunos casos, pero no siempre es representativo del tiempo real entre los eventos de mitosis. También se pueden tratar estos eventos forzando una restricción sobre los modelos basada en el número de células. Es decir, cuando se elige el modelo mejor o más probable de la distribución en cada iteración, se puede exigir que el número de células en el modelo siempre sea el mismo o que aumente, pero nunca que disminuya. Después de forzar esta restricción, es sencillo calcular el tiempo entre los eventos de mitosis. Esta restricción también es útil para filtrar los resultados de seguimiento que pueden mostrar pequeñas cantidades de fluctuación,

que se pueden producir ocasionalmente cuando un modelo cambia de atrás a delante entre, por ejemplo, un modelo de 1 célula y de 2 células.

Método para la extracción de parámetros predictores

La Fig. 35 muestra un diagrama de flujo que resume los métodos descritos anteriormente. El diagrama de flujo muestra cómo puede analizarse un solo embrión (aunque esto se puede aplicar a múltiples embriones u otros tipos de células y células madre). En la primera etapa, se adquiere una imagen de un embrión con un microscopio secuencial ("medición"). Esta imagen se puede guardar en un archivo y recuperar en un momento posterior. La imagen es usualmente preprocesada con el fin de mejorar ciertas características, aunque esto no es necesario. Se predicen modelos de configuraciones posibles de embriones, y se simulan imágenes a partir de estos modelos ("predicción"). La imagen simulada podría incluir imágenes de membranas celulares, como se describió anteriormente, o imágenes que representen más exactamente las imágenes del microscopio antes del preprocesamiento. Los modelos se comparan luego con la imagen preprocesada del microscopio ("comparación"). Usando esta comparación, se mantienen las mejores predicciones, mientras que se descartan las malas predicciones. A continuación se emplea el conjunto de predicciones resultante para mejorar las predicciones para la próxima imagen. Después de realizar este proceso para múltiples imágenes secuenciales, es posible medir directamente parámetros morfológicos desde el(los) mejor(es) modelo(s), tales como, por ejemplo, la duración de la citocinesis y el tiempo entre eventos de mitosis. Estos parámetros se pueden utilizar para evaluar la viabilidad de un embrión, como se indicó anteriormente.

Ejemplo 7

Análisis automatizado de la actividad celular

Los métodos descritos anteriormente requieren la capacidad de seguimiento del desarrollo de células por microscopía. Para los embriones, es deseable realizar un seguimiento de embriones múltiples, que se cultivan juntos en la misma cápsula. Los métodos analíticos utilizados en la presente memoria también requieren que las imágenes se tomen periódicamente (por ejemplo, cada 1-30 minutos durante 1-5 días para los embriones; pueden utilizarse diferentes intervalos de tiempo para otros tipos de células, tales como células madre). Por tanto, se ideó un método de obtención de imágenes para realizar un seguimiento automático del desarrollo embrionario.

En microscopía secuencial, las células se cultivan en condiciones controladas y se obtienen imágenes durante un período prolongado de tiempo para monitorizar procesos tales como la motilidad (movimiento en el entorno), la proliferación (crecimiento y división), y los cambios en la morfología (tamaño y forma). Debido a la longitud de los experimentos y a las enormes cantidades de datos de imágenes generados, puede ser una tarea tediosa la extracción de parámetros, tales como la duración y el tiempo entre las divisiones celulares. Esto es particularmente cierto para aplicaciones de alto rendimiento, donde se obtienen imágenes simultáneamente de múltiples muestras. Así pues, existe una necesidad de un programa informático de análisis de imágenes que pueda extraer automáticamente la información deseada.

Una forma de evaluar la viabilidad del embrión es medir la cantidad de "actividad celular" en las imágenes. Esto puede lograrse simplemente tomando parejas de imágenes secuenciales y comparando sus valores de píxeles. Más específicamente, para medir la cantidad de actividad celular para cada nueva imagen, se calcula la suma de diferencias a cuadrados (SDC) en las intensidades de píxeles entre la nueva imagen, denominada I' , y la imagen anterior, denominada I , para todos los píxeles solapantes i :

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

Para reducir el ruido, las imágenes pueden primeramente ser suavizadas con un filtro Gaussiano. La Fig. 28 muestra una gráfica de la actividad celular desde día 1 al día 3 de un solo embrión. Como se muestra, hay picos agudos correspondientes a la división de 1 célula a 2 células, la división de 2 células a 4 células, y la división de 4 células a 8 células en un embrión humano. Los anchos de los picos son representativos de las duraciones de las divisiones celulares.

Una de las limitaciones de este enfoque es que la métrica de SDC sólo mide la cantidad de actividad en la imagen, y eventos tales como el movimiento de embriones (tales como el desplazamiento o la rotación) puede parecer bastante similares a la división celular. Una solución a este problema es realizar un registro de imágenes antes de calcular la SDC. El registro de imágenes es el proceso de encontrar una relación geométrica entre dos imágenes con el fin de alinearlas en el mismo sistema de coordenadas, y se puede lograr utilizando una variedad de diferentes técnicas. Por ejemplo, se puede utilizar una variación de la rutina no lineal iterativa de Levenberg-Marquardt, que registra las imágenes minimizando la SDC en intensidades de píxeles solapantes. El algoritmo de LM transforma localizaciones de píxeles utilizando una matriz de homografía 3x3:

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

donde las localizaciones de los píxeles objeto x' e y' se normalizan como:

$$x' = \frac{\tilde{x}'}{w'}, \quad y' = \frac{\tilde{y}'}{w'}.$$

Así:

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

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

5

La matriz de homografía se puede aplicar a una variedad de transformaciones de imágenes, y una elección razonable en esta aplicación serían las transformaciones (Euclidea) de cuerpos rígidos. Esto alinearía las imágenes de embriones en traslación y rotación en un plano (a lo largo del eje de la cámara). Sin embargo, es posible generalizar ligeramente y utilizar una transformación afín, que permita la inclinación de las imágenes. Esta generalización puede o no ser deseable en función de la señal que se intente medir. Las ecuaciones de movimiento se convierten así en:

10

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

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

El algoritmo de LM calcula primero las derivadas parciales de e con respecto a los parámetros de movimiento desconocidos h_k utilizando la regla de cadena:

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

15

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

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

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

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

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

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

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

A continuación, utilizando estas derivadas parciales, el algoritmo de LM calcula la matriz Hessiana aproximada A (en el conjunto de números reales de tamaño 6x6) y el vector de gradiente ponderado b (en el conjunto de números reales de tamaño 6x1), añadiendo la contribución de cada píxel:

$$a_{kl} = \sum_i \frac{\delta e_i}{\delta h_k} \frac{\delta e_i}{\delta h_l},$$

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

5

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

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

donde la constante λ regula el tamaño de la etapa de la actualización del movimiento e I es la matriz de identidad.

En cada iteración del algoritmo, la primera imagen está combada de acuerdo con la estimación de movimiento actualizada y en comparación con la segunda imagen calculando la SDC de intensidades de los píxeles en las zonas de solapamiento. La presente solicitud supone que el movimiento de los embriones entre imágenes consecutivas es muy pequeño y, por lo tanto, sólo se realiza un pequeño número, fijo, de iteraciones. La Fig. 28B muestra un gráfico de actividad celular sin (28A) y con (28B) los registros de imágenes realizados para cada par de imágenes. Puesto que la función de error de la rutina de Levenberg-Marquardt es la SDC, se representa simplemente el error residual para cada registro. La Fig. 29 compara las gráficas de actividad celular para el desarrollo embrionario normal y anormal. El día 3, el momento en el que un embriólogo evaluaría normalmente la morfología, los embriones parecen similares y ambos podrían considerarse potencialmente viables. Sin embargo, sus gráficas de actividad celular son drásticamente diferentes, puesto que uno de los embriones experimenta una serie típica de divisiones celulares, mientras que el otro se divide desde el embrión de 1 célula en múltiples células y fragmentos. Como era de esperar, el embrión que tiene una gráfica de actividad normal en última instancia, alcanza el estadio de blastocisto hacia el día 5,5.

Otros tipos de registro de imágenes se pueden usar antes de calcular la SDC en las intensidades de los píxeles. Esto incluye, por ejemplo, la correlación cruzada, la correlación cruzada normalizada, la correlación de fase cruzada, la información mutua, la detección y el seguimiento de características, la transformada de aspectos invariantes a la escala (abreviadamente SIFT, por la expresión inglesa *Scale Invariant Feature Transform*), el flujo óptico y el descenso de gradiente. El preprocesamiento de imágenes puede ser o no deseable antes de su registro, tal como una mejora del aspecto o del contraste.

Modelo para evaluar la viabilidad de embriones

La Fig. 13 muestra un modelo del desarrollo embrionario humano basado en la correlación de imágenes y el análisis molecular. Se muestra la línea de tiempo del desarrollo desde el cigoto hasta el blastocisto incluyendo breves

30

momentos críticos para la predicción del desarrollo satisfactorio hasta blastocisto y un diagrama del desarrollo embrionario. Los datos moleculares clave, tal como se ve en el diagrama, indican que los embriones humanos comienzan la vida con un conjunto distinguible de los RNA del ovocito que se heredan de la madre. Este conjunto de RNA se mantiene y se empaqueta adecuadamente por programas específicos de gestión de RNA en el huevo. Después de la fecundación, la degradación de un subconjunto de los RNA maternos específicos del huevo (ESSP1; patrón específico de estadio embrionario 1) deben ser degradados a medida que comienza la transición desde el ovocito hasta el embrión. Al mismo tiempo, otros RNA se reparten idealmente por igual entre cada blastómero a medida que continúa el desarrollo (ESSP4). La degradación y compartimentación satisfactorias de los RNA culmina con la activación del genoma embrionario (EGA) y la transcripción de los genes de ESSP2 de una manera autónoma en la célula. Cabe destacar que, durante las divisiones por escisión, los blastómeros embrionarios pueden detenerse o progresar independientemente. El resultado del desarrollo autónomo de las células en el embrión es que los blastómeros individuales pueden detenerse o progresar y a medida que el embrión de 8 células progresa hasta el estadio de mórula y más allá, la calidad del blastocisto estará impactada por el número de células que se detengan o progresen más allá de 8 células. Los datos de las imágenes demuestran que existen períodos críticos del desarrollo que predicen el éxito o el fracaso: la primera citocinesis, la segunda división por escisión y la sincronía de las segunda y tercera divisiones por escisión. Estos parámetros se pueden medir automáticamente utilizando los algoritmos de seguimiento de células y el programa informático descritos anteriormente. Los sistemas y métodos descritos se pueden utilizar para diagnosticar el resultado de los embriones con predictores de imagen clave y pueden permitir la transferencia de menos embriones en etapas más tempranas del desarrollo (antes de la EGA).

Comparación del análisis de imágenes automatizado frente al manual

La Fig. 34 muestra una comparación del análisis de imagen automatizado con el análisis de imagen manual para un conjunto de 14 embriones. Los embriones 1 a 10 (según las etiquetas que aparecen sobre las gráficas) alcanzaron el estadio de blastocisto con morfología variable. Los embriones 11 a 14 se detuvieron y no llegaron a blastocisto. La Fig. 34A muestra la comparación midiendo la duración de la primera citocinesis y la Fig. 34B muestra la comparación midiendo el tiempo entre la 1ª y 2ª mitosis. Como puede observarse, los dos métodos muestran en general un buen acuerdo. Las pequeñas cantidades de discrepancia en la duración de la primera citocinesis son esperadas, puesto que se pueden atribuir al hecho de que nuestro análisis automatizado hace una aproximación midiendo el alargamiento, como se indicó anteriormente. En unos pocos casos, hay un desacuerdo mayor entre el análisis automatizado y el manual, tanto para la duración de la citocinesis, como para el tiempo entre la 1ª y 2ª mitosis. Esto ocurre con unos pocos de los embriones anormales y está causado por un comportamiento inusual que es tanto difícil de caracterizar manualmente como de seguir automáticamente. Para este grupo de embriones, y usando sólo los dos primeros criterios (duración de la primera citocinesis y tiempo entre la 1ª y 2ª mitosis), el algoritmo automático tiene cero positivos falsos. Esto sería extremadamente importante en un procedimiento de FIV donde deben ser evitados los positivos falsos. El análisis manual de imágenes tuvo un negativo falso (embrión 9), mientras que el algoritmo automatizado tuvo dos negativos falsos (embriones 9 y 10). Sin embargo, mientras que los dos embriones 9 y 10 alcanzaron técnicamente el estadio de blastocisto, mostraron una morfología deficiente en comparación con otros blastocistos y serían candidatos menos óptimos para la transferencia. Según el análisis manual de imágenes, el embrión 14 sería un positivo falso sobre la base de estos dos criterios y se necesita el tercer parámetro de duración entre la 2ª y 3ª mitosis para dar un negativo verdadero. Sin embargo, el algoritmo automatizado hace la predicción correcta utilizando sólo los dos primeros criterios. Estos resultados indican que nuestro algoritmo automatizado puede predecir satisfactoriamente blastocisto frente a no blastocisto, así como diferenciar entre diferentes calidades de blastocisto. Así, para las situaciones en las que se determina que múltiples embriones tengan buen potencial de desarrollo, es posible calcular una clasificación de sus calidades relativas, con el fin de seleccionar los mejores 1 o 2 embriones para su transferencia durante los procedimientos de FIV.

El procedimiento ilustra simplemente los principios de la invención. Se apreciará que los expertos en la técnica serán capaces de idear diversas disposiciones las cuales, aunque no se describan ni muestren explícitamente en la presente memoria, abarcan los principios de la invención y se incluyen dentro de su espíritu y alcance. Además, todos los ejemplos y lenguaje condicional mencionados aquí están principalmente destinados a ayudar al lector en la comprensión de los principios de la invención y los conceptos contribuidos por los inventores para promover la técnica, y han de ser interpretados como carentes de limitación a tales ejemplos y condiciones específicamente descritos. Es más, todas las declaraciones de la presente memoria que se refieren a principios, aspectos y realizaciones de la invención, así como sus ejemplos específicos, están propuestos para abarcar sus equivalentes tanto funcionales como estructurales. Adicionalmente, se pretende que tales equivalentes incluyan tanto equivalentes actualmente conocidos como equivalentes desarrollados en el futuro, es decir, cualesquiera elementos desarrollados que realicen la misma función, independientemente de la estructura. El alcance de la presente invención, por lo tanto, no está destinado a limitarse a las realizaciones ilustrativas mostradas y descritas en la presente memoria. Más bien, el alcance y espíritu de la presente invención están abarcados por las reivindicaciones adjuntas.

Se describen las siguientes realizaciones numeradas:

A. Un método para determinar el potencial de desarrollo de un embrión o célula pluripotente humano, que comprende:

- a) medir uno o más parámetros celulares de dicho embrión o célula pluripotente humano para llegar a una medición de parámetros celulares; y
- b) emplear dicha medición de parámetros celulares para proporcionar una determinación del potencial de desarrollo de dicho embrión o célula pluripotente.
- 5 B. El método de la realización (A), en donde dichos parámetros celulares son medibles por microscopía secuencial.
- C. El método de la realización (B), en donde se determina el potencial de desarrollo de un embrión y dicho uno o más parámetros celulares se seleccionan del grupo que consiste en:
- (i) la duración de un evento de citocinesis;
- 10 (ii) el intervalo de tiempo entre la citocinesis 1 y la citocinesis 2; y
- (iii) el intervalo de tiempo entre la citocinesis 2 y la citocinesis 3.
- D. El método de la realización (C), en donde un buen potencial de desarrollo de dicho embrión humano está indicado por:
- (i) una duración de la citocinesis 1 que es de aproximadamente 0 minutos a aproximadamente 30 minutos;
- 15 (ii) un intervalo de tiempo entre la resolución de la citocinesis 1 y el comienzo de citocinesis 2 que es aproximadamente 8 - 15 horas; y/o
- (iii) un intervalo de tiempo entre el comienzo de la citocinesis 2 y el comienzo de la citocinesis 3 que es aproximadamente 0 - 5 horas.
- E. El método de la realización (D), en donde dicha etapa de medición comprende además medir la duración del ciclo celular 1.
- 20 F. El método de la realización (E), en donde un buen potencial de desarrollo del embrión humano está indicado por una duración del ciclo celular 1 que es aproximadamente 20 - 27 horas.
- G. El método de la realización (C), en donde dicha etapa de empleo comprende comparar dicha medición de parámetros celulares con una medición de parámetros celulares de un embrión humano de referencia y emplear el resultado de dicha comparación para proporcionar una determinación del potencial de desarrollo de dicho embrión humano.
- 25 H. El método de la realización (G), en donde un potencial de desarrollo deficiente de dicho embrión humano está indicado por:
- (a) una citocinesis 1 más larga para dicho embrión humano que para dicho embrión humano de referencia;
- 30 (b) un intervalo de tiempo más largo o más corto entre la resolución de la citocinesis 1 y el comienzo de la citocinesis 2 para dicho embrión humano que para dicho embrión humano de referencia; y/o
- (c) un intervalo de tiempo más largo entre el comienzo de la citocinesis 2 y el comienzo de la citocinesis 3 para dicho embrión humano que para dicho embrión humano de referencia.
- I. El método de la realización (H), en donde dicha medición comprende además medir la duración del ciclo celular 1.
- 35 J. El método de la realización (I), en donde un potencial de desarrollo deficiente de dicho embrión humano está indicado por un ciclo celular 1 más largo para el embrión que para dicho embrión humano de referencia.
- K. El método de la realización (A), en donde uno o más parámetros celulares son niveles de expresión génica que se miden para llegar a una medición de la expresión génica.
- 40 L. El método de la realización (K), en donde se determina el potencial de desarrollo de un embrión, y dicho uno o más genes se seleccionan del grupo que consiste en Cofilin, DIAPH1, ECT2, MYLC2/MYL5, DGCR8, Dicer/DICER1, TARBP2, CPEB1, Symplekin/SYMPK, YBX2, ZAR1, CTNNB1, DNMT3B, TERT, YY1, IFGR2/IFNGR2, BTF3 y NELF.
- 45 M. El método de la realización (K), en donde dicha etapa de empleo comprende comparar dicha medición de la expresión génica con una medición de la expresión génica de un embrión o célula pluripotente de referencia, y usar el resultado de dicha comparación para proporcionar una determinación del potencial de desarrollo de dicho embrión o célula pluripotente humano.

- 5 N. El método de la realización (N), en donde se determina el potencial de desarrollo de un embrión, y un nivel inferior de la expresión de uno o más genes seleccionados del grupo que consiste en Cofilin, DIAPH1, ECT2, MYLC2/MYL5, DGCR8, Dicer/DICER1, TARBP2, CPEB1, Symplekin/SYMPK, YBX2, ZAR1, CTNNB1, DNMT3B, TERT, YY1, IFGR2/IFNGR2, BTF3 y NELF en dicho embrión con relación a dicho embrión de referencia es indicativo de un potencial de desarrollo deficiente.
- O. Un método para clasificar embriones o células pluripotentes humanos unos con respecto a otros, que comprende las etapas de:
- 10 (a) medir al menos un parámetro celular para cada embrión o célula pluripotente humano para llegar a una medición de parámetros celulares para cada embrión o célula pluripotente; y
- (b) emplear dicha al menos una medición de parámetros celulares de cada uno de dichos embriones o células pluripotentes para clasificar dichos embriones o células pluripotentes humanos unos con respecto a otros.
- P. El método de la realización (O), en el que dicho al menos un parámetro celular es medible por microscopía secuencial.
- 15 Q. El método de la realización (P), en donde se clasifican los embriones y dicho al menos un parámetro celular se selecciona del grupo que consiste en:
- (i) la duración de un evento de citocinesis;
- (ii) el intervalo de tiempo entre la citocinesis 1 y la citocinesis 2; y
- (iii) el intervalo de tiempo entre la citocinesis 2 y la citocinesis 3.
- 20 R. El método de la realización (Q), en donde dicha etapa de medición comprende además medir la duración del ciclo celular 1.
- S. El método de la realización (A), en donde dicho uno o más parámetros celulares son los niveles de expresión de uno o más genes.
- 25 T. El método de la realización (S), en donde dicho uno o más genes se seleccionan del grupo que consiste en Cofilin, DIAPH1, ECT2, MYLC2/MYL5, DGCR8, Dicer/DICER1, TARBP2, CPEB1, Symplekin/SYMPK, YBX2, ZAR1, CTNNB1, DNMT3B, TERT, YY1, IFGR2/IFNGR2, BTF3, y NELF.
- U. El método de la realización (O), en donde dicha etapa de empleo se efectúa comparando dichas mediciones de parámetros celulares de cada uno de dichos embriones o células pluripotentes entre sí para determinar el potencial de desarrollo de los embriones o células pluripotentes en relación unos con otros.
- 30 V. El método de la realización (O), en donde dicha etapa de empleo se efectúa: comparando dichas mediciones de parámetros celulares de cada uno de dichos embriones o células pluripotentes con una medición de parámetros celulares de un embrión o célula pluripotente de referencia para determinar los potenciales de desarrollo de cada embrión o célula pluripotente; y comparando los potenciales de desarrollo de cada embrión o célula pluripotente para determinar el potencial de desarrollo de los embriones o células pluripotentes en relación unos con otros.
- 35 W. Un método para proporcionar un embrión humano con buen potencial de desarrollo a una hembra, que comprende las etapas de:
- (a) cultivar uno o más embriones en condiciones suficientes para el desarrollo del embrión;
- (b) medir uno o más parámetros celulares en dicho uno o más embriones para llegar a una medición de parámetros celulares;
- 40 (c) emplear dicha medición de parámetros celulares para proporcionar una determinación del potencial de desarrollo de dicho uno o más embriones; y
- (d) transferir dicho uno o más embriones que demuestren buen potencial de desarrollo a una hembra que lo necesite.
- 45 X. El método de la realización (W), en donde dichos embriones se producen por fecundación de ovocitos *in vitro*.
- Y. El método de la realización (W), en donde dichos ovocitos fueron madurados *in vitro*.
- Z. El método de la realización (W), en donde dichos ovocitos fueron madurados *in vivo*.
- AA. El método de la realización (Y), en donde los ovocitos madurados *in vitro* son complementados con factores

de crecimiento.

AB. Aparato para la obtención de imágenes automatizadas de células en cultivo, que comprende:

- (a) una pluralidad de microscopios colocados dentro de una incubadora;
- (b) estando dispuesto cada microscopio para enfocar una placa de cultivo fijada en una platina;
- 5 (c) teniendo cada microscopio una fuente de luz para iluminar las células en la placa de cultivo;
- (d) teniendo cada microscopio una cámara de obtención de imágenes; y
- (e) un ordenador para almacenar imágenes de una o más cámaras y programado para analizar imágenes secuenciales a lo largo del tiempo.

AC. El aparato de la realización (AB), en donde la fuente de luz proporciona iluminación de campo oscuro.

10 AD. El aparato de la realización (AB), en donde la fuente de luz es roja o del infrarrojo cercano.

AE. Aparato para cultivo celular, que comprende:

- (a) una placa de Petri con micro-pocillos;
- (b) teniendo cada micro-pocillo una superficie inferior con acabado de calidad óptica;
- 15 (c) estando dispuestos los micro-pocillos muy próximos de tal modo que puedan compartir una sola gota de medio.

AF. El aparato de la realización (AE), en el que una pared externa está situada alrededor de los micro-pocillos para alojar una gota de medio.

AG. El aparato de la realización (AE), en el que están colocados marcadores fiduciarios cerca de los micro-pocillos.

20 AH. Sistema para determinar el potencial de desarrollo de células embrionarias o células madre en crecimiento, que comprende:

- (a) un microscopio;
- (b) una cámara de obtención de imágenes para adquirir imágenes del microscopio;
- (c) un ordenador para almacenar las imágenes de la cámara;
- 25 (d) un programa informático para crear modelos de las células para medir al menos uno de entre: (i) la duración de la citocinesis y (ii) el tiempo entre eventos de mitosis.

AI. Un método automatizado para obtener imágenes microscópicamente de una célula móvil en división en cultivo, en el cual la célula en división es muestreada como una serie de imágenes digitales que tienen píxeles, que comprende las etapas de:

- 30 (a) representar el conjunto de píxeles como una forma calculada;
- (b) predecir cambios en el conjunto de píxeles debidos al movimiento y la división de la célula perturbando valores de la forma calculada;
- (c) generar un conjunto de imágenes simuladas de la forma predicha;
- (d) comparar las imágenes simuladas con la imagen real; y
- 35 (e) usar la comparación para determinar la exactitud de la forma predicha.

AJ. El método de la realización (AI), en donde la simulación de imágenes comprende simular un contorno de una o más membranas celulares.

AK. El método de la realización (B), en donde dicha célula pluripotente es un ovocito, y dicho uno o más parámetros celulares se selecciona del grupo que consiste en:

- 40 (i) la duración de un evento de citocinesis que produce un cuerpo polar; y
- (ii) el intervalo de tiempo entre los ciclos celulares meióticos.

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar el potencial de desarrollo de un embrión humano, que comprende:
 - a) cultivar el embrión en condiciones que promuevan la supervivencia, el crecimiento y/o el desarrollo;
 - b) medir uno o más parámetros celulares por obtención de imágenes secuenciales, en donde las imágenes son adquiridas a lo largo del tiempo;
 - c) analizar dichas imágenes para llegar a mediciones de parámetros celulares, en donde los parámetros celulares se seleccionan de:
 - i) el intervalo de tiempo entre la citocinesis 1 y la citocinesis 2; o
 - ii) el intervalo de tiempo entre la citocinesis 2 y la citocinesis 3; y
 - d) emplear dichas mediciones de parámetros celulares para detectar el potencial de desarrollo de un embrión humano.
2. El método de la reivindicación 1, en donde el intervalo de tiempo entre la citocinesis 1 y la citocinesis 2 es el intervalo entre el comienzo de la citocinesis 1 y el comienzo de la citocinesis 2, el intervalo entre la resolución de la citocinesis 1 y la resolución de la citocinesis 2, el intervalo entre el comienzo de la citocinesis 1 y la resolución de la citocinesis 2; o el intervalo entre la resolución de la citocinesis 1 y el comienzo de la citocinesis 2.
3. El método de la reivindicación 1, en donde el intervalo de tiempo entre la citocinesis 2 y la citocinesis 3 es el intervalo entre el comienzo de la citocinesis 2 y el comienzo de la citocinesis 3, el intervalo entre la resolución de la citocinesis 2 y la resolución de la citocinesis 3, el intervalo entre el comienzo de la citocinesis 2 y la resolución de la citocinesis 3; o el intervalo entre la resolución de la citocinesis 2 y el comienzo de la citocinesis 3.
4. El método de las reivindicaciones 1 - 3, en donde el uno o más parámetros celulares se miden manual o automáticamente.
5. El método de las reivindicaciones 1 - 3, en donde dichos embriones son preparados recientemente a partir de ovocitos por fecundación *in vitro*.
6. El método de las reivindicaciones 1 - 3, en donde dichos embriones han sido congelados previamente.
7. El método de las reivindicaciones 1 - 6, en donde la obtención de imágenes secuenciales se realiza con un microscopio controlado por ordenador y equipado para el almacenamiento y análisis digitales.
8. El método de las reivindicaciones 1 - 7, en donde la obtención de imágenes secuenciales emplea iluminación de campo brillante, iluminación de campo oscuro, contraste de fases, contraste con modulación de Hoffman, contraste con interferencia diferencial o fluorescencia.
9. El método de las reivindicaciones 1 - 8, en donde el intervalo entre imágenes es entre 1 y 30 minutos.
10. El método de la reivindicación 1, en donde los embriones se cultivan en placas de cultivo personalizadas.
11. El método de las reivindicaciones 1 - 9, en donde las mediciones de los parámetros celulares se realiza antes de que transcurran 96 horas de la fecundación, por ejemplo antes de que transcurran 84 horas de la fecundación, por ejemplo antes de que transcurran 72 horas de la fecundación, por ejemplo antes de que transcurran 60 horas de la fecundación, por ejemplo antes de que transcurran 54 horas de la fecundación, por ejemplo antes de que transcurran 36 horas de la fecundación o por ejemplo antes de que transcurran 2 días de la fecundación.
12. El método de las reivindicaciones 1 - 9, en donde las mediciones de los parámetros celulares se realiza antes de que transcurran 54 horas.

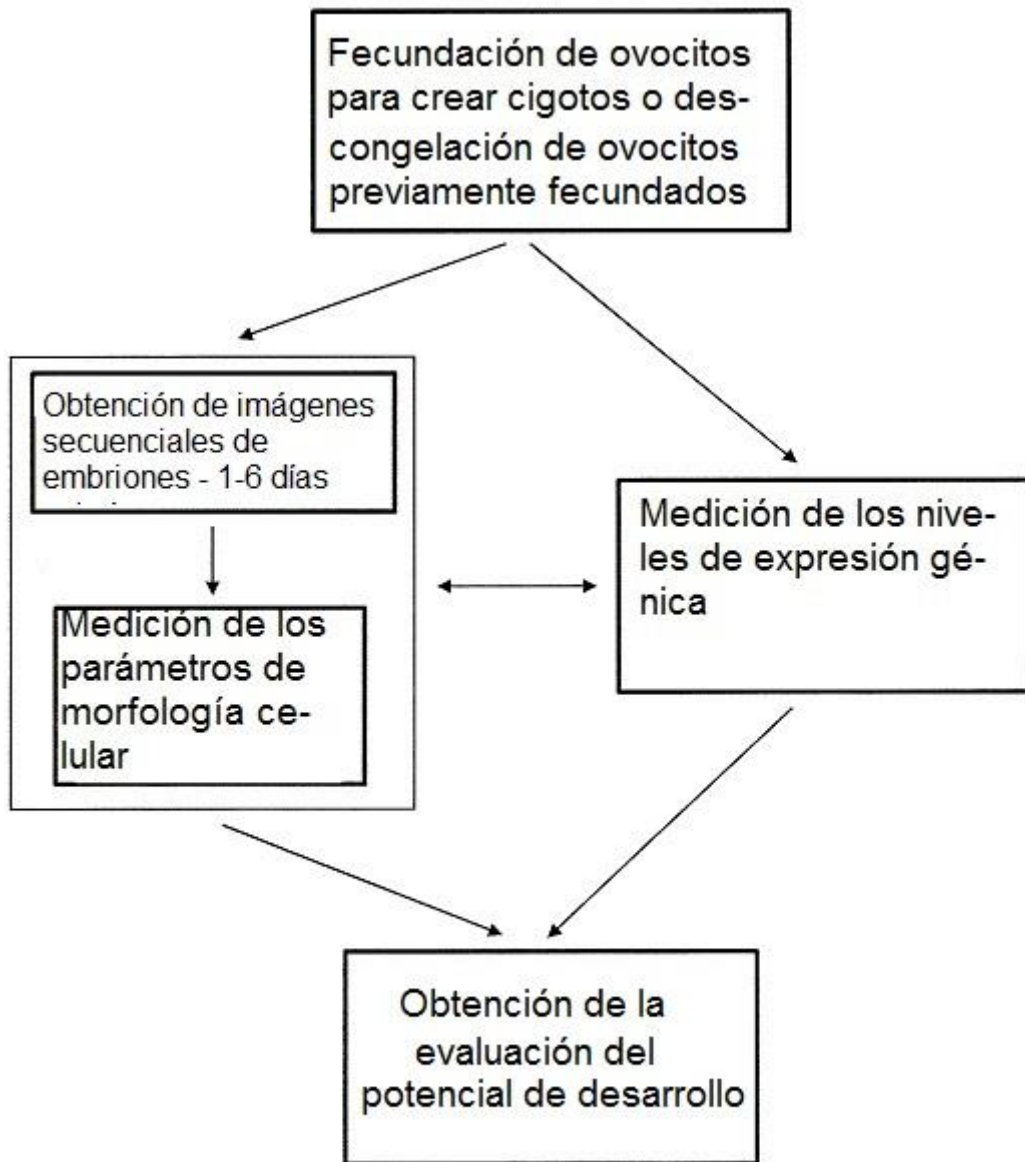


Fig. 1

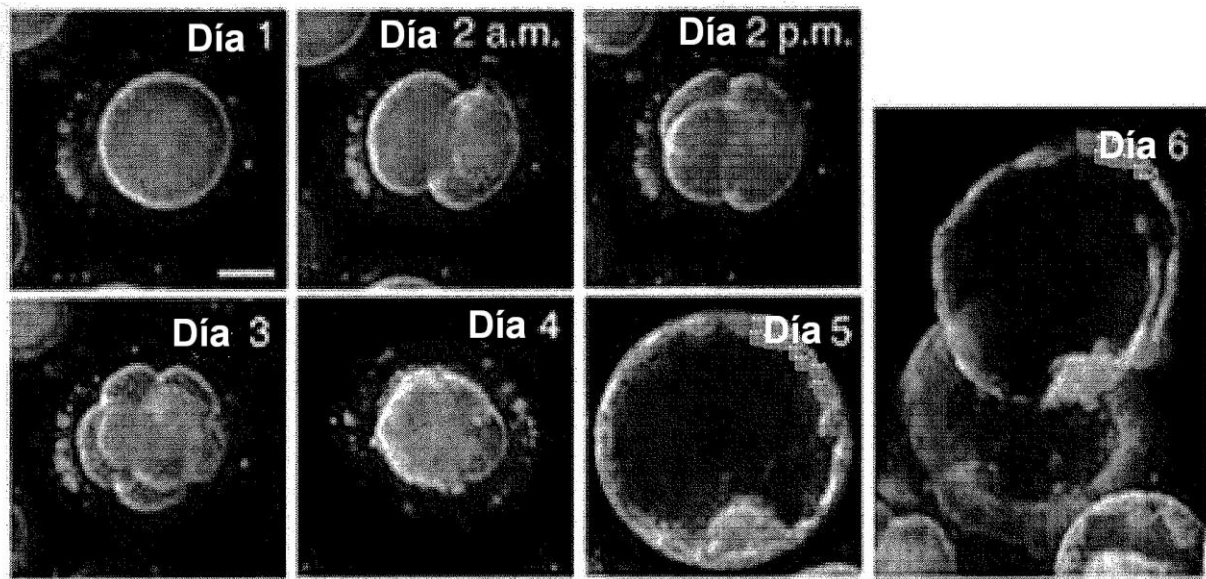


Fig. 2

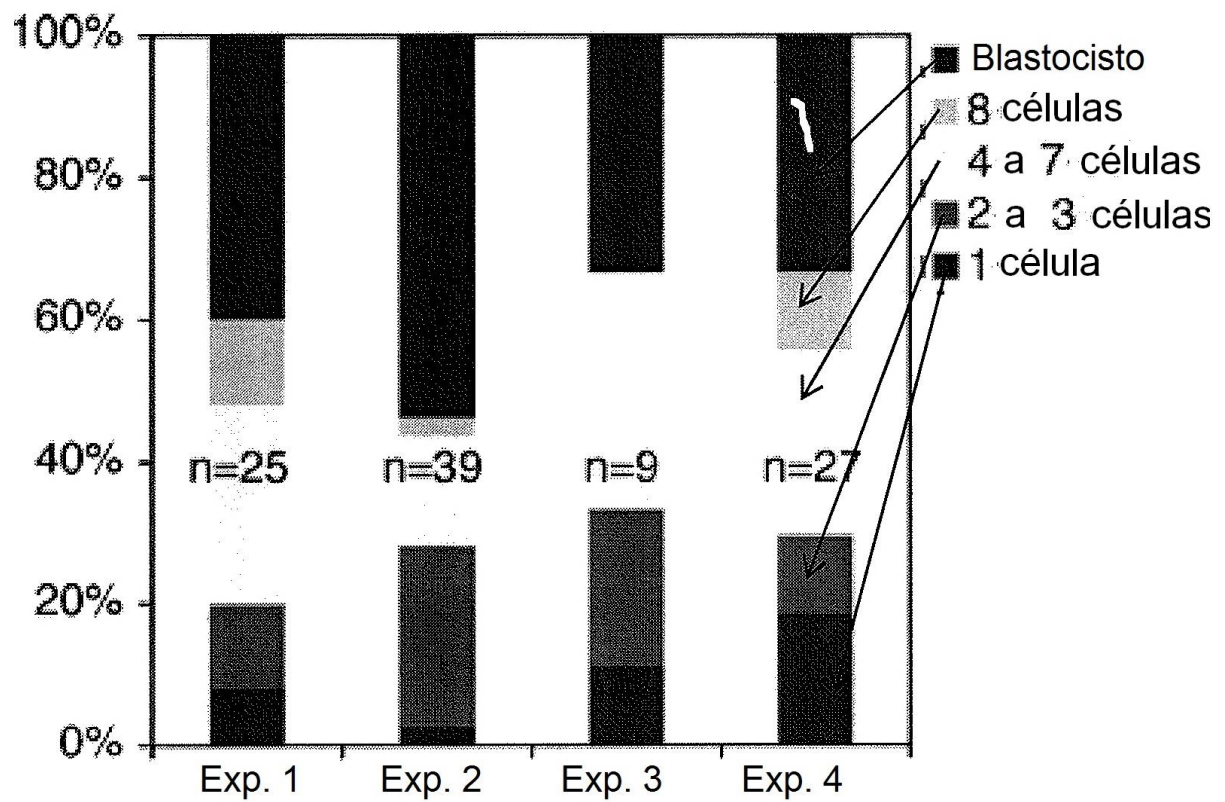
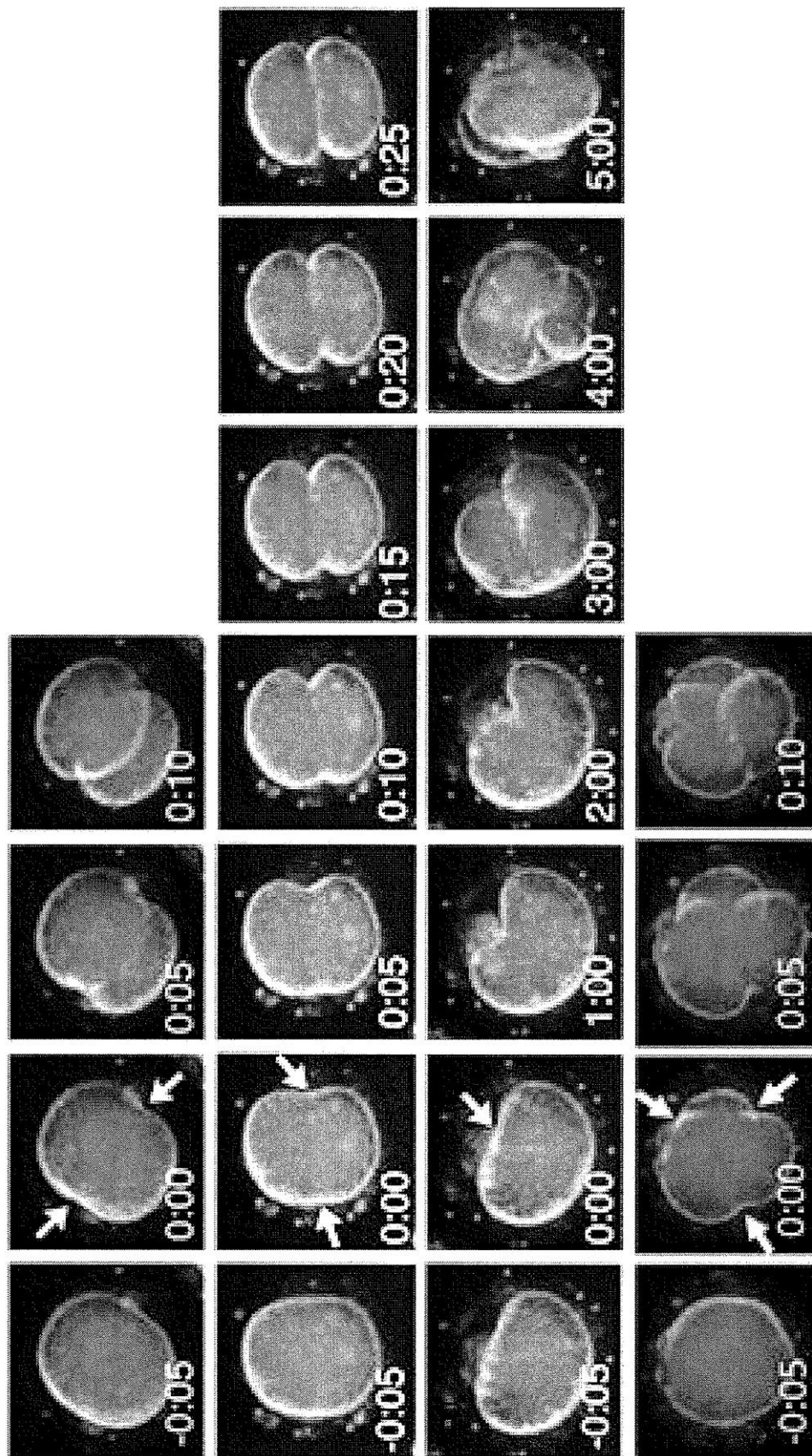


Fig. 3

FIG. 4



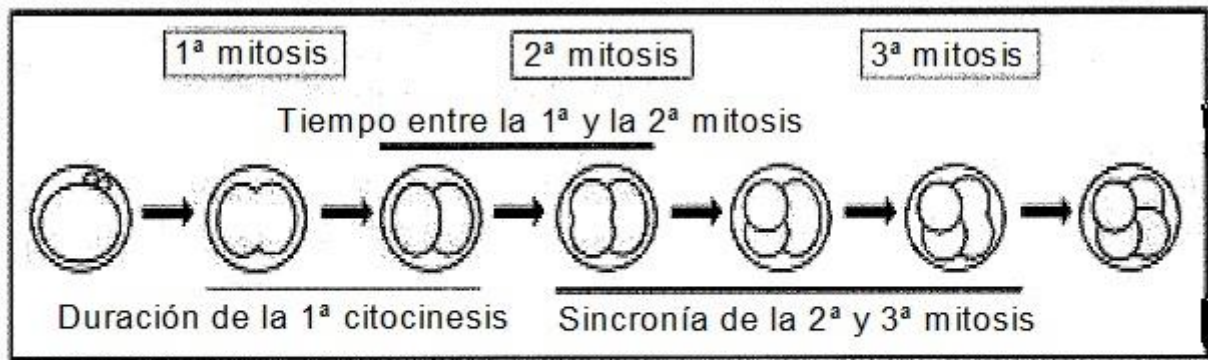


Fig. 5

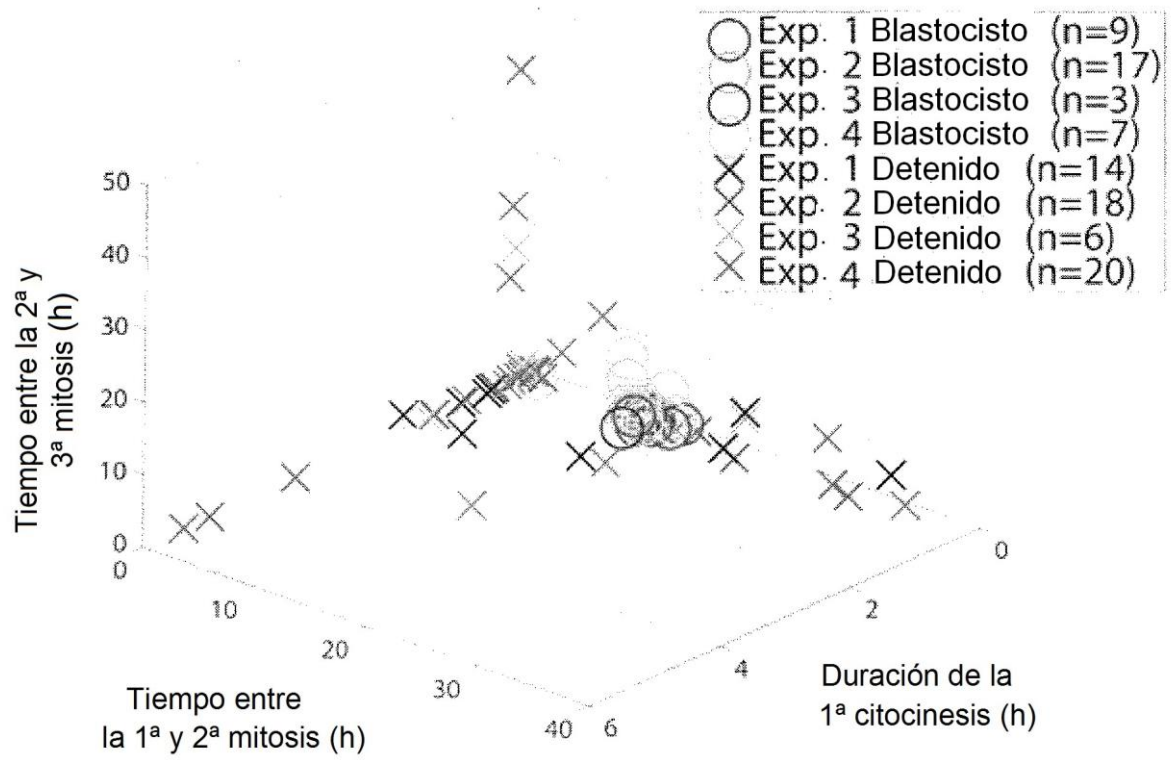


Fig. 6

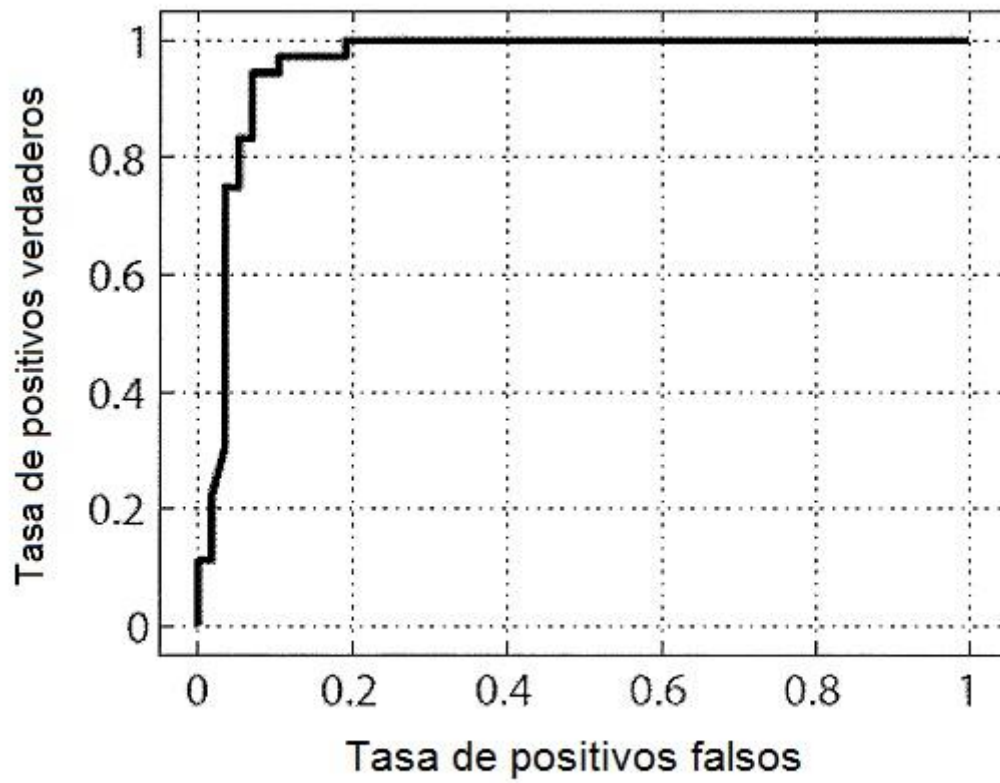
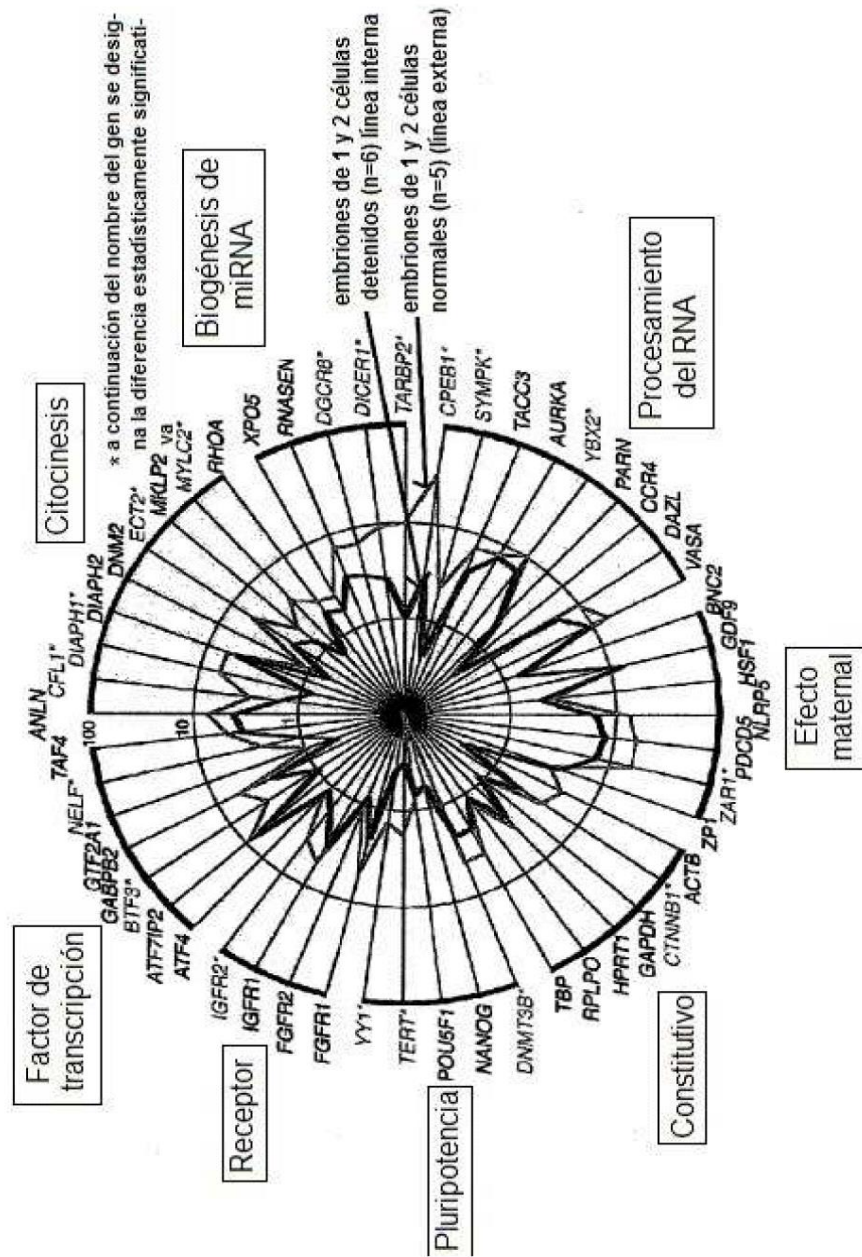


Fig. 7

Fig. 8



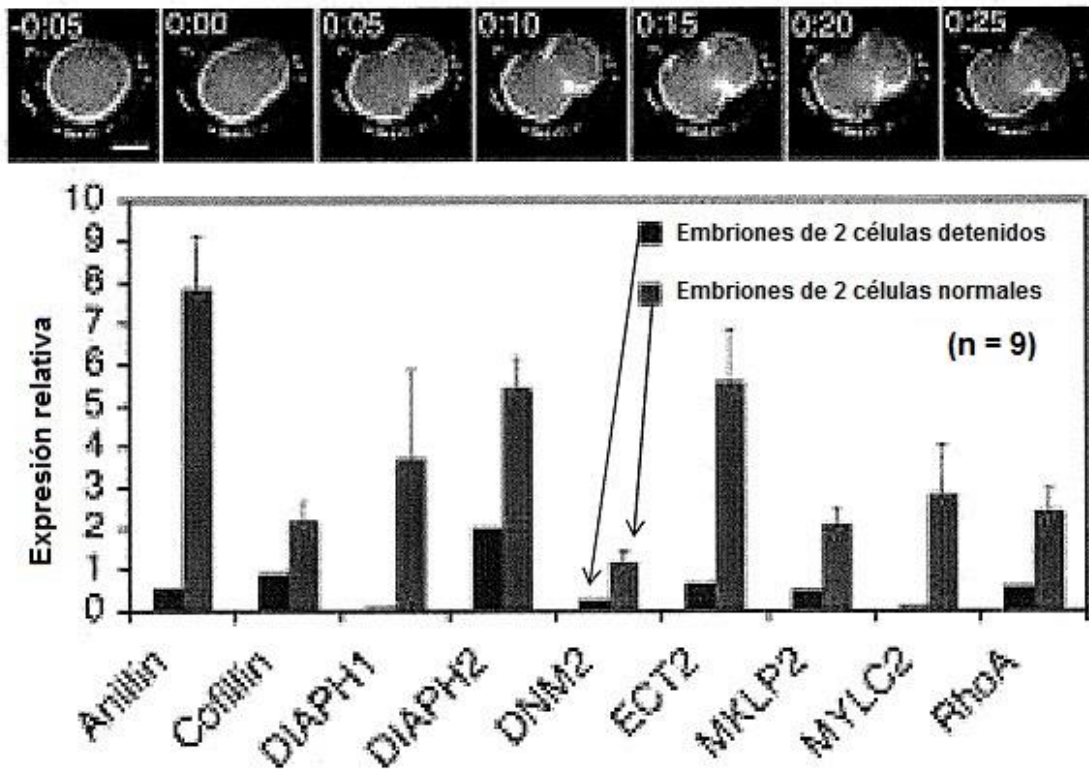


Fig. 9

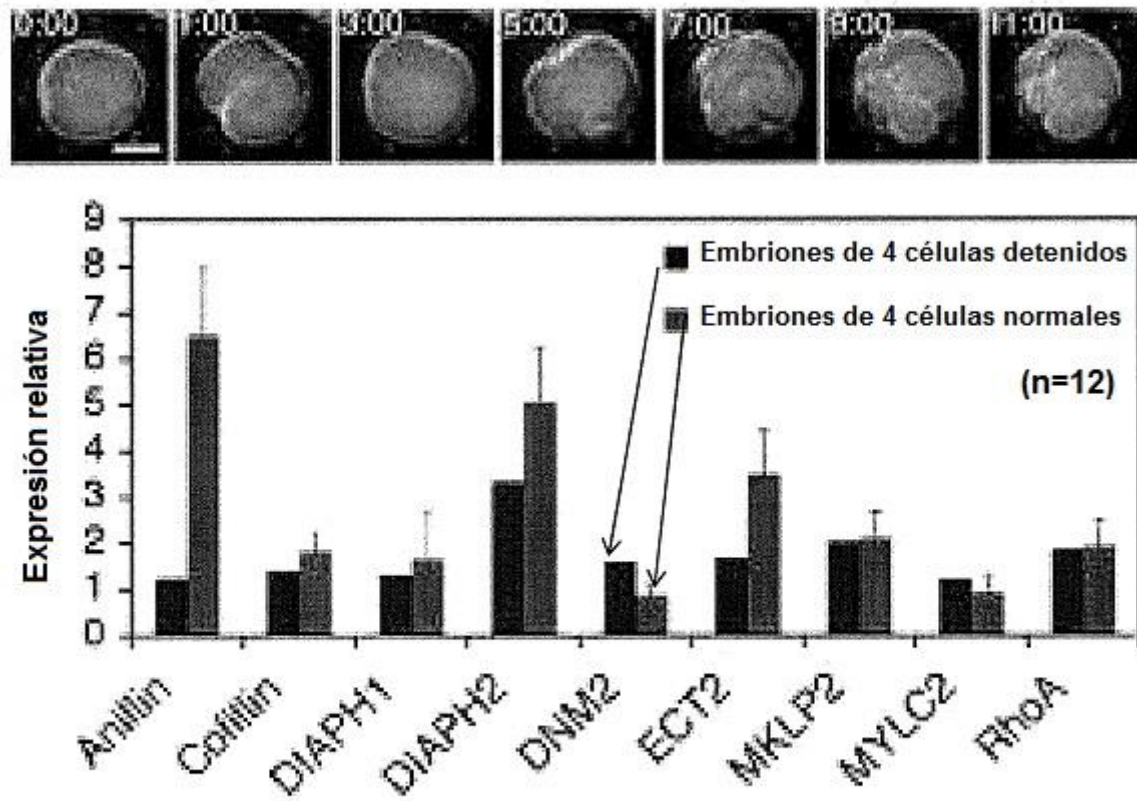


Fig. 10

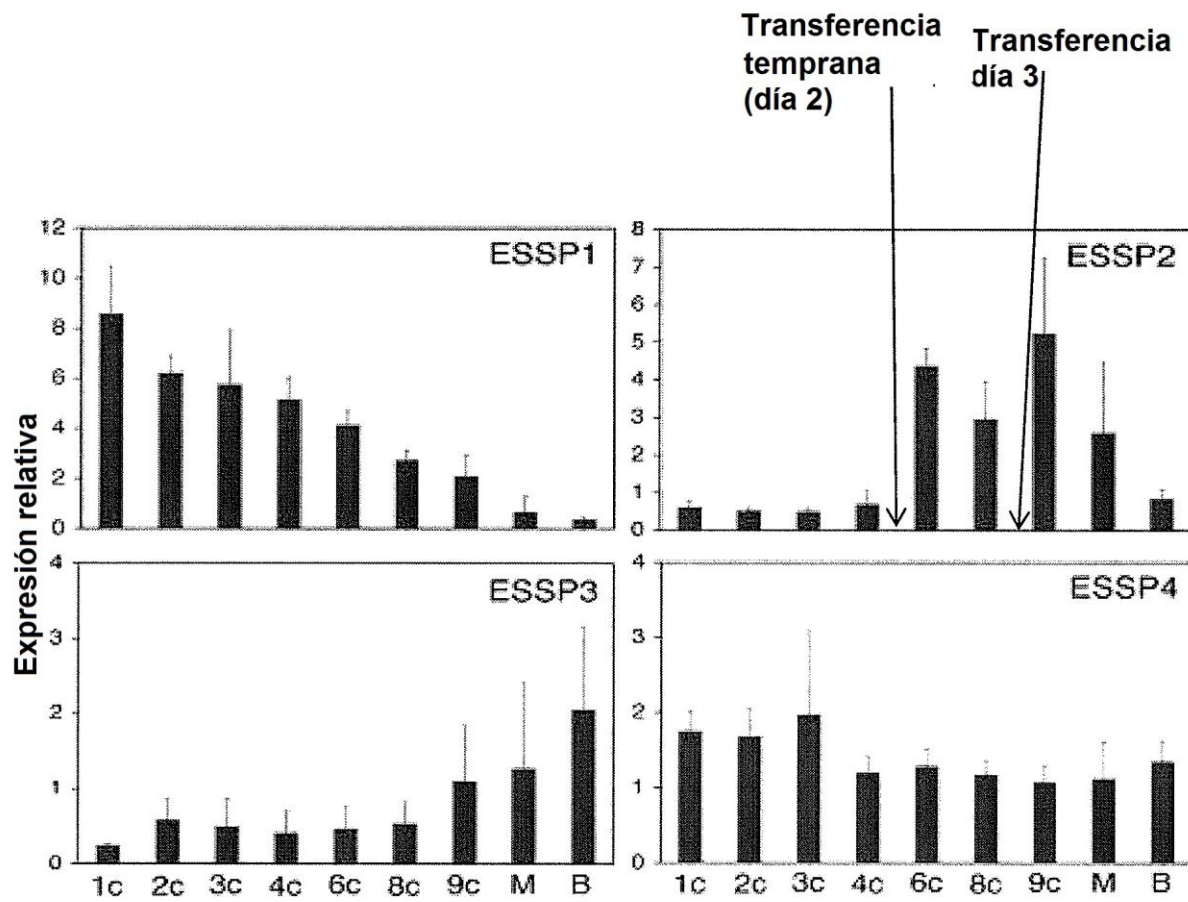


Fig. 11

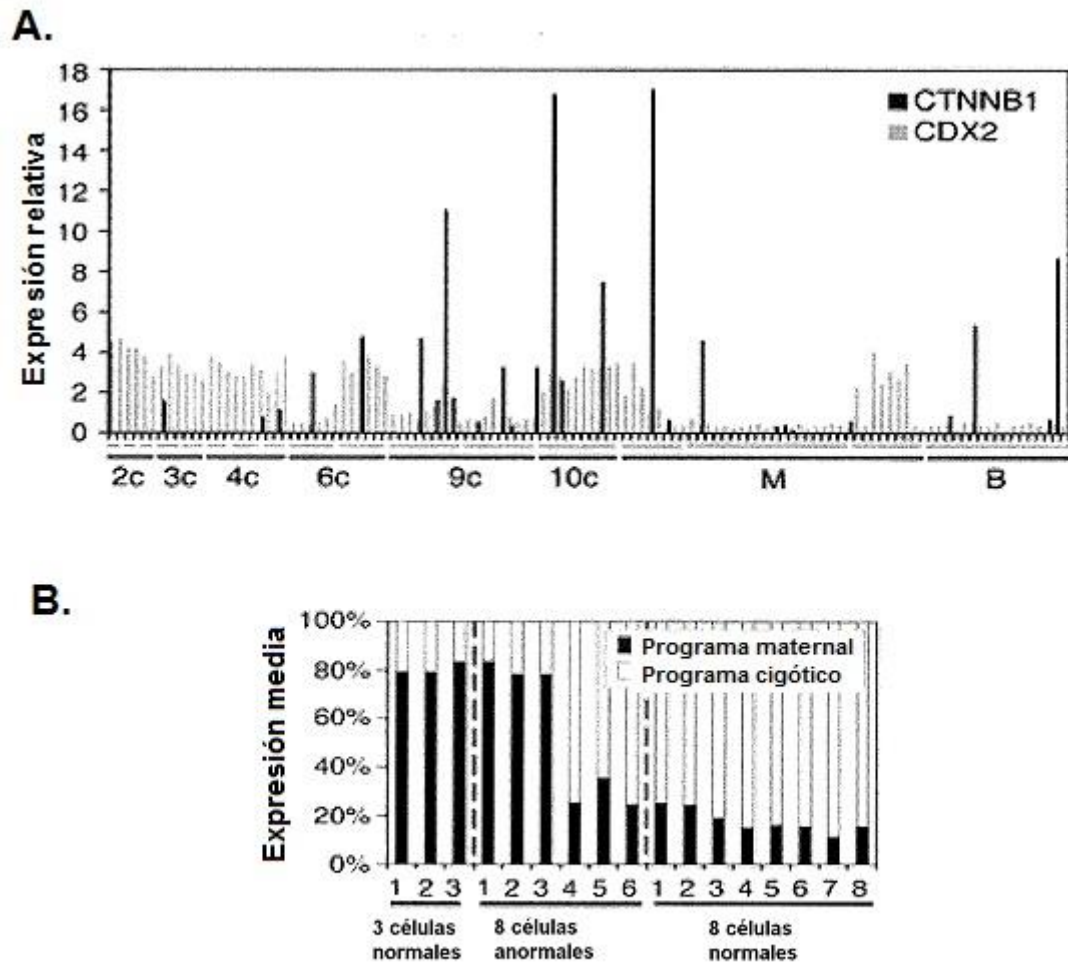
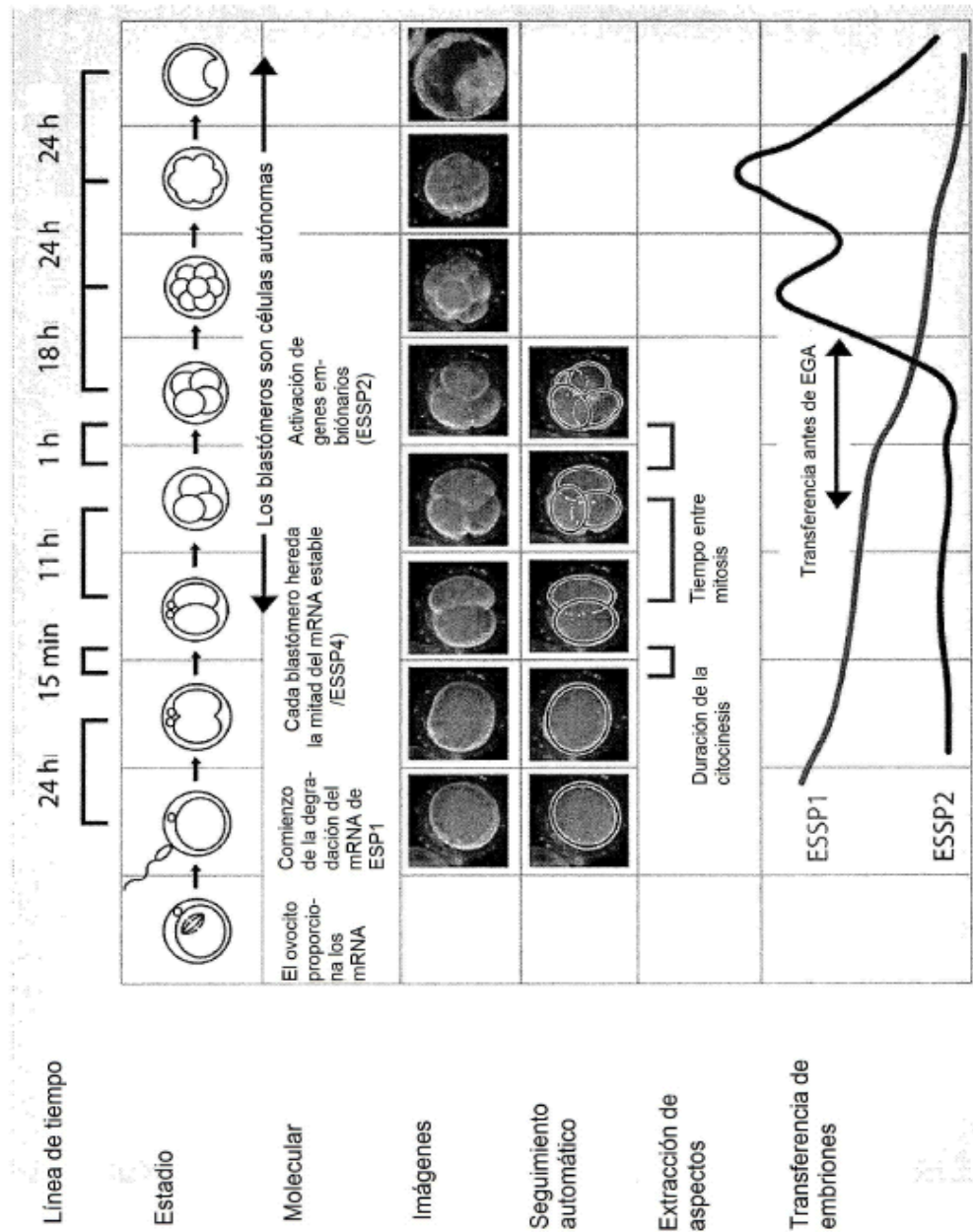


Fig. 12

Fig. 13



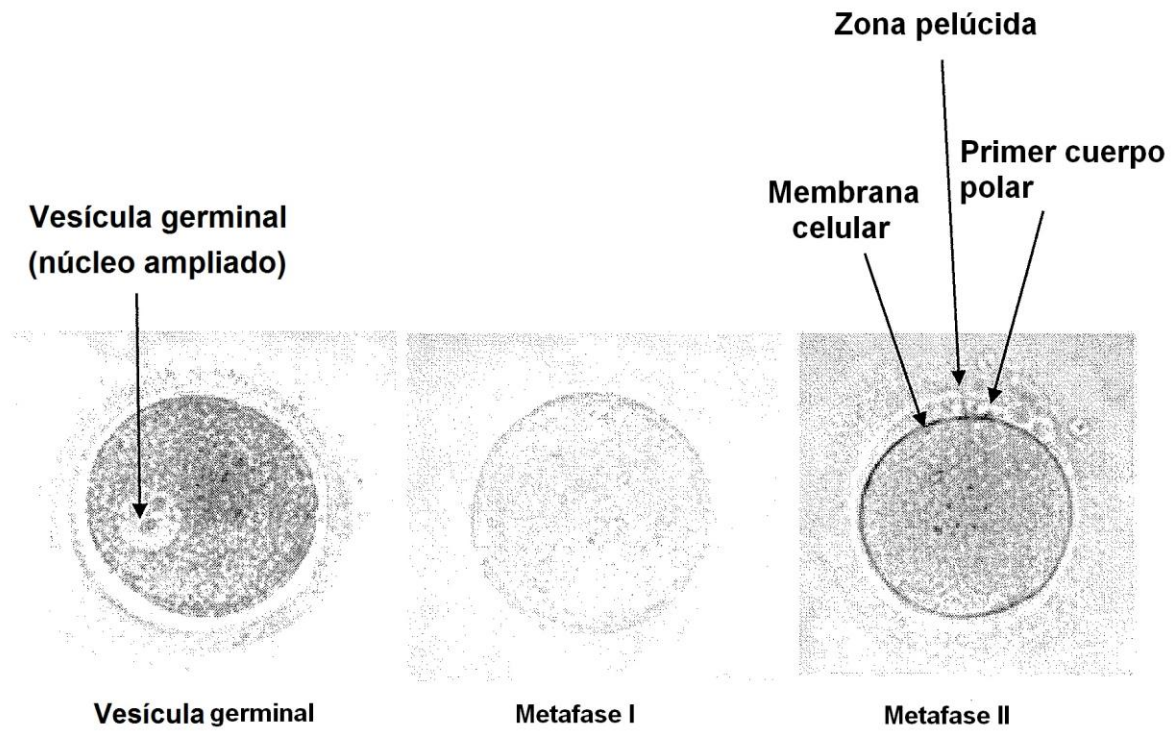


Fig. 14

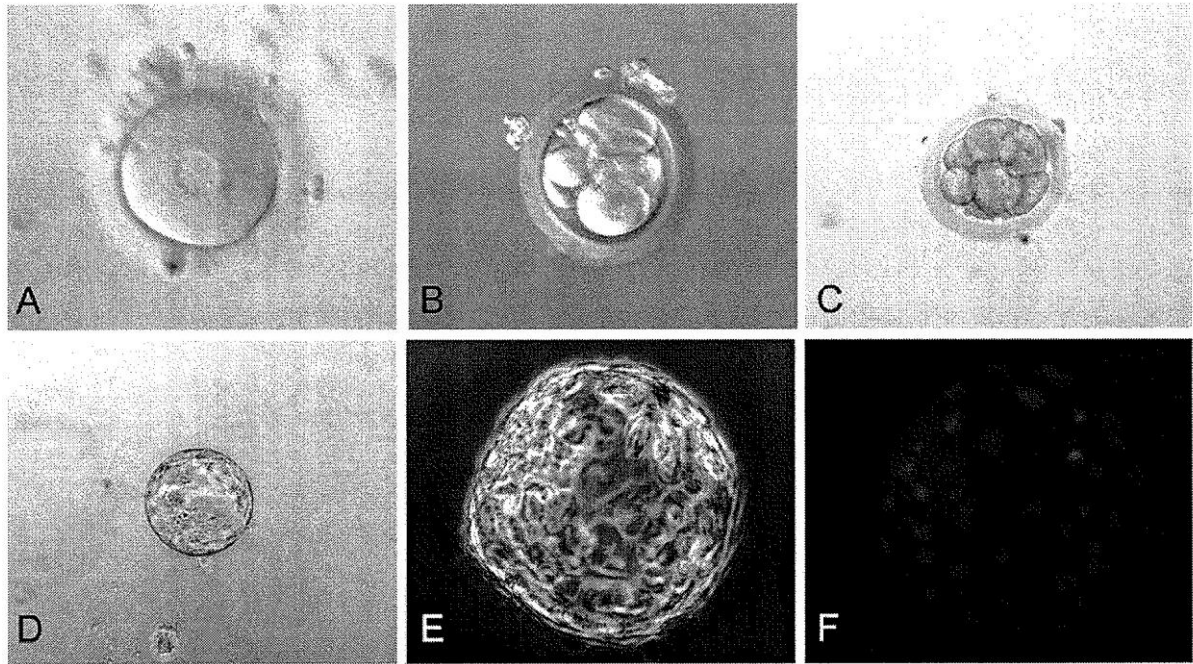


Fig. 15

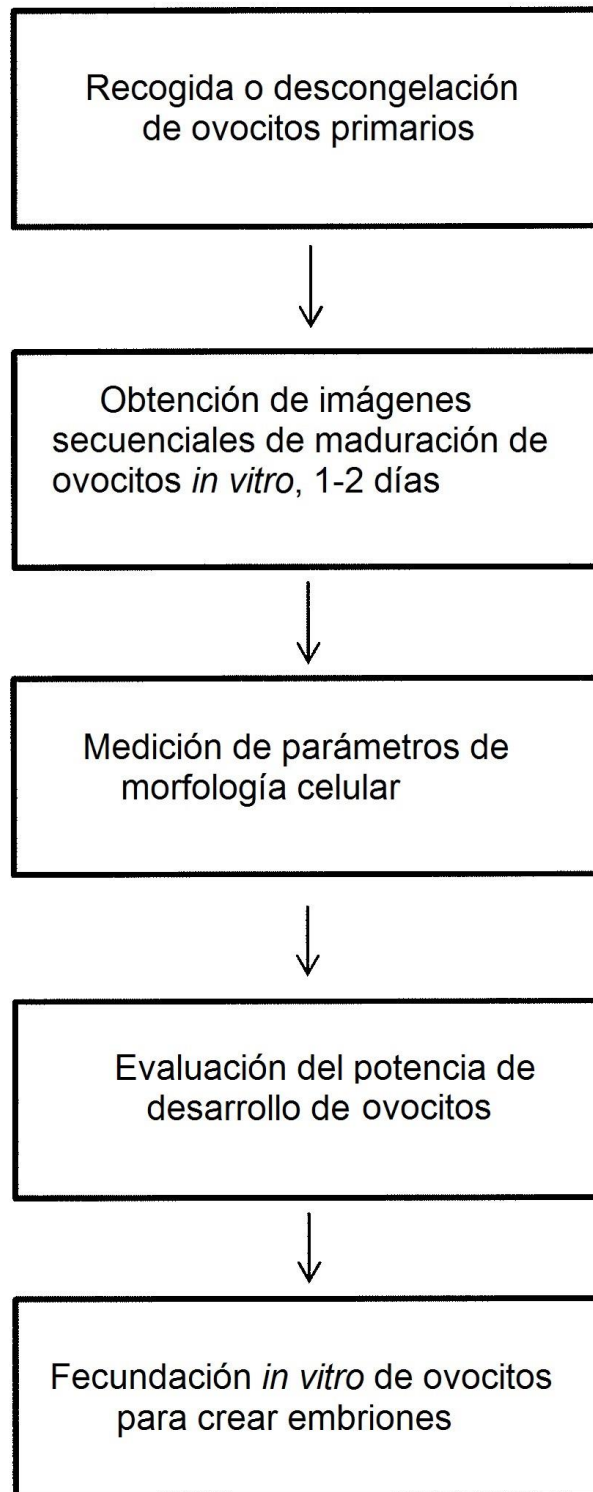


Fig. 16

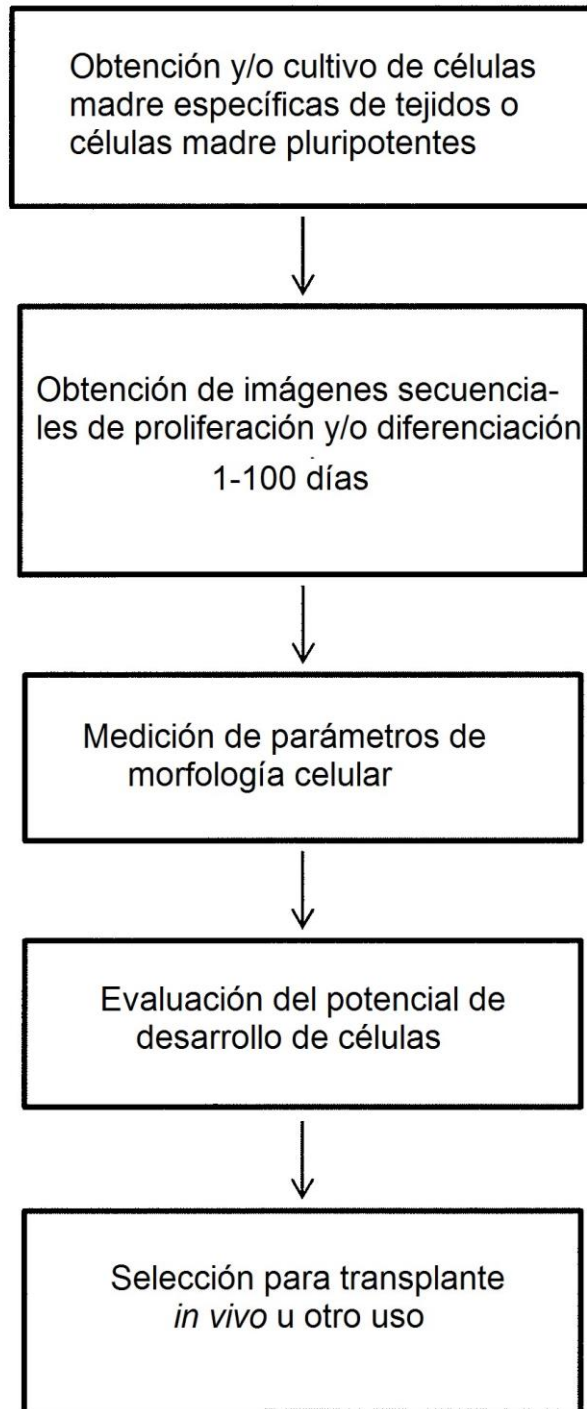


Fig. 17

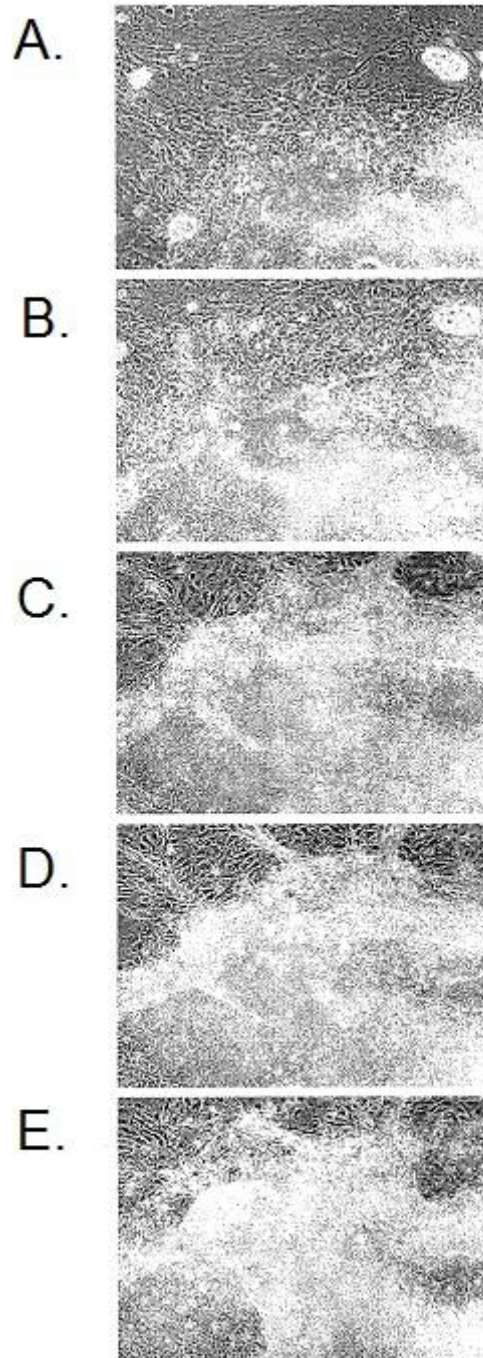


Fig. 18

Fig. 19**Tabla 1**

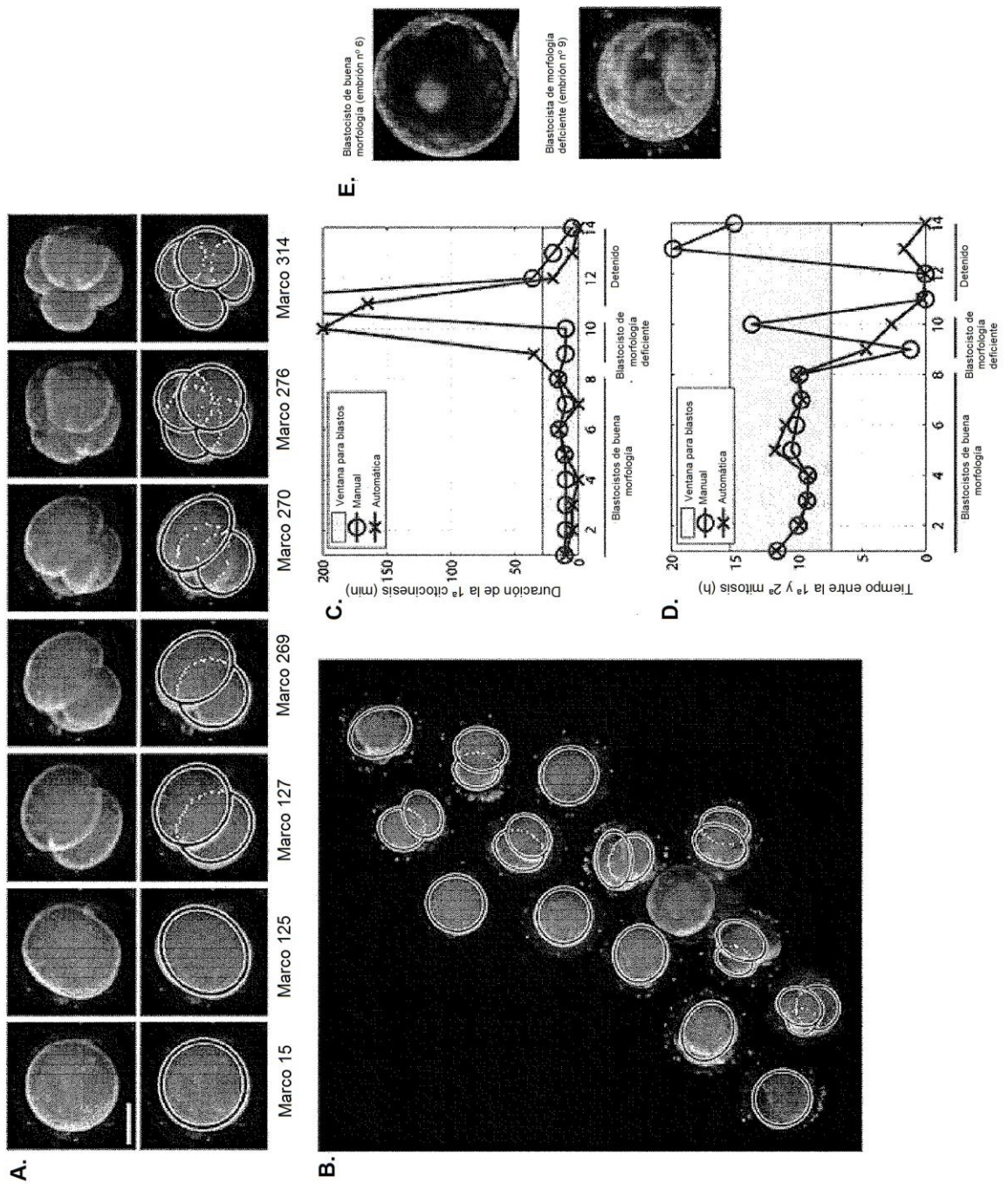
Categoría	Nº de genes
Apoptosis	5
Citocinesis	10
Diferenciación	9
Activación de genes embrionarios	10
Epigenética	5
Célula germinal	9
Constitutivo	10
Ligando / receptor	11
Efecto materno	8
miRNA	5
Pluripotencia	7
Procesamiento del RNA	7
Específico de sexo	2
TE/ICM	14
Factor de transcripción	11

Fig.20

Tabla 2

Patrón 1	Patrón 2	Patrón 4
Anillin	CCNA1	CTK7
ATG5	CCR4	FABP5
ATP2C1	DNM2	FGFR2
Aurora A	EIF1AX	GAPDH
Bclaf1	EIF4A3	HMOX2
Cofilin	EOMES	Hsp70
CPEB1	GDF3	IGF2R
DAZL	GTF2A1	LSM3
Dgcr8	H2AFZ	PABPC1
DIAPH1	JARID1B	PRMT5
DIAPH2	Nanog	RPLPO
Dicer	NES	YY1
DNAJA4	Prdm14	
DNMT3B	PTMA	No definido
DrosHa	RUNX2	ATF4
ECT2	SERPINA1	ATF7IP
EHMT2	SERTAD1	ATF7IP2
FGFR1	SOX2	B2M
FYN	STELLAR	BNC2
GABPB2	YY1	BTF3
GDF9		CDX2
HMOX2	Patrón 3	CTNNB1
HPRT1	B-actin	Dby
HSF1	Bcl2	Hsp70.1
IGF1R	GCM1	PRDM1
IGF2R	HDAC7A	Symplekin
LAMB1	IFTM1	TARBP2
MKLP2	POU5F1	Xist
MYLC2	SALF	
NI RP5	TGFBR2	
PARN		
PDCD5		
PVR		
RhoA		
Sycp3		
TACC3		
TAF4		
TBP		
TERT		
VASA		
XPO5		
YBX2		
Zar1		
ZP1		

Fig. 21



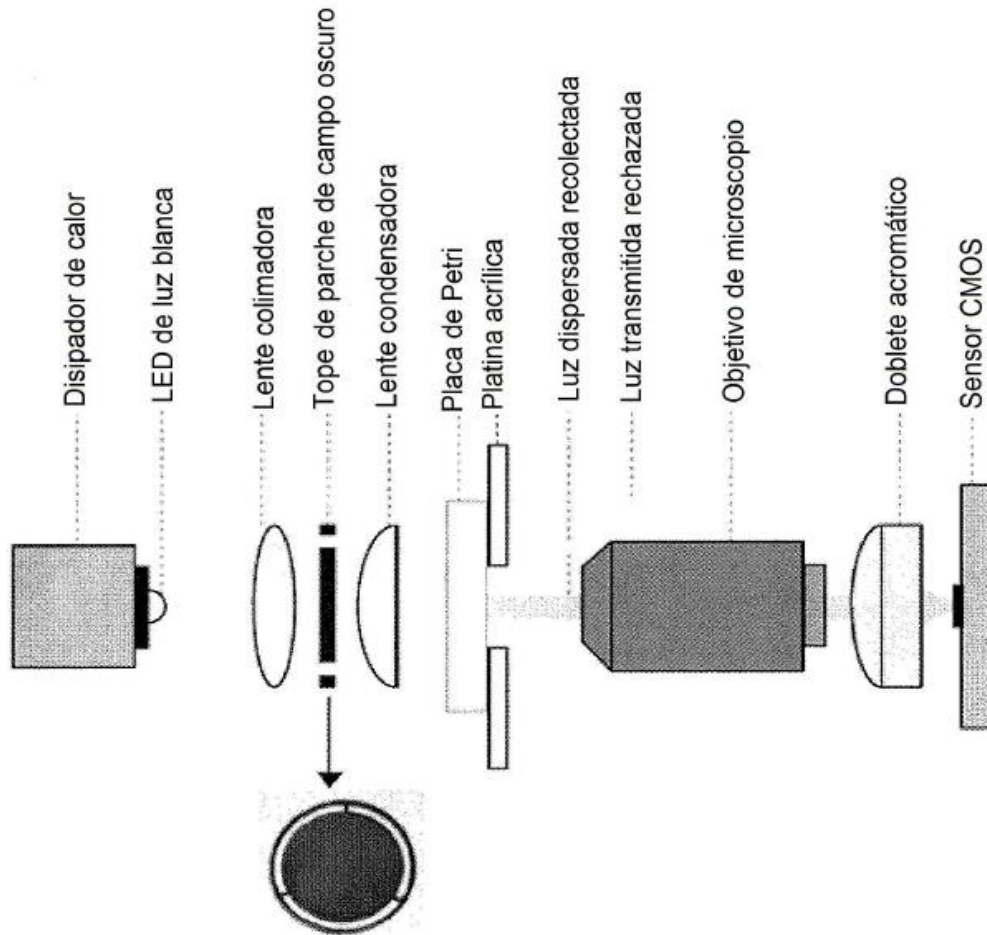


Fig. 22

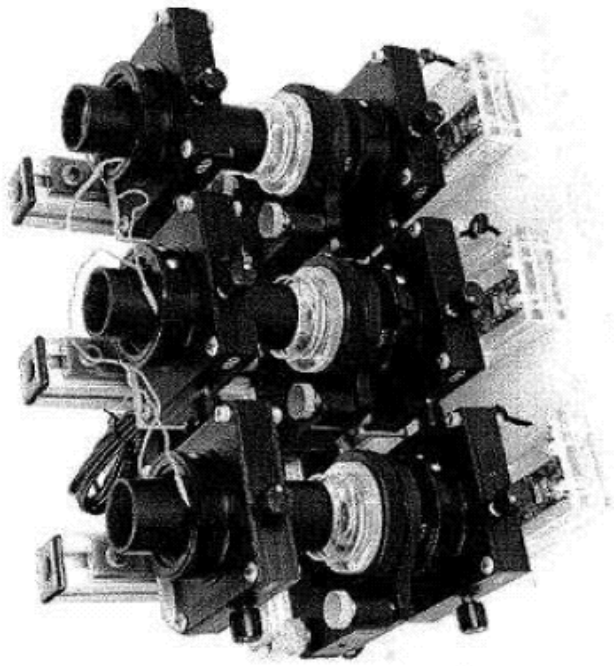
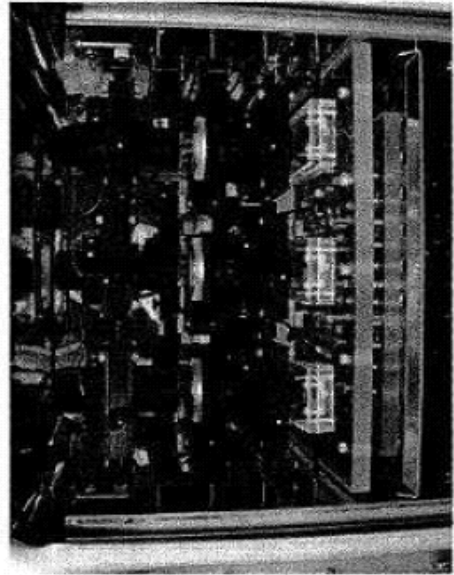


Fig. 23

23A



23B

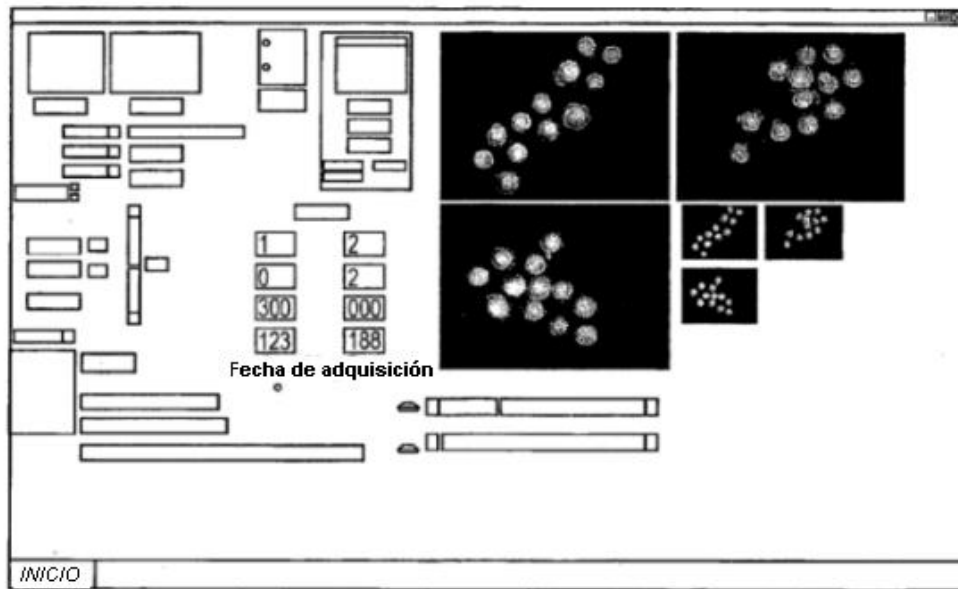


Fig. 24

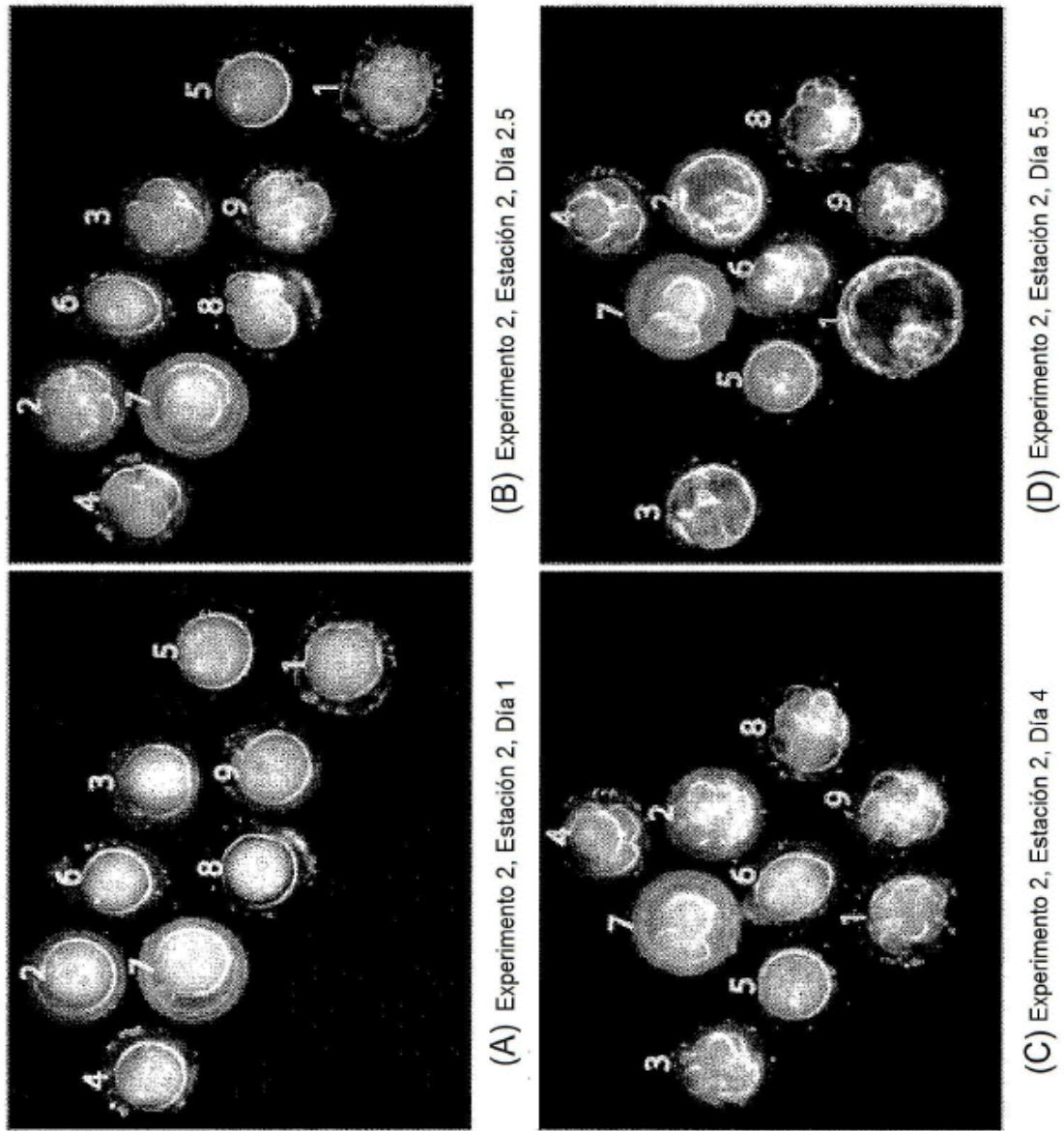


Fig. 25

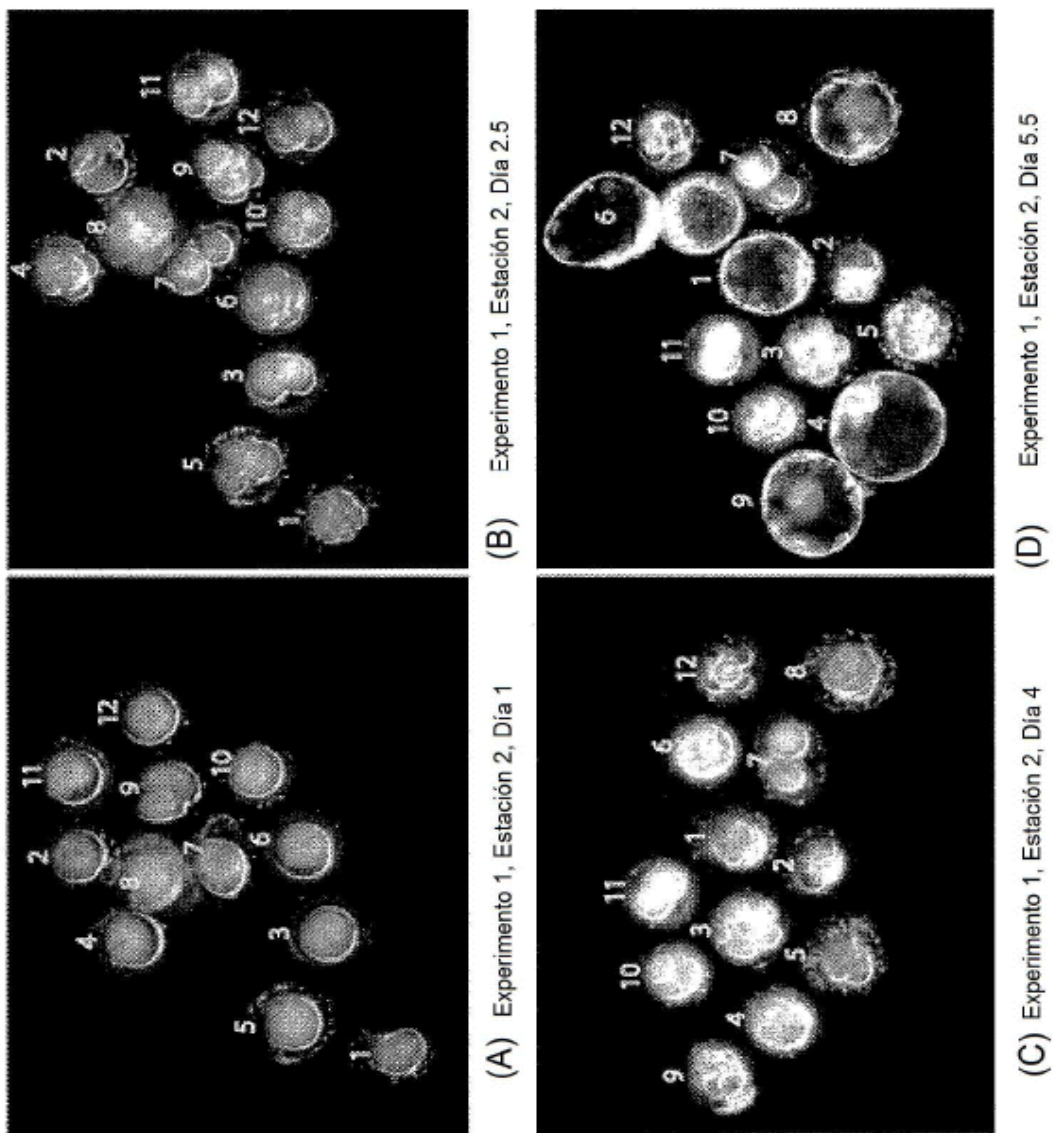


Fig. 26

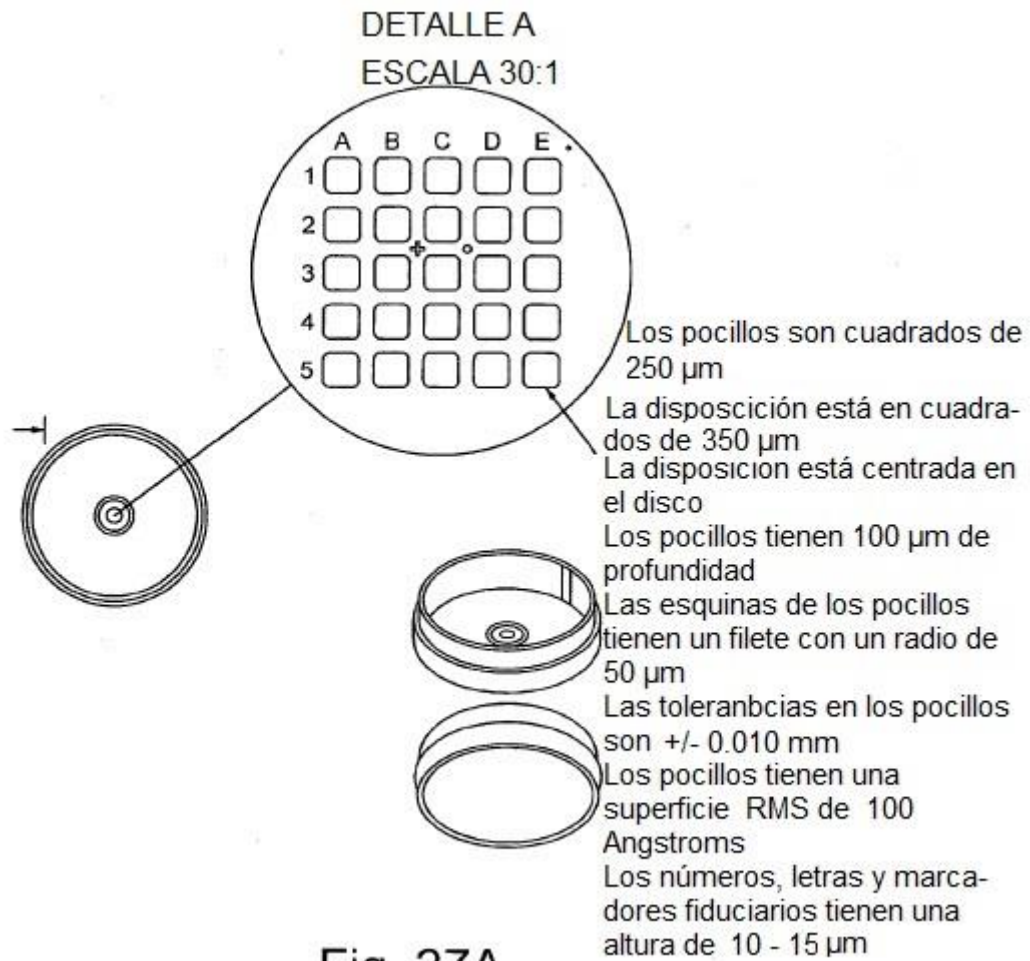


Fig. 27A

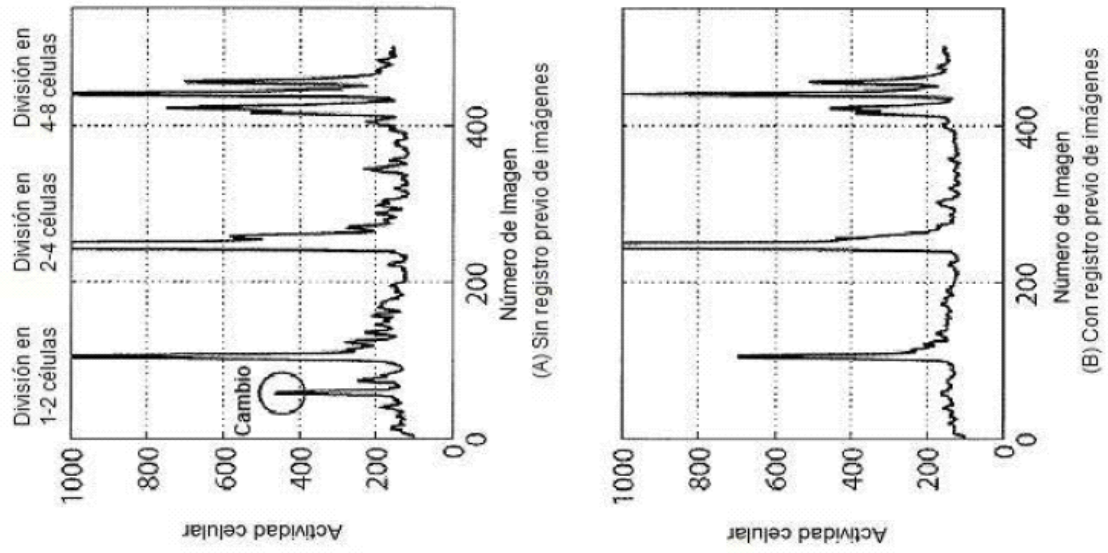


Fig. 28

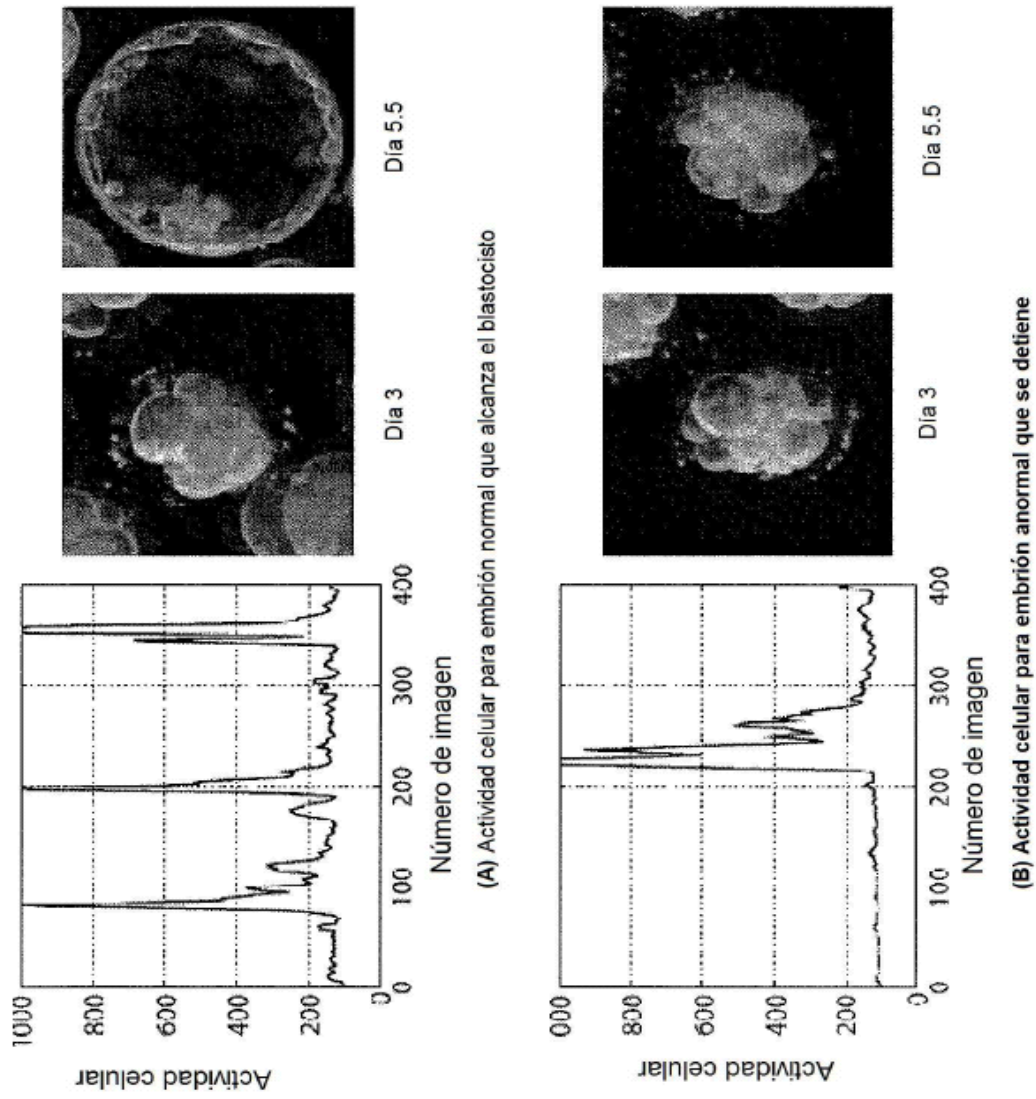


Fig. 29

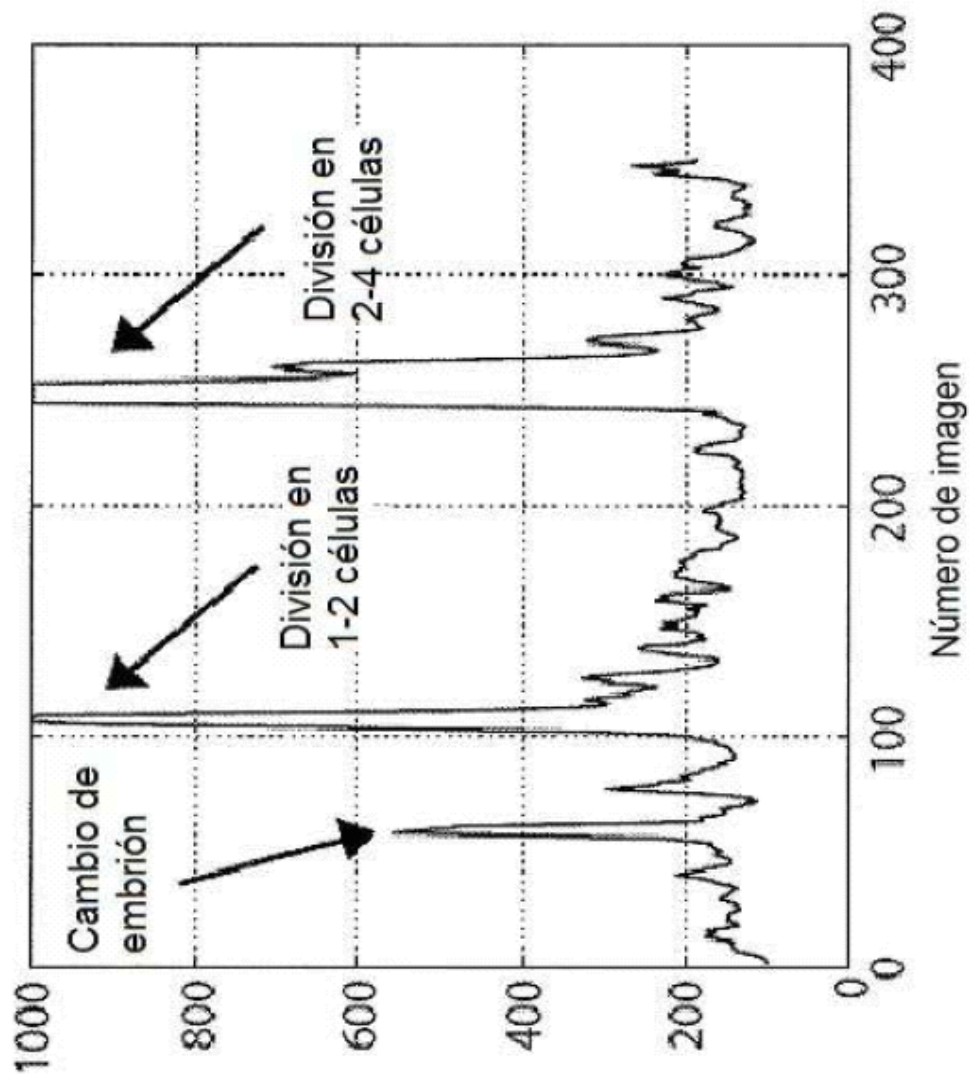


Fig. 30

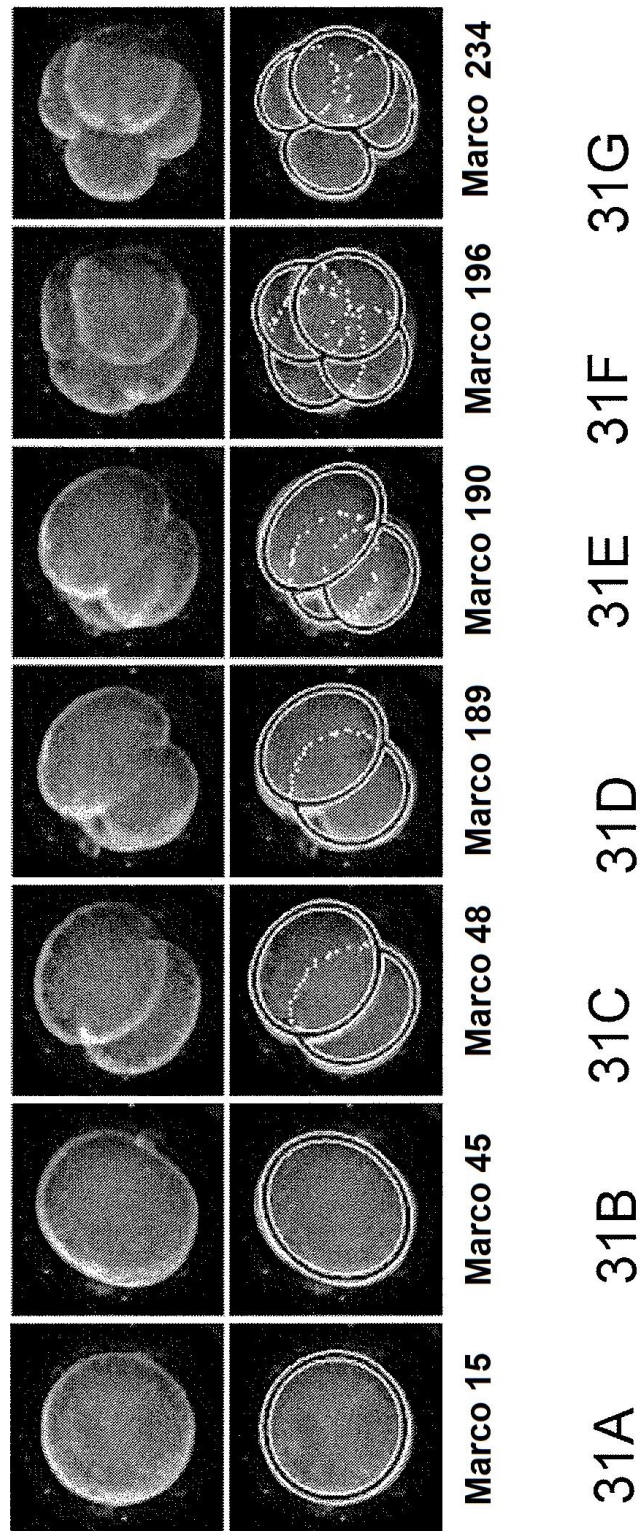
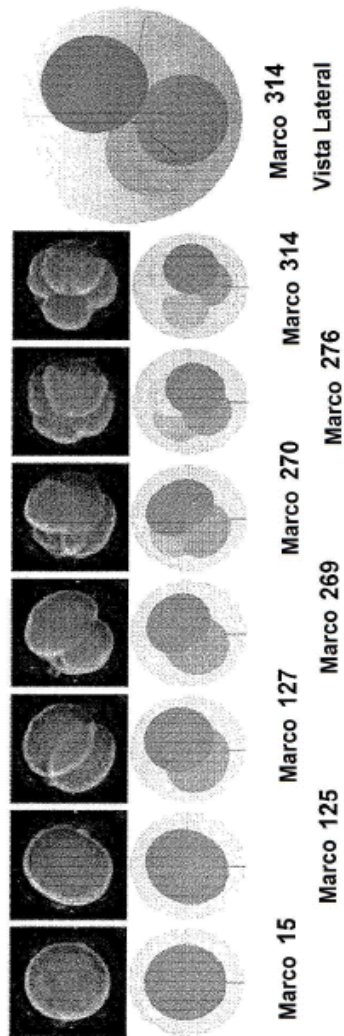
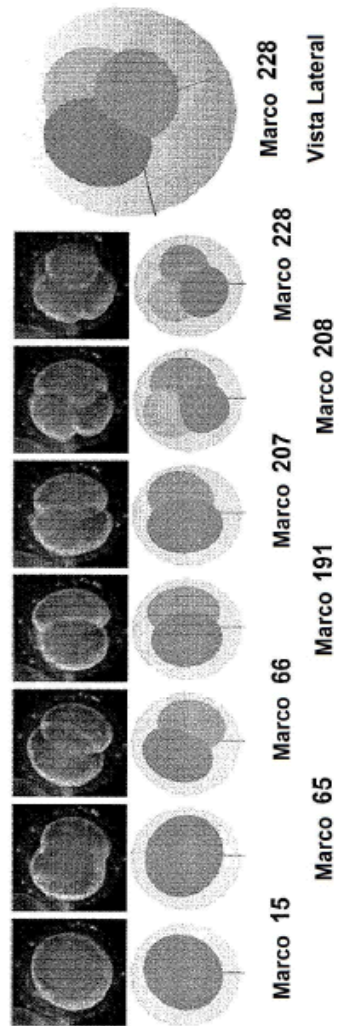


Fig. 31



32A



32B

Fig. 32

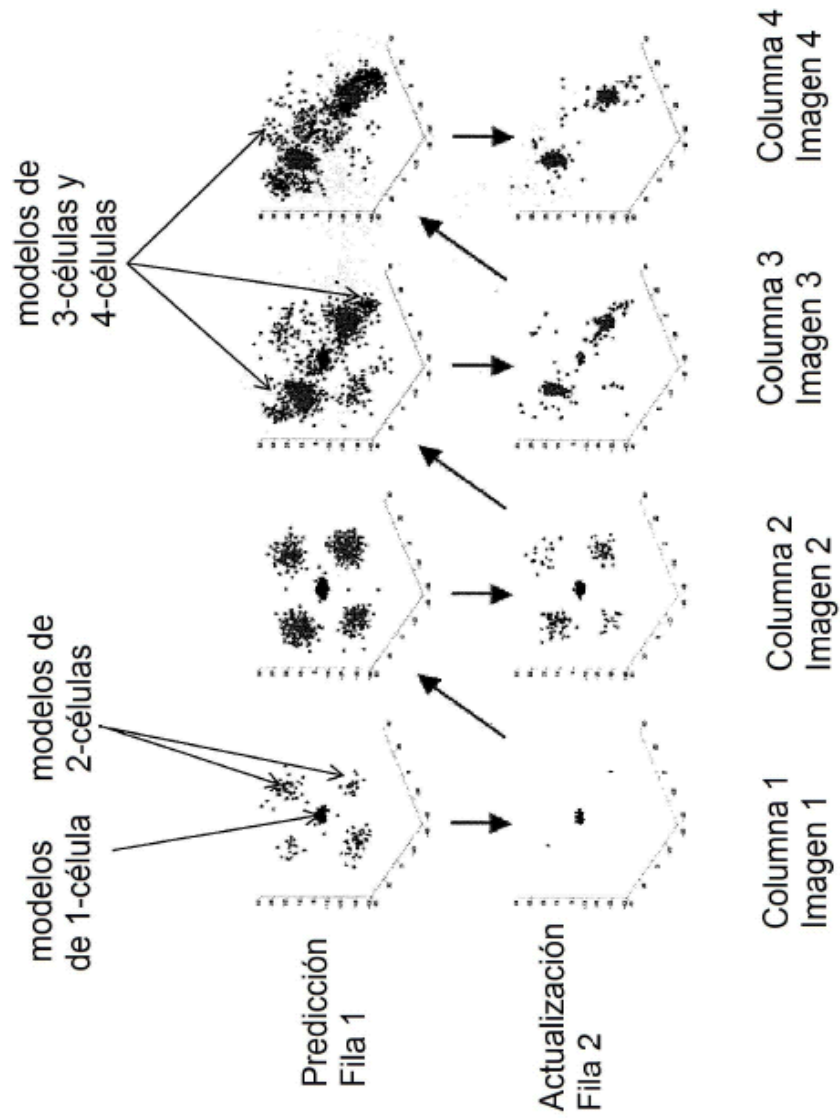


Fig. 33

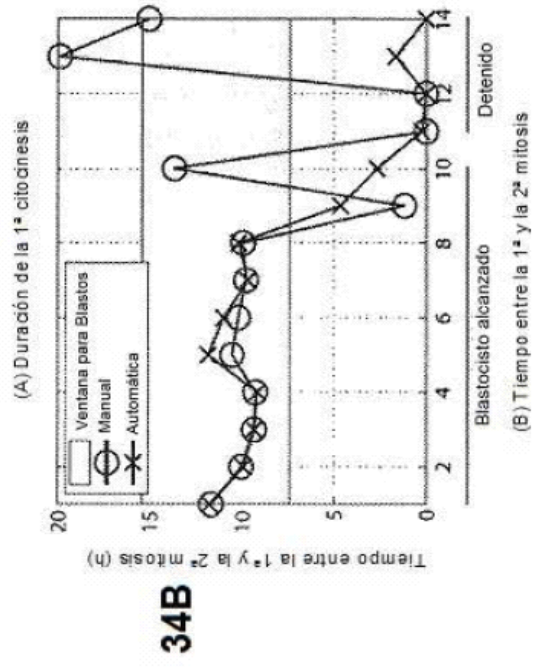
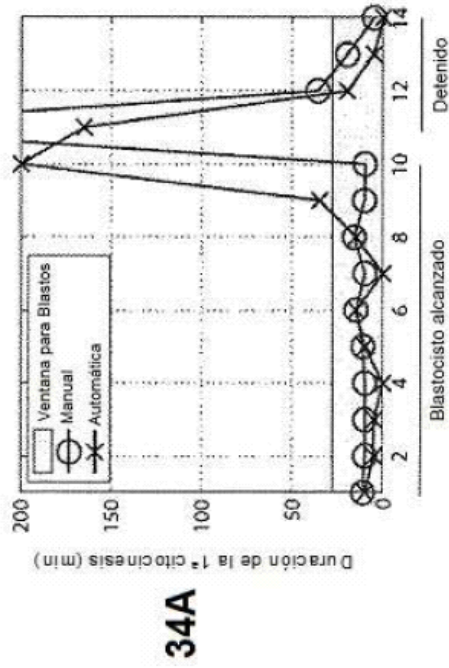


Fig. 34

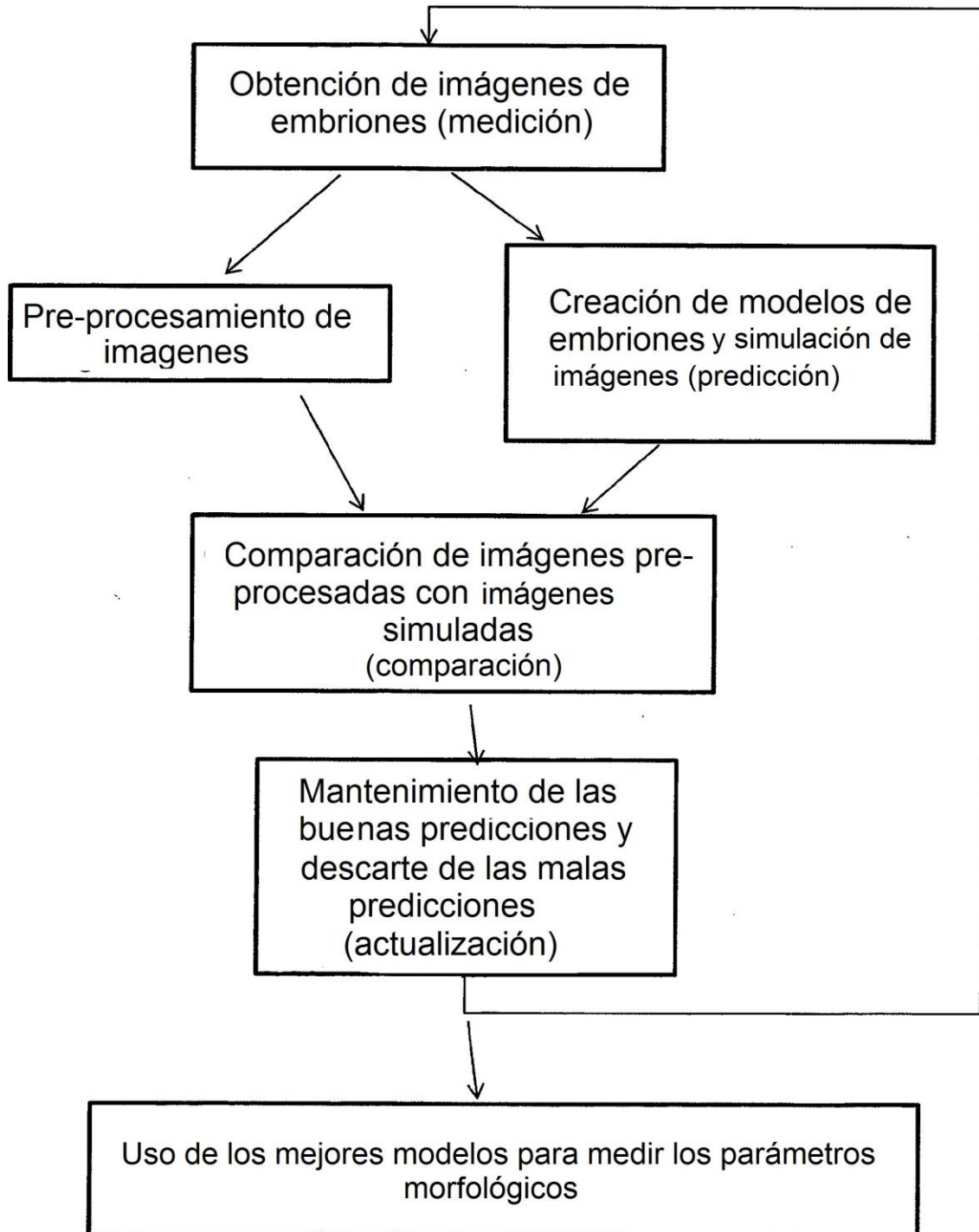


Fig. 35